

**FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE**

**A.C. CAMARGO CANCER CENTER**

**JULIANNA PEREIRA DOS SANTOS**

**A INIBIÇÃO DE BRD4 REDUZ PARÂMETROS ASSOCIADOS À EXAUSTÃO DE  
LINFÓCITOS T NO CONTEXTO DE TERAPIAS CELULARES ADOTIVAS**

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente  
como requisito para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências (M.Sc.).

Área de concentração: Imuno-oncologia

Orientador: Prof. Dr. Tiago da Silva Medina

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Mariela Pires Cabral Piccin

**São Paulo**

**2025**

**Santos, Julianna.**

**A INIBIÇÃO DE BRD4 REDUZ PARÂMETROS ASSOCIADOS À  
EXAUSTÃO DE LINFÓCITOS T NO CONTEXTO DE TERAPIAS  
CELULARES ADOTIVAS. / Julianna Santos. São Paulo, 2025.**

**61f.**

**Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.**

**Orientador: Tiago da Silva Medina.**

**1. Linfócitos T, 2. Terapia celular adotiva, 3. Epigenética**

**CDU 616**

**Julianna Pereira dos Santos**

**Título: A inibição de BRD4 reduz parâmetros associados à exaustão de linfócitos T no contexto de terapias celulares adotivas.**

**Aprovado em: 26/09/2025**

**Banca examinadora**

**Orientador: Prof. Dr. Tiago da Silva Medina**

**Instituição: Fundação Antônio Prudente/ A.C. Camargo Cancer Center**

**Co-orientadora: Mariela Pires Cabral Piccin**

**Instituição: Fundação Antônio Prudente/ A.C. Camargo Cancer Center**

**Membro da banca: Dr. Tiago Goss dos Santos**

**Instituição: Fundação Antônio Prudente/ A.C. Camargo Cancer Center**

**Membro da banca: Dra. Renata Sesti Costa**

**Instituição: Universidade de Campinas (Unicamp)**

**Membro da banca: Dr. Jefferson Antonio Leite**

**Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)**

**SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Saúde e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## RESUMO

SANTOS, JP. **A inibição de BRD4 reduz parâmetros associados à exaustão de linfócitos T no contexto de terapias celulares adotivas.** São Paulo: Fundação Antônio Prudente, 2025.

Os linfócitos T desempenham um papel crucial na vigilância imunológica, identificando e respondendo a ameaças, incluindo células tumorais. Os linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) reconhecem e eliminam células tumorais por meio da secreção de mediadores inflamatórios e moléculas citotóxicas, enquanto os linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) apoiam e contribuem para esse processo secretando citocinas que estimulam e regulam a resposta imunológica. Devido a essas características cruciais, as células T são utilizadas como matéria-prima para terapia celular adotiva, na qual células modificadas e/ou expandidas *in vitro* são infundidas no paciente com finalidade terapêutica. No entanto, a exposição contínua a antígenos tumorais, bem como o microambiente tumoral imunossupressor, leva à exaustão dos linfócitos T, conduzindo essas células à perda progressiva de funções e a um estado de disfuncional muitas vezes irreversível, associado a um comprometimento epigenético. Assim, a exaustão celular tem sido uma questão crítica na terapia celular adotiva aplicada ao tratamento do câncer, como o uso de células T do microambiente tumoral (terapia com TIL) e células T expressando CAR geneticamente modificadas (células CAR-T). Diante disso, as intervenções no epigenoma são estratégias que podem melhorar as características funcionais e a atividade antitumoral dos linfócitos T, reduzindo as limitações de seu uso no contexto da terapia celular adotiva. O objetivo deste estudo é avaliar o impacto modulador da inibição epigenética no fenótipo e funcionalidade de células T humanas, especialmente células TIL e células CAR-T, a fim de explorar o potencial de alvos epigenéticos identificados no aprimoramento dessas abordagens terapêuticas. Inicialmente, realizamos uma avaliação do efeito de diferentes inibidores epigenéticos em linfócitos T de doadores saudáveis. Os linfócitos T foram purificados por *sorting* celular, cultivados e ativados com anti-CD3/CD28, IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes e tratados com diferentes inibidores. Após a cultura, as células foram analisadas por citometria de fluxo. Dentre os três inibidores testados, o inibidor JQ1, que age sobre o bromodomínio extra-terminal (BET), apresentou o efeito modulatório mais consistente, levando ao aumento da expressão do marcador de ativação CD69, acompanhado pela redução na expressão de receptores inibitórios como PD-1 e TIM-3. Dessa forma, testamos o efeito da inibição com JQ1 em TIL de pacientes com carcinoma renal de células claras e células CAR-T anti-CD19. A inibição com JQ1 se mostrou eficiente na redução da expressão de marcadores associados à exaustão tanto em TIL de pacientes com CRCC quanto em células CAR-T. Após 48h de cultura, as condições de TIL tratadas com JQ1 apresentaram um maior número absoluto de células vivas, evidenciando uma maior capacidade de expansão celular. A reversão do fenótipo de exaustão de linfócitos T após tratamento com JQ1 sugeriu uma maior atividade antitumoral, evidenciada pelo aumento da morte de linhagem tumoral de LLA-B após cocultura com células CAR-T tratadas com inibidor de BRD4. Assim, a inibição de BRD4 se mostra capaz de reduzir marcadores associados à disfuncionalidade em linfócitos T, com potencial para aplicação dessa estratégia de resgate da exaustão celular em terapias celulares adotivas com linfócitos T (SANTOS, JP)

**Palavras-chave:** Linfócitos T, modulação epigenética, BRD4, Infiltrado Linfocitário Tumoral, células CAR-T, exaustão celular, terapia celular adotiva.

## ABSTRACT

SANTOS, JP. **BRD4 inhibition reduces parameters associated with T cell exhaustion in the context of adoptive cell therapies** São Paulo: Fundação Antônio Prudente, 2025.

T lymphocytes play a crucial role in immune surveillance, identifying and responding to threats, including tumor cells. Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes recognize and eliminate tumor cells through the secretion of inflammatory mediators and cytotoxic molecules, while helper CD4<sup>+</sup> T lymphocytes support and contribute to this process by secreting cytokines that stimulate and regulate the immune response. Due to these crucial characteristics, T cells are used for adoptive cell therapy, in which cells modified and/or expanded *in vitro* are infused into the patient for therapeutic purposes. However, continuous exposure to tumor antigens, as well as the immunosuppressive tumor microenvironment, leads to T lymphocyte exhaustion, driving these cells to progressive loss of functions that ultimately cause the induction of an irreversible dysfunctional state, associated with epigenetic remodeling. Thus, cellular exhaustion has been a critical issue in adoptive cell therapy applied to cancer treatment, preventing the optimal response of both tumor-infiltrating lymphocytes (TIL therapy) and genetically modified CAR-expressing T cells (CAR-T cells). Therefore, epigenome interventions are strategies that can improve the functional characteristics and antitumor activity of T lymphocytes, reducing the limitations of their use in the context of adoptive cell therapy. The aim of this study is to evaluate the modulatory impact of epigenetic inhibition on the phenotype and functionality of human T cells, especially TILs and CAR-T cells, further exploring the potential of identified epigenetic targets in improving these therapeutic approaches. Initially, we assessed the effect of different epigenetic inhibitors on T lymphocytes from healthy donors. T lymphocytes were purified by cell sorting, *in vitro* activated with anti-CD3/CD28, recombinant IFN- $\gamma$  and IL-2, and treated with different inhibitors. After culture, cells were analyzed by flow cytometry. Among three inhibitors tested, the JQ1 inhibitor, which acts on the bromodomain and extra-terminal (BET) proteins, showed the most consistent modulatory effect, leading to increased expression of the activation marker CD69, accompanied by reduced expression of inhibitory receptors such as PD-1 and TIM-3. Thus, we tested the effect of JQ1 inhibition on TILs from clear cell renal carcinoma (CCRC) patients, as well as on *in-house* produced anti-CD19 CAR-T cells. JQ1 inhibition proved efficient in reducing the expression of exhaustion markers in both CCRC TILs and CAR-T cells. After 48h of culture, CCRC TILs treated with JQ1 showed a higher absolute number of live cells, evidencing a greater capacity for cell expansion. The reversal of T lymphocyte exhaustion phenotype after treatment with JQ1 suggest greater antitumor activity, as evidenced by lower tumor burden when JQ1-treated CAR-T cells were cocultured with a B-ALL tumor cell line. Thus, BRD4 inhibition shows the ability to reduce T cell exhaustion markers and could be used as a strategy to rescue T cell exhaustion in adoptive cell therapies (SANTOS, JP)

**Keywords:** T lymphocytes, epigenetic modulation, BRD4, Tumor-Infiltrating Lymphocytes, CAR-T cells, cellular exhaustion, adoptive cell therapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Imunoevasão tumoral. Imagem delineando elementos e fenômenos que ocorrem no microambiente tumoral e que favorecem a formação de um microambiente tumoral imunossupressor.....         | 12 |
| Figura 2 - Esquematisação da estrutura do cromossomo e as modificações epigenéticas nas histonas que regulam a expressão gênica bem como os agentes epigenéticos envolvidos nessa regulação..... | 16 |
| Figura 3 - Estratégia de gating para identificação de subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo. ....                                                                                | 29 |
| Figura 4 - Avaliação da viabilidade celular de linfócitos T CD3+ tratados com inibidores de bromodomínio.....                                                                                    | 30 |
| Figura 5 - Efeito dos inibidores de bromodomínio na expressão do marcador de ativação CD69 em linfócitos T CD4+ e T CD8+.....                                                                    | 31 |
| Figura 6 - Impacto dos inibidores de bromodomínio na distribuição de subpopulações de células T de memória CD4+ e CD8+.....                                                                      | 32 |
| Figura 7 - Efeito dos inibidores epigenéticos na expressão de granzima B (GZMB) em linfócitos T CD4+ e CD8+.....                                                                                 | 34 |
| Figura 8 - Análise da coexpressão de receptores inibitórios em linfócitos T após tratamento com JQ1.....                                                                                         | 36 |
| Figura 9 - Análise de viabilidade celular de linfócitos T estimulados após 14 e 21 dias de tratamento com inibidor epigenético JQ1.....                                                          | 37 |
| Figura 10 - Efeito do inibidor epigenético JQ1 na expressão do marcador de ativação CD69 em linfócitos T. ....                                                                                   | 38 |
| Figura 11 - Efeito do inibidor epigenético JQ1 na expressão de TIM-3, LAG-3 e PD-1 em células T CD4+ e CD8+ em diferentes tempos de cultura. ....                                                | 40 |
| Figura 12 - Efeito modulatório da inibição de BRD4 na expressão de CD69 em TIL de CRCC.....                                                                                                      | 42 |
| Figura 13 - Efeito de JQ1 na expressão de múltiplos receptores inibitórios em TILs de CRCC.....                                                                                                  | 43 |
| Figura 14 - Efeito do inibidor JQ1 na expansão de TILs de pacientes com CRCC.....                                                                                                                | 45 |
| Figura 15 - Efeito modulatório da inibição de BRD4 via JQ1 em células CAR-T.....                                                                                                                 | 46 |

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16 - Modulação da coexpressão de marcadores de exaustão em células CAR-T após tratamento com JQ1.....                                                            | 48 |
| Figura 17 - Avaliação da atividade citotóxica de células CAR-T tratadas com JQ1 contra células leucêmicas Nalm6.....                                                    | 50 |
| Figura 18 - A inibição de BRD4 reduz marcadores associados à exaustão em células CAR-T anti-CD19 e potencializa sua capacidade antitumoral sobre linhagem de LLA-B..... | 52 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACT - Adoptive Cell Therapy (Terapia Celular Adotiva)

BET - Bromodomain and Extra-Terminal

CART - Chimeric Antigen Receptor T cells (Células T com Receptor CAR)

CRCC - Clear Cell Renal Cell Carcinoma (Carcinoma Renal de Células Claras)

CTLA-4 - Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4

GZMB - Granzima B

HAT - Histona Acetiltransferase

ICI - Immune Checkpoint Inhibitors (Inibidores de Checkpoint Imunológico)

IFN- $\gamma$  - Interferon-gama

IL-2 - Interleucina-2

JQ1 - Inibidor de BET

LAG-3 - Lymphocyte Activation Gene 3

MHC - Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

NK - Natural Killer

NCI – Nacional Cancer Institute

PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cells

PD-1 - Programmed Cell Death Protein 1

PD-L1 - Programmed Death-Ligand 1

PRC2 - Polycomb Repressive Complex 2

REP - Rapid Expansion Protocol (Protocolo de Expansão Rápida)

TAMs - Tumor-Associated Macrophages (Macrófagos Associados ao Tumor)

Tcm - T Central Memory (Células T de Memória Central)

TCR - T Cell Receptor (Receptor de Células T)

Tem - T Effector Memory (Células T de Memória Efetora)

Temra - T Effector Memory CD45RA+

TGF- $\beta$  - Transforming Growth Factor Beta

TIGIT - T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains

TIL - Tumor-Infiltrating Lymphocytes (Linfócitos Infiltrantes de Tumor)

TIM-3 - T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain Containing-3

TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor Alpha

Tregs - T Regulatory Cells (Células T Reguladoras)

Tscm - T Stem Cell Memory (Células T de Memória Tronco)

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                     | <b>11</b> |
| <b>1.1 Imunovigilância e câncer .....</b>                                                                                                     | <b>11</b> |
| <b>1.2 Células imunes: alvos estratégicos na imunoterapia oncológica .....</b>                                                                | <b>13</b> |
| <b>1.3 Modulação epigenética de linfócitos T .....</b>                                                                                        | <b>15</b> |
| <b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>                                                                                                                  | <b>20</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                       | <b>21</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral .....</b>                                                                                                               | <b>21</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos.....</b>                                                                                                         | <b>21</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                              | <b>22</b> |
| <b>4.1 Seleção e recrutamento de doadores saudáveis e pacientes oncológicos .....</b>                                                         | <b>22</b> |
| <b>4.2 Obtenção de células T do sangue periférico e ensaio <i>in vitro</i> para seleção de inibidores epigenéticos .....</b>                  | <b>22</b> |
| <b>4.3 Obtenção e ensaios <i>in vitro</i> com TILs .....</b>                                                                                  | <b>24</b> |
| <b>4.4 Obtenção e cultivo de células CAR-T anti-CD19 .....</b>                                                                                | <b>25</b> |
| <b>4.5 Ensaio de citotoxicidade com células CAR-T anti-CD19 e células tumorais de LLA-B.....</b>                                              | <b>26</b> |
| <b>4.6 Ensaio de citometria de fluxo .....</b>                                                                                                | <b>27</b> |
| <b>4.7 Estatística .....</b>                                                                                                                  | <b>29</b> |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>                                                                                                                     | <b>30</b> |
| <b>5.1 Avaliação da capacidade modulatória de inibidores epigenéticos em células T de doadores saudáveis .....</b>                            | <b>30</b> |
| <b>5.2 Inibição de BRD4 via JQ1 reduz a expressão de receptores inibitórios em linfócitos T de doadores saudáveis ao longo do tempo .....</b> | <b>36</b> |
| <b>5.3 Inibição de BRD4 via JQ1 em linfócitos T do microambiente tumoral de CRCC .....</b>                                                    | <b>41</b> |
| <b>5.3.1 JQ1 reduz a expressão de receptores inibitórios em TILs de CRCC .....</b>                                                            | <b>41</b> |
| <b>5.3.2 JQ1 aumenta a capacidade de expansão <i>in vitro</i> dos TILs de CRCC .....</b>                                                      | <b>44</b> |
| <b>5.4 Inibição de BRD4 via JQ1 em células CAR-T anti-CD19.....</b>                                                                           | <b>45</b> |
| <b>5.4.1 JQ1 aumenta expressão do marcador de ativação precoce CD69 em células CAR-T anti-CD19 .....</b>                                      | <b>45</b> |
| <b>5.4.2 JQ1 reduz marcadores associados à exaustão em células CAR-T anti-CD19 .....</b>                                                      | <b>47</b> |

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.4.4 A inibição de BRD4 aumenta o potencial antitumoral <i>in vitro</i> de células CAR-T anti-CD19 .....                                        | 48 |
| 5.4.4 A inibição de BRD4 aumenta o potencial antitumoral <i>in vitro</i> de células CAR-T anti-CD19 de paciente com neoplasia hematológica ..... | 51 |
| 6 DISCUSSÃO.....                                                                                                                                 | 54 |
| 7 CONCLUSÃO .....                                                                                                                                | 60 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                | 61 |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Imunovigilância e câncer

Quando o sistema imunológico se depara com processos celulares potencialmente patogênicos, um processo conhecido por imunovigilância se inicia, por meio do qual o sistema imunológico identifica e elimina células anormais, antes que se estabeleçam como tumores, de fato. Este conceito, proposto originalmente por Paul Ehrlich e mais tarde expandido por Frank Macfarlane Burnet e Lewis Thomas, destaca a importância do sistema imunológico na prevenção do câncer. Nesse contexto, as células T desempenham um papel central nesse processo devido à sua capacidade de reconhecer e destruir células tumorais, além da capacidade de adquirir memória antigênica específica (Zebley *et al*, 2024).

As células T são componentes essenciais da imunidade adaptativa, capazes de reconhecer antígenos específicos por meio de seus receptores de células T (TCR). Os linfócitos T citotóxicos ( $CD8^+$ ) reconhecem e eliminam células tumorais por meio da secreção de mediadores inflamatórios e moléculas citotóxicas, enquanto os linfócitos T auxiliares ( $CD4^+$ ) apoiam e contribuem para esse processo secretando citocinas que estimulam e regulam a resposta imunológica. As células T citotóxicas têm a capacidade de identificar e destruir células que expressam antígenos tumorais apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I). A ativação dessas células se inicia com o reconhecimento de um antígeno específico apresentado por células dendríticas em órgãos linfóides. Uma vez ativadas, essas células proliferam e se diferenciam em células efetoras com capacidade de migração para o local do tumor, onde estabelecem sinapses imunológicas, liberando grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas, que induzem apoptose nas células tumorais, e mediadores inflamatórios, como interferon-gama ( $IFN-\gamma$ ) e  $TNF-\alpha$ . Essas moléculas amplificam a resposta antitumoral e são fundamentais para a polarização de macrófagos para o fenótipo M1. Os macrófagos M1 são considerados pró-inflamatórios e antitumorais, caracterizando-se também pela produção de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de apresentarem maior capacidade de apresentação de antígenos. Esta interação entre células T  $CD8^+$  e macrófagos por meio de mediadores inflamatórios cria um microambiente hostil ao crescimento tumoral, potencializando a resposta imune antitumoral (Zebley *et al*, 2024).

Os linfócitos T  $CD4^+$  também são essenciais na resposta imune antitumoral, desempenhando seu papel principalmente por meio da secreção de citocinas reguladoras. A

produção de IL-2 por estas células é fundamental para a proliferação, sobrevivência e função efetora das células T CD8<sup>+</sup>. Além disso, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> também secretam citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que ativam outras células imunes como macrófagos e células NK, amplificando a resposta antitumoral. Esta regulação mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> cria uma rede de interações celulares que potencializa a eliminação das células tumorais, tornando a resposta imune mais eficiente e duradoura (Garth *et al.*, 2018).

Apesar da eficácia das células T na imunovigilância, os tumores desenvolvem diversas estratégias para evitar o ataque do sistema imunológico. A imunoevasão pode ocorrer por meio da expressão reduzida das moléculas MHC-I em células tumorais, expressão de proteínas inibitórias, como PD-L1, e geração de um microambiente imunossupressor em tumores sólidos. Este ambiente é frequentemente caracterizado pela presença de células T reguladoras (T<sub>regs</sub>), como pode ser observado na **Figura 1**, macrófagos associados ao tumor (TAMs) e citocinas imunossupressoras, como TGF- $\beta$  e IL-10, que inibem a atividade efetora das células T (Garth *et al.*, 2018).

**Figura 1 | Imunoevasão tumoral.**

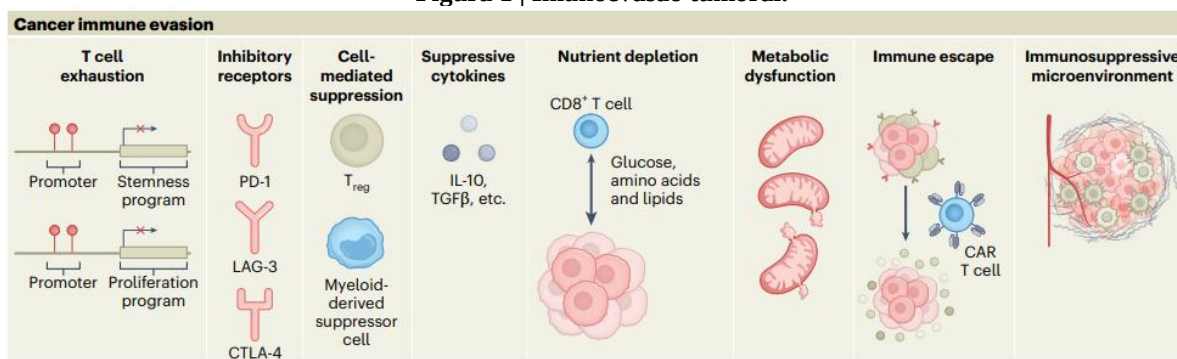


Imagem delineando elementos e fenômenos que ocorrem no microambiente tumoral e que favorecem a formação de um microambiente tumoral imunossupressor. Fonte: Zebley *et al* (2024).

A exaustão das células T é um fenômeno caracterizado pela perda progressiva de função das células T devido tanto à estimulação antigênica crônica como por elementos imunossupressores do próprio microambiente tumoral, conduzindo a perda da funcionalidade celular. Esse estado de disfunção é marcado pelo acúmulo de expressão de *immune checkpoints*, como PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3, associados a baixa capacidade proliferativa, comprometimento da viabilidade *in vitro* e persistência *in vivo*, o que prejudica a eficácia antitumoral das células T utilizadas em terapias adotivas (Blank *et al.*, 2019).

Durante a estimulação antigênica crônica, observa-se uma progressiva perda de células T com potencial de autorrenovação, favorecendo a acumulação de células em estágios avançados de diferenciação que expressam múltiplos receptores inibitórios. O status de

memória das células T influencia diretamente sua suscetibilidade à exaustão celular, com células menos diferenciadas, como células T de memória central ou *stem-cell-like*, demonstrando maior resistência ao esgotamento funcional comparadas às células efetoras terminais ou terminalmente diferenciadas. Na resposta inflamatória aguda, o processo de diferenciação de células T é dinâmico e unidirecional, partindo de células T naíves e passando por células T de memória central ( $T_{cm}$ ), com posterior diferenciação em células T de memória efetora ( $T_{em}$ ) até chegar em um perfil considerado exausto ( $T_{emra}$ ), com diminuição de funções associadas às células T. Para identificar cada um desses fenótipos, é possível acompanhar a expressão de marcadores como CCR7 e CD45RA. O CCR7 é um receptor de quimiocinas que direciona a migração de linfócitos T e células dendríticas para órgãos linfoides secundários, respondendo às quimiocinas CCL19 e CCL21. Já o CD45RA é uma isoforma da proteína tirosina fosfatase CD45, expressa principalmente em células T naíves e células T efetoras terminalmente diferenciadas. A combinação destes marcadores define quatro principais subpopulações de células T: células naíves/stem ( $CCR7^+CD45RA^+$ ) com alto potencial proliferativo e baixa função efetora; células de memória central ( $CCR7^+CD45RA^-$ ) que mantêm capacidade migratória para linfonodos e boa capacidade proliferativa; células de memória efetora ( $CCR7^-CD45RA^-$ ) que migram para tecidos e possuem função efetora imediata; e células TEMRA ( $CCR7^-CD45RA^+$ ) que representam um estado de diferenciação terminal com alta capacidade citotóxica. A expressão diferencial destes marcadores é fundamental para caracterização de populações celulares em estudos imunológicos (Wang *et al*, 2022).

## 1.2 Células imunes: alvos estratégicos na imunoterapia oncológica

Com o objetivo de superar os mecanismos de imunoevasão tumoral, inúmeras estratégias terapêuticas têm sido exploradas. As terapias baseadas na inibição de *immune checkpoints* (ICI), como os inibidores de PD-1/PD-L1 e CTLA-4, têm mostrado sucesso significativo em reduzir a exaustão de células T em pacientes responsivos, no entanto menos de 50% os pacientes respondem satisfatoriamente a essa terapia (Mahmoud *et al*, 2017). Além dos ICI, as terapias celulares adotivas têm sido alternativas que oferecem abordagem personalizada para a utilização das células T contra o câncer, sendo a terapia com CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell*) um dos principais modelos de imunoterapia atualmente (Yang *et al*, 2016).

A terapia celular adotiva (ACT, do inglês "*Adoptive Cell Therapy*") representa uma estratégia promissora no tratamento de tumores sólidos e uma realidade no tratamento de neoplasias hematológicas. Este tipo de terapia envolve a administração de células imunológicas previamente isoladas e manipuladas *in vitro*, com o intuito de se beneficiar da capacidade de identificação e destruição desses linfócitos contra células tumorais de maneira mais eficaz. As modalidades mais estudadas e aplicadas de ACT são as células CAR-T e os TILs (do inglês, *tumor-infiltrating lymphocytes*) (Zhang *et al*, 2023).

Dentro das alternativas de terapias celulares adotivas, a utilização de células T tem ganhado destaque devido à sua capacidade intrínseca de reconhecer e eliminar células tumorais de forma específica. As terapias com células CAR-T envolvem a modificação genética de células T para expressar receptores de antígenos específicos que direcionam essas células contra marcadores tumorais (Cappel *et al*, 2023). Por outro lado, a terapia com TILs se baseia na expansão *in vitro* de células T que já se encontram no microambiente tumoral, aproveitando sua especificidade natural contra o tumor (Zhang *et al*, 2023).

A terapia celular adotiva com linfócitos expressando receptores específicos CAR tem apresentado sucesso em terapias aplicadas a tumores hematológicos, e a terapia envolvendo o uso de TIL foi recentemente aprovada para uso em pacientes com melanoma metastático pelo FDA (NCI, 2024). Apesar do sucesso clínico das terapias com células CAR-T e TILs, existem desafios significativos que limitam sua eficácia e aplicação ampla. Entre os principais desafios estão a exaustão celular, a toxicidade associada ao tratamento e a heterogeneidade tumoral que pode levar à evasão imunológica (Albarrán *et al*. 2024).

A progressão da exaustão celular caracteriza-se pelo desenvolvimento de fenótipos celulares distintos, estabelecidos mediante alterações progressivas no perfil transcricional e epigenético celular. Este processo apresenta diferentes níveis de reversibilidade, correlacionados com o grau de comprometimento molecular estabelecido. A utilização de inibidores de *immune checkpoints* (ICI) demonstra eficácia na reversão de determinados estados de exaustão. Entretanto, em situações em que ocorre comprometimento epigenético, observa-se resistência à terapia com ICI, caracterizando um estado de exaustão terminal (Blanck *et al.*, 2019), sendo necessário, assim, investigar outras ferramentas capazes de superar esse obstáculo.

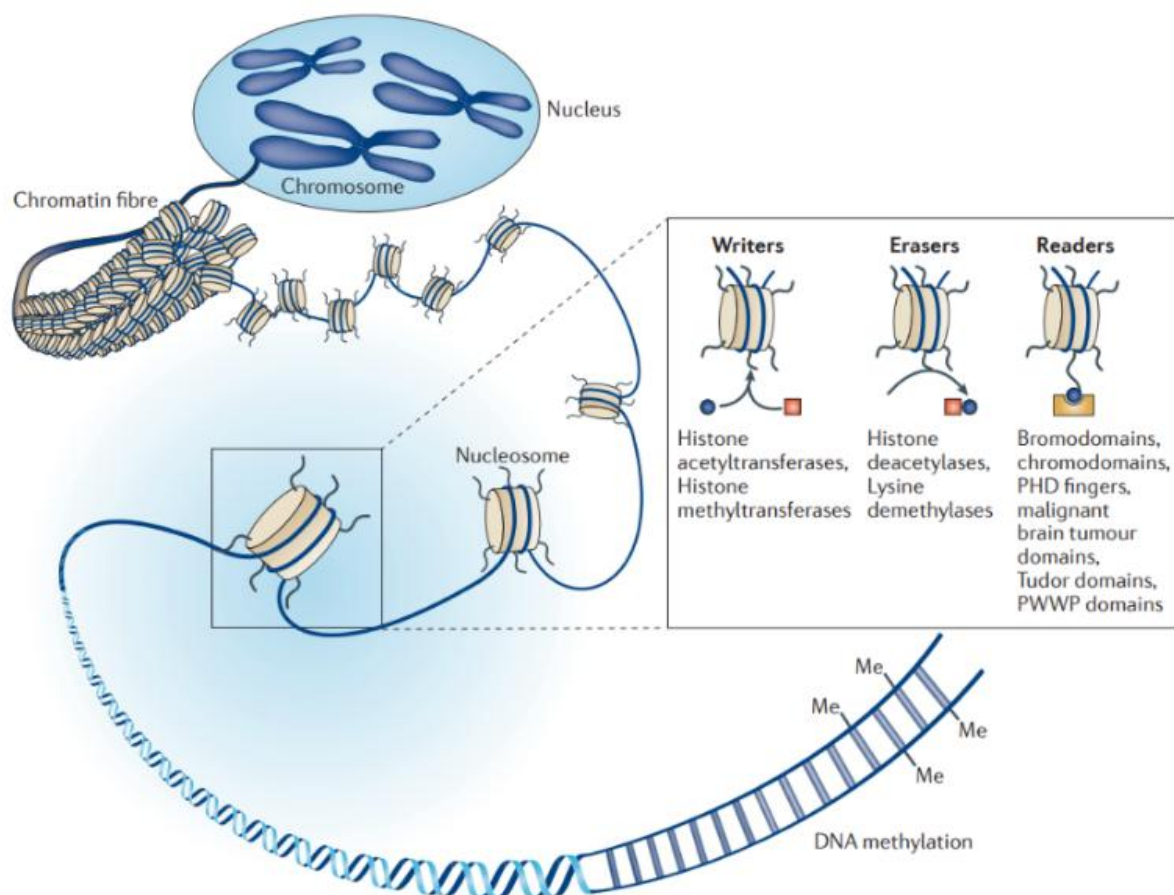
### 1.3 Modulação epigenética de linfócitos T

A modulação epigenética compreende o conjunto de alterações reversíveis e herdáveis na expressão gênica que ocorrem sem modificações na sequência de DNA, incluindo metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e remodelamento da cromatina. Estas modificações estabelecem um código epigenético que regula dinamicamente a acessibilidade e atividade transcricional de regiões genômicas, influenciando diretamente o fenótipo celular, status de diferenciação e funcionalidade das células.

A regulação epigenética em células T representa um mecanismo fundamental no controle da resposta imune adaptativa e desempenha papel crucial no equilíbrio entre ativação e inibição imunológica. Conforme demonstrado por Hogg *et al.* (2020), as células T sofrem extensas modificações epigenéticas durante seu desenvolvimento, diferenciação e ativação, incluindo metilação do DNA, acetilação e metilação de histonas, que coletivamente modelam a estrutura da cromatina e controlam a expressão gênica. Estas modificações são particularmente importantes em células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, nas quais a alteração do estado epigenético pode determinar a capacidade citotóxica, diferenciação de memória ou exaustão, além de influenciar diretamente a produção de citocinas e a expressão de *immune checkpoints* como PD-1 e CTLA-4.

A manipulação terapêutica dos mecanismos epigenéticos em células T emerge como uma abordagem promissora para amplificar respostas imunes antitumorais. As enzimas responsáveis por estabelecer, manter ou remover marcas epigenéticas – "*writers*", "*readers*" e "*erasers*" (**Fig. 2**) – representam alvos farmacológicos importantes, capazes de reprogramar células T para fenótipos clinicamente mais favoráveis (HOGG *et al.*, 2020). Esta plasticidade epigenética pode ser explorada tanto para otimizar imunoterapias existentes quanto para desenvolver novas estratégias terapêuticas, potencialmente superando a resistência a bloqueadores de *immune checkpoints* e melhorando a eficácia de terapias celulares adotivas.

**Figura 2 | Esquematisação da estrutura do cromossomo e as modificações epigenéticas nas histonas que regulam a expressão gênica bem como os agentes epigenéticos envolvidos nessa regulação.**



A cromatina é composta por nucleossomos, unidades formadas por histonas (H2A, H2B, H3, H4) e DNA. As caudas das histonas podem sofrer modificações químicas, como metilação, acetilação e fosforilação que influenciam a disponibilidade da cromatina para transcrição. Na heterocromatina, o DNA é inacessível, impedindo a transcrição gênica, enquanto na eucromatina, o DNA é acessível, permitindo a transcrição. **Fonte:** Arrowsmith *et al.* (2012).

Neste contexto, a modulação epigenética emerge como alternativa terapêutica promissora, visando reverter as alterações epigenéticas estabelecidas durante o processo de exaustão celular. Esta abordagem objetiva restaurar funções celulares cruciais para a resposta antitumoral efetiva, particularmente em células que atingiram estados avançados de exaustão, refratários às terapias convencionais com ICI. Um trabalho anterior do nosso grupo mostrou que alterações epigenéticas em linfócitos T  $CD4^+$  favoreceu a indução de células com perfil pró-inflamatório, que são associadas com um maior controle tumoral (Scheer *et al.*, 2019). Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que a inibição do complexo repressivo Polycomb II (PRC2) utilizando os inibidores epigenéticos A395 ou GSK343 potencializa a ação antitumoral de células CART anti-CD19, induzindo a um perfil de memória mais efetor com aumento da produção de granzima B (Carvalho *et al.*, 2025).

A terapia com células CAR-T emergiu como uma abordagem revolucionária para o tratamento de neoplasias hematológicas refratárias, com resultados clínicos promissores em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) e linfoma não-Hodgkin. Apesar desse sucesso inicial, diversos desafios limitam a eficácia desta terapia, particularmente em tumores sólidos. Um dos principais obstáculos é o fenômeno de exaustão celular, caracterizado pela expressão elevada de receptores inibitórios como PD-1, TIM-3 e LAG-3, associada à redução da capacidade proliferativa, da produção de citocinas e da função efetora das células CAR-T. Adicionalmente, o microambiente tumoral hostil, especialmente em tumores sólidos, contribui para esta disfunção através de múltiplos mecanismos imunossupressores, incluindo a secreção de fatores como TGF- $\beta$ , a presença de células supressoras e a escassez de nutrientes essenciais. Além disso, a baixa capacidade migratória das células CAR-T para o sítio tumoral é recorrentemente observada e um empecilho para a utilização da terapia com células CAR-T em tumores sólidos (Zhong *et al.*, 2022; Reggiani *et al.*, 2024).

Outro desafio crítico é a persistência limitada das células CAR-T *in vivo*, comprometendo a durabilidade da resposta terapêutica e frequentemente levando à recidiva da doença. Embora algumas estratégias como a escolha do domínio co-estimulatório (4-1BB versus CD28) e a composição do produto celular tenham mostrado impacto na persistência, uma fração significativa dos pacientes ainda apresenta respostas de curta duração. Este cenário é especialmente preocupante em pacientes com doença de alto risco ou com carga tumoral elevada, em que a pressão antigênica constante acelera a exaustão das células CAR-T e limita sua capacidade de expansão e manutenção da função antitumoral. Diante dessas limitações, a modulação epigenética surge como uma estratégia promissora para potencializar a eficácia da terapia com células CAR-T.

Estudos recentes demonstram que inibidores de proteínas do complexo repressor polycomb 2 (PRC2), como EZH2 e EED, podem favorecer a diferenciação de células T de memória efetora com fenótipo citotóxico, conferindo maior potencial antitumoral e resistência à exaustão (Carvalho *et al.*, 2025). De forma semelhante, inibidores de bromodomínios e domínio extraterminal (BET) podem reverter o estado de exaustão celular ao suprimir a expressão de receptores inibitórios como PD-1 e TIM-3, aumentando a secreção de citocinas e a atividade citotóxica das células CAR-T contra células tumorais (Zhong *et al.*, 2022).

Enquanto esses e outros trabalhos anteriores (Lam *et al*, 2023; Wang *et al*, 2023; Strachowska *et al*, 2024) já demonstraram que alterações epigenéticas podem favorecer respostas pró-inflamatórias em células T, potencializando a função efetora de células CAR-T, ainda há uma lacuna significativa na literatura quanto à aplicação dessas estratégias em TILs. Esta limitação é particularmente interessante considerando que os TILs, assim como outras células T, são suscetíveis à regulação epigenética e são reconhecidos por apresentarem disfunções que poderiam potencialmente ser revertidas por meio da modulação epigenética.

Assim, estudos direcionados nesse sentido poderiam trazer novas abordagens para potencialização da eficácia terapêutica dos TILs, especialmente em contextos nos quais sua função se encontra comprometida pelo microambiente tumoral. Dessa forma, alguns alvos de inibidores epigenéticos têm mostrado potencial para modulação de fenótipos de células imunes, como proteínas da família dos bromodomínios e o complexo CBP/p300 (Wang *et al*, 2023; Strachowska *et al*, 2024).

A JQ1, um inibidor seletivo da família de proteínas BET (*Bromodomain and Extra-Terminal*), apresenta particular afinidade por BRD4, atuando através de um mecanismo competitivo ao ligar-se ao domínio bromodomínio, consequentemente impedindo seu reconhecimento de resíduos de lisina acetilados em histonas e outros substratos proteicos. Nos estudos avaliando a inibição de BRD4 por JQ1, observaram-se múltiplas modulações celulares associadas a alterações epigenéticas significativas, como redução da atividade enhancer/super-enhancer, diminuição do recrutamento de P-TEFb e modificações na acessibilidade da cromatina. No contexto transcricional, observa-se supressão de genes dependentes de BRD4, como c-MYC, e alteração em programas transcricionais associados à diferenciação e proliferação. Os efeitos imunológicos incluem redução de citocinas pró-inflamatórias, modulação da diferenciação de células T e potencial redução de marcadores de exaustão. Adicionalmente, impactos metabólicos significativos foram observados, incluindo alterações no metabolismo celular, redução da glicólise e modificação na bioenergética celular (Wang *et al*, 2023).

O UNC-0642, um inibidor seletivo das metiltransferases G9a/GLP, atua através da inibição competitiva do sítio catalítico destas enzimas, interferindo especificamente com a deposição da marca repressiva H3K9me2. Esta intervenção epigenética resulta principalmente na redução global dos níveis de H3K9me2, modificação associada à regulação da estrutura da cromatina e silenciamento gênico. A inibição de G9a/GLP pelo UNC0642

promove reativação de genes previamente silenciados e modifica programas transcricionais associados à diferenciação celular. No contexto imunológico, observa-se modulação no perfil de produção de citocinas e de serino-proteases citotóxicas como a granzima B (Lam *et al*, 2023).

O ICBP112, por sua vez, é um inibidor seletivo das acetiltransferases CBP/p300 que atua interferindo na atividade catalítica destas importantes enzimas reguladoras epigenéticas, que normalmente acetilam histonas e proteínas não-histonas. A inibição de CBP/p300 por ICBP112 resulta em alterações significativas no perfil de acetilação global, afetando principalmente as marcas H3K27ac e H3K18ac, cruciais para regulação transcricional e atividade *enhancer*. No contexto molecular, esta inibição pode impactar múltiplas vias de sinalização, uma vez que CBP/p300 são coativadores transcricionais que interagem com diversos fatores de transcrição, incluindo STAT, NF- $\kappa$ B e fatores nucleares específicos de linhagem (Picavet *et al.*, 2024, Strachowska *et al*, 2024).

Ao intervir nos processos que controlam a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA, podemos potencialmente aumentar a persistência das células T modificadas no organismo do paciente, preservar o estado de memória imunológica, essencial para respostas sustentadas, reverter estados de exaustão que prejudicam a atividade citotóxica, melhorar a capacidade de infiltração tumoral e a resposta a antígenos tumorais, e reduzir a sensibilidade aos sinais imunossupressores do microambiente tumoral.

## 2 JUSTIFICATIVA

A terapia celular baseada em células T, como as terapias CAR-T e TIL, representa um marco revolucionário no tratamento oncológico, oferecendo respostas clínicas promissoras em neoplasias hematológicas e, mais recentemente, em tumores sólidos. Contudo, apesar dos avanços significativos, observa-se frequentemente um processo de perda progressiva da funcionalidade celular, denominado exaustão de células T, que limita a eficácia dessas abordagens terapêuticas.

A disfunção das células T cronicamente expostas a antígenos está intrinsecamente associada a um comprometimento epigenético. Estas modificações, que incluem metilação de DNA, modificações de histonas e remodelamento da cromatina, não apenas definem o estado de exaustão, mas também conferem estabilidade a este fenótipo, tornando-o particularmente resistente a intervenções baseadas unicamente em bloqueio de checkpoint imunológico (ICI). Evidências recentes demonstram que a reprogramação epigenética pode reverter estados terminalmente diferenciados, restaurando a funcionalidade efetora e a capacidade proliferativa das células T.

Este trabalho justifica-se pela necessidade premente de superar as limitações atuais das terapias celulares por meio da modulação direcionada de mecanismos epigenéticos que regulam a funcionalidade das células T.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a ação de inibidores epigenéticos sobre o fenótipo e a funcionalidade de células T humanas saudáveis e de TILs, bem como em células T geneticamente modificadas expressando CAR (CAR-T), a fim de explorar o potencial dos alvos epigenéticos identificados no aperfeiçoamento da terapia celular adotiva.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Testar o potencial modulatório de diferentes inibidores epigenéticos (JQ1 – inibidor de BET; ICBP112 – inibidor de CBP/p300; e UNC0642 – inibidor de G9a/GLP) sobre a funcionalidade de células T do sangue periférico de indivíduos saudáveis;
- Avaliar marcadores de ativação, exaustão e fenótipos de memória das células T ativadas na presença ou ausência de tais inibidores e selecionar aquele com maior potencial modulatório;
- Investigar a influência do inibidor selecionado sobre o fenótipo de TILs, bem como de células CAR-T.
- Comparar, por meio de ensaios de funcionalidade, a capacidade antitumoral das células T tratadas com o inibidor selecionado em relação às células não tratadas.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Seleção e recrutamento de doadores saudáveis e pacientes oncológicos**

Este projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antônio Prudente sob o protocolo 2710/19. Para a padronização dos experimentos e avaliação inicial, foram recrutados indivíduos de ambos os sexos, com faixa etária entre 20-30 anos, saudáveis e sem histórico de infecções ou outras doenças inflamatórias recentes ou quaisquer outras complicações que possam interferir em nossa análise. Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue de cada doador em tubo contendo EDTA, e as amostras foram imediatamente processadas para a realização dos experimentos.

Os experimentos nos quais foram utilizadas células CAR-T advindas dos produtos de infusão de pacientes com LLA-B (Leucemia Linfoblástica Aguda de células B) tratados no A.C Camargo Cancer Center estão amparados pelo projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da instituição sob o protocolo 3335/22.

Os experimentos envolvendo células T de microambiente tumoral de Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC) estão amparados pelo projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do A.C Camargo Cancer Center sob o protocolo 3223/22. Foram admitidos pacientes diagnosticados com CRCC, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, virgens de tratamento para quimioterapia ou imunoterapia, imunocompetentes e que não faziam uso de anti-inflamatórios ou qualquer tratamento que implique em alteração da resposta imune.

Participantes envolvidos no presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando a coleta e utilização das amostras biológicas utilizadas nas metodologias empregadas.

### **4.2 Obtenção de células T do sangue periférico e ensaio *in vitro* para seleção de inibidores epigenéticos**

O isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi realizado por meio de separação por densidade em gradiente de centrifugação utilizando Ficoll-Paque (Cytiva). O sangue total foi inicialmente diluído em tampão PBS na proporção 1:1 (v/v) e cuidadosamente estratificado sobre o Ficoll-Paque em tubos cônicos de 50 mL, na proporção de 2:1 (sangue diluído:Ficoll). Os tubos foram então centrifugados a 2200rpm por 25 minutos a temperatura ambiente, com aceleração mínima e sem freio. Após a centrifugação, a camada de PBMC (anel na interface entre o plasma e o Ficoll) foi coletada cuidadosamente com

auxílio de micropipeta e transferida para um novo tubo cônico de 50mL. As células foram submetidas à lavagem com PBS, sendo ressuspensas e centrifugadas a 400g por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* celular foi ressuspensão em 1 mL de PBS para contagem e avaliação de viabilidade celular em câmara de Neubauer utilizando azul de Trypan. A partir do PBMC isolado, as células T CD3<sup>+</sup> foram obtidas por meio de *sorting* celular. Para isso, as PBMC ( $10\text{--}20 \times 10^6$ ) foram ressuspensas em 100μL de tampão de *sorting* (PBS + 10% SFB), incubadas com o painel de anticorpos utilizado para o *sorting* por 30 minutos a 4°C, protegidas da luz. Após incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS 1x diluído e centrifugadas a 400g por 10 minutos à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensão em 3mL de tampão de *sorting* e as células foram isoladas no aparelho BD Aria Fusion.

Após a obtenção dos linfócitos T, as células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo U, na concentração de cento e cinquenta mil células por poço, em um volume final de 200 μL. Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI (ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) e 1% de penicilina + estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram estimuladas com coquetel contendo Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies) na proporção de 3:1 (célula:bead), previamente lavadas com PBS e separadas por coluna magnética. Além das Dynabeads, o coquetel de estímulo continha IL-2 [20ng/mL] (BioLegend) e IFN-γ [20ng/mL] recombinantes (BioLegend), além de diferentes inibidores epigenéticos ou veículo controle.

Os inibidores epigenéticos testados foram: JQ1 (inibidor de bromodomínios BET), ICBP112 (inibidor de bromodomínio CBP/p300) e UNC0642 (inibidor de G9a/GLP), adicionados na concentração de 1μM, 3μM e 1μM, respectivamente, seguindo a faixa do IC50-IC90 fornecidas pelo fabricante (SGC - Structural Genomics Consortium). As soluções-estoque dos inibidores foram preparadas em DMSO a 10 mM e diluídas em meio de cultura imediatamente antes do uso, mantendo a concentração final de DMSO inferior a 0,1%. No grupo controle, adicionou-se volume equivalente de DMSO. As células foram então mantidas em cultura a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 3-4 dias, metade do meio de cultura foi substituída por meio fresco contendo as mesmas concentrações de IL-2, IFN-γ e inibidores.

Após o período de incubação de 5, 14 ou 21 dias, a depender dos *timepoints* que foram utilizados em cada experimento, as células foram coletadas, centrifugadas a 400 g por

10 minutos a 20°C, lavadas uma vez com PBS, e submetidas à marcação para análise por citometria de fluxo.

#### 4.3 Obtenção e ensaios *in vitro* com TILs

Uma vez identificado o BRD4 como alvo epigenético com potencial para potencializar a ação antitumoral de células T, o seu inibidor, JQ1, foi utilizado para ensaios com células T oriundas do microambiente tumoral de pacientes com CRCC. Peças cirúrgicas da região do tumor foram coletadas imediatamente após a excisão cirúrgica e transportadas em RPMI 1640 (Sigma Aldrich) suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma Aldrich), em gelo. Os tecidos foram imediatamente processados por dissociação mecânica com auxílio de bisturi, seguida de digestão enzimática com a combinação de 200U/mL de collagenase I (Gibco), 200U/mL de collagenase IV (Gibco) e 250U/mL de Benzonase (Sigma Aldrich) por 45 minutos a 37 °C. O produto da digestão foi filtrado em *cell-strainer* para obtenção final da suspensão de células únicas. A suspensão celular foi congelada em solução de congelamento contendo 90% de SFB e 10% de DMSO e então armazenada em nitrogênio líquido. Para a realização dos ensaios, essas amostras foram descongeladas e submetidas ao *sorting* celular, utilizando o citômetro BD Aria Fusion, para a obtenção das células T CD3<sup>+</sup>.

Para o isolamento de células T por *sorting*, implementamos uma estratégia de *gating* sequencial utilizando o painel composto por Sytox Green, CD8-PE, CD3-APC e CD56-PE-Cy7. Inicialmente, selecionamos a população de *singlets* através dos parâmetros FSC-A versus FSC-H, seguido pela delimitação da região de linfócitos no gráfico FSC-A versus SSC-A. A viabilidade celular foi determinada pela exclusão das células Sytox Green positivas. A partir da população de células viáveis, identificamos os linfócitos T pela expressão de CD3 (CD3<sup>+</sup>), excluindo células CD56<sup>+</sup> para eliminar células NK. Finalmente, subdividimos a população de células T em CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>, permitindo o *sorting* seletivo de linfócitos T CD3<sup>+</sup> com alta pureza para os experimentos subsequentes.

Após a obtenção de linfócitos T, as células foram cultivadas em placas de fundo U, na concentração de setenta mil células por poço, em um volume final de 200µL. Os linfócitos foram cultivados em meio específico para TIL, composto por RPMI contendo piruvato de sódio 1mM (Sigma Aldrich) aminoácidos não essenciais (Sigma Aldrich), Glutamax 2mM

(Gibco), HEPES 10mM (Merck), 2-mercaptoetanol 55uM (Merck) e 10% de soro humano (Merck).

As células foram estimuladas com coquetel contendo Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies) na proporção de 5:1 (célula:bead), IL-2 recombinante [40ng/mL] (BioLegend), na presença ou não de JQ1 a 1uM. As células foram então mantidas em cultura a 37°C e, após o período de incubação de 24 ou 48 horas, foram coletadas para posterior análise por citometria de fluxo.

#### 4.4 Obtenção e cultivo de células CAR-T anti-CD19

Ao evidenciarmos o efeito modulatório da inibição de BRD4 via JQ1 em linfócitos T de doadores saudáveis, avançamos para ensaios funcionais com células CAR-T. A obtenção dessas células se deu de duas formas: (I) derivadas de produtos de infusão de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e Linfoma Não-Hodgkin tratados no AC Camargo Cancer Center e (II) produção *in house*.

O material derivado de pacientes consistiu em bolsas pós-infusão que seriam descartadas, das quais as células remanescentes foram recuperadas por lavagem minuciosa com 50 mL de PBS-1x estéril, seguida de centrifugação a 400 g por 10 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* celular foi ressuspenso em 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina. Estas células permaneceram em repouso em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h antes dos experimentos.

Para a produção *in house*, inicialmente realizamos o isolamento de PBMCs por meio de gradiente de densidade com o meio Ficoll-Paque PLUS (Cytiva), como descrito anteriormente. Resumidamente, 5-20×10<sup>6</sup> PBMC foram ressuspensas em 500 µL de tampão EasySep (PBS + 2% SFB + 1mM EDTA) em tubo de poliestireno de 5 mL. Foram adicionados 50 µL de coquetel de anticorpos de isolamento, com posterior incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 50 µL de partículas magnéticas, homogeneizados e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. O volume foi completado para 2,5mL com tampão EasySep, e o tubo foi colocado no magneto EasySep por 5 minutos. A fração contendo as células T CD3<sup>+</sup> foi coletada em um novo tubo por inversão. As células T isoladas foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos à temperatura ambiente e ressuspensas em meio de cultura para contagem e avaliação de viabilidade.

As células CAR-T foram produzidas utilizando o sistema de transposon "*Sleeping Beauty*". As células T CD3<sup>+</sup> isoladas foram lavadas duas vezes com tampão de eletroporação (Opti-MEM sem fenol vermelho), centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 20°C e ressuspensas em 100 µL de tampão 1SM, com 10 µg do plasmídeo PT3-19BBz e 1 µg do plasmídeo SB100X, e então transferidas para uma cubeta de 0,2 cm (Lonza). As células T foram então eletroporadas usando o sistema de eletroporação Lonza Nucleofector I e imediatamente transferidas para placa de 6 poços contendo 2 mL de meio RPMI (ThermoFisher Scientific) pré-aquecido a 37°C, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco), sem antibiótico. As células foram deixadas em repouso a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h antes dos experimentos, permitindo a recuperação da integridade da membrana celular e expressão inicial do receptor CAR. Após obtenção e repouso, tanto as células CAR-T derivadas de pacientes quanto as produzidas *in house* foram contadas, avaliadas quanto à viabilidade por exclusão com azul de Trypan e ajustadas para a concentração de 1×10<sup>6</sup> células viáveis/mL.

As células foram então submetidas a estímulo com Dynabeads anti-CD3/CD28 (previamente lavadas três vezes com PBS mediante separação magnética) em uma proporção de 3 células para cada *bead*, na presença de IL-2 recombinante (20 ng/mL). Após 3 dias, as células foram ou não tratadas com JQ1 a 1µM. As células foram cultivadas em placas de 6 poços, com 3mL de suspensão celular por poço, a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 2-3 dias, as células foram contadas, a viabilidade avaliada, e o meio substituído parcialmente (50%) por meio fresco contendo as mesmas concentrações de IL-2. Após 7, 14 e 21 dias de cultura, as células foram coletadas, centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 20°C, lavadas uma vez com PBS (400 g, 10 minutos, 20°C) e processadas para análise fenotípica por citometria de fluxo.

#### **4.5 Ensaio de citotoxicidade com células CAR-T anti-CD19 e células tumorais de LLA-B**

A fim de avaliar se o efeito do inibidor JQ1 potencializa a capacidade citotóxica das células CAR-T tratadas, utilizamos células CAR-T anti-CD19 obtidas de produtos de infusão de pacientes tratados no A.C. Camargo Cancer Center ou produzidas *in house*. Estas células foram cultivadas com estímulo policlonal (Gibco Dynabeads anti-CD3/CD28) na proporção de 1:3 (célula:bead), suplementadas com IL-2 recombinante, na presença ou ausência do inibidor epigenético JQ1. Após 7 dias de cultura, realizamos contagem celular em câmara de Neubauer e coletamos uma alíquota para análise por citometria de fluxo dos seguintes

marcadores: viabilidade (BV570 - BD Horizon) e CAR (AF647 - CytoArt). A partir da contagem total e da frequência de células CAR<sup>+</sup>, calculamos o número de células a serem plaqueadas para cada condição, normalizando de modo que todas as condições recebessem o mesmo número absoluto de células CAR<sup>+</sup>.

Como células-alvo, utilizamos a linhagem NALM6/GFP-Luciferase, mantida em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. No dia do ensaio de co-cultura, estas células foram lavadas, contadas e plaqueadas em placa de 96 poços de fundo U, na concentração de 100.000 células/poço. As células efetoras (CAR-T) foram então adicionadas em proporções efetora:alvo de 1:5, nos experimentos utilizando células CAR-T de paciente ou 1:5 e 1:10 nos experimentos com células CAR-T produzidas *in house*, em volume final de 200µL por poço.

As co-culturas foram incubadas a 37°C por períodos de 7 dias, nos experimentos utilizando células CAR-T de paciente ou 3 e 7 dias nos experimentos com células CAR-T produzidas *in house*. Em seguida, as células foram coletadas e marcadas com marcador de viabilidade DRAQ7 (Thermo Fisher Scientific, #D15106) para análise por citometria de fluxo. A citotoxicidade foi avaliada pela quantificação da morte de células GFP<sup>+</sup>Draq7<sup>+</sup>, representativas da população-alvo.

#### 4.6 Ensaios de citometria de fluxo

Para análise fenotípica das células por citometria de fluxo, as amostras foram processadas seguindo protocolo padronizado de marcação celular. Inicialmente, após cultura, as células foram coletadas em tubos eppendorf de 1,5mL por movimentos de ressuspensão *up and down* com pipeta automática. Para amostras contendo *beads* magnéticas de estímulo anti-CD28 e anti-CD3, os tubos foram posicionados em coluna magnética por aproximadamente 1 minuto, permitindo a separação e eliminação das *beads*.

Para a marcação de viabilidade celular, as células foram ressuspensas em 100µL de corante *Fixable Viability Stain 575V* (BD Horizon) (diluído 1000x em PBS) e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após a incubação, adicionou-se 1mL de PBS para lavagem, seguido de centrifugação (400g, 10 minutos, temperatura ambiente) e descarte do sobrenadante.

No experimento de avaliação do efeito do inibidor de BRD4 (JQ1) em células T, a marcação extracelular foi realizada com um painel de anticorpos monoclonais composto por:

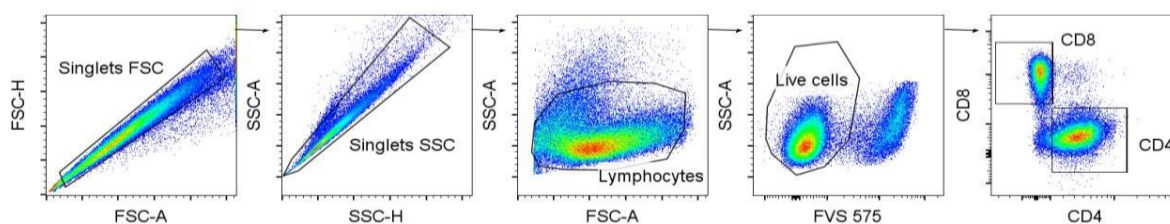
anti-CD4 conjugado com BV650, anti-CD8 conjugado com BB515, anti-CD69 conjugado com BUV805, anti-TIGIT conjugado com APC, anti-PD-1 conjugado com BV605, anti-LAG-3 conjugado com APC-R700, anti-TIM-3 (CD366) conjugado com PE, e anti-CTLA-4 conjugado com BV421. Este protocolo e painel multiparamétrico de anticorpos foi também empregado para a caracterização de células CAR-T (complementado com anticorpo anti-CAR) e dos TILs isolados de amostras de CRCC.

Após a marcação extracelular, as células foram lavadas com 1mL de PBS, centrifugadas (400g, 10 minutos, temperatura ambiente) e o sobrenadante descartado. Para o experimento de avaliação do efeito de inibidores epigenéticos, utilizou-se também um painel intracelular composto por anticorpos anti-granzima B conjugado com BV510 e anti-CD3 conjugado com PerCP. Nesta etapa da marcação, após a lavagem com PBS, adicionaram-se às amostras 250µL de solução de fixação e permeabilização BD *Cytofix/Cytoperm*, seguindo-se incubação por 20 minutos, a 4°C, protegidas da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com BD Perm/Wash diluído 10 vezes em água destilada e centrifugadas a 400g, por 10 minutos, a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas e incubadas com os anticorpos por 30 minutos adicionais, mantidas a 4°C e protegidas da luz. Ao término da incubação, procedeu-se nova lavagem com solução de Perm/Wash, e o pellet celular foi ressuspendido em PBS para análise subsequente.

Em marcações em que não foi utilizada a solução de fixação e permeabilização, as amostras foram ressuspensas em 200µL de solução fixadora (PBS contendo 2% de paraformaldeído). As amostras foram mantidas a 4°C, protegidas da luz, até o momento da aquisição no citômetro de fluxo.

A estratégia de *gating* para identificação das populações de linfócitos T seguiu uma sequência de análise a fim de eliminar *doublets* e células mortas, e garantir que apenas células T viáveis fossem incluídas nas análises. Primeiramente foram selecionados os eventos únicos (*singlets*) através dos parâmetros FSC-H versus FSC-A, seguido por *singlets* no SSC-H versus SSC-A. A população de linfócitos foi então identificada pelo *gate* em SSC-A versus FSC-A, baseando-se nas características de tamanho e complexidade celular. Células viáveis foram selecionadas por meio da exclusão das células positivas para o marcador de viabilidade. A partir da população de células viáveis, foram identificadas as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> através da expressão destes marcadores de superfície (**Fig. 3**).

**Figura 3 | Estratégia de *gating* para identificação de subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo**



**(A)** Seleção de eventos únicos (*singlets*) através da análise de FSC-H versus FSC-A, eliminando *doublets* celulares; definição da população de interesse baseada nas características de tamanho e complexidade (SSC-A versus SSC-H); identificação da população de linfócitos com base nos parâmetros FSC-A e SSC-A; seleção de células viáveis através da exclusão de células positivas para o marcador de viabilidade FVS 575; caracterização das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> baseada na expressão diferencial destes marcadores de superfície. **Fonte:** Autoria própria.

Nos experimentos com células CAR-T anti-CD19, após a seleção das células viáveis, a análise foi direcionada especificamente para a população CAR-positiva (identificada por marcação com anticorpo anti-CAR conjugado com AF647. Dentro desta população parental CAR<sup>+</sup>, foram discriminadas as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> para a caracterização fenotípica. Em cada subpopulação, avaliou-se a expressão de marcadores funcionais e de exaustão celular, incluindo CD69, PD-1, LAG-3, TIM-3 e CTLA-4.

Para o experimento de avaliação da capacidade de expansão dos TILs, células foram marcadas com o marcador *Fixable Viability Stain 575V* (BD Horizon) diluído 1000x em PBS, por 10 minutos, em temperatura ambiente, para exclusão de células mortas, e a quantificação celular foi determinada utilizando *BD™ Liquid Counting Beads*, por citometria de fluxo, como referência para a análise quantitativa absoluta das células viáveis em cada condição experimental.

#### 4.7 Estatística

Os dados obtidos a partir de citometria de fluxo foram avaliados utilizando o software FlowJo, versão 10, e representados em gráficos utilizando-se o GraphPad Prism 8.4.3. Foi utilizado o teste t de *Student* pareado para comparações entre condições tratadas com o inibidor epigenético e seu respectivo controle. Para todos os experimentos, um valor de *p* abaixo de 5% (*p* < 0.05) foi considerado significativo.

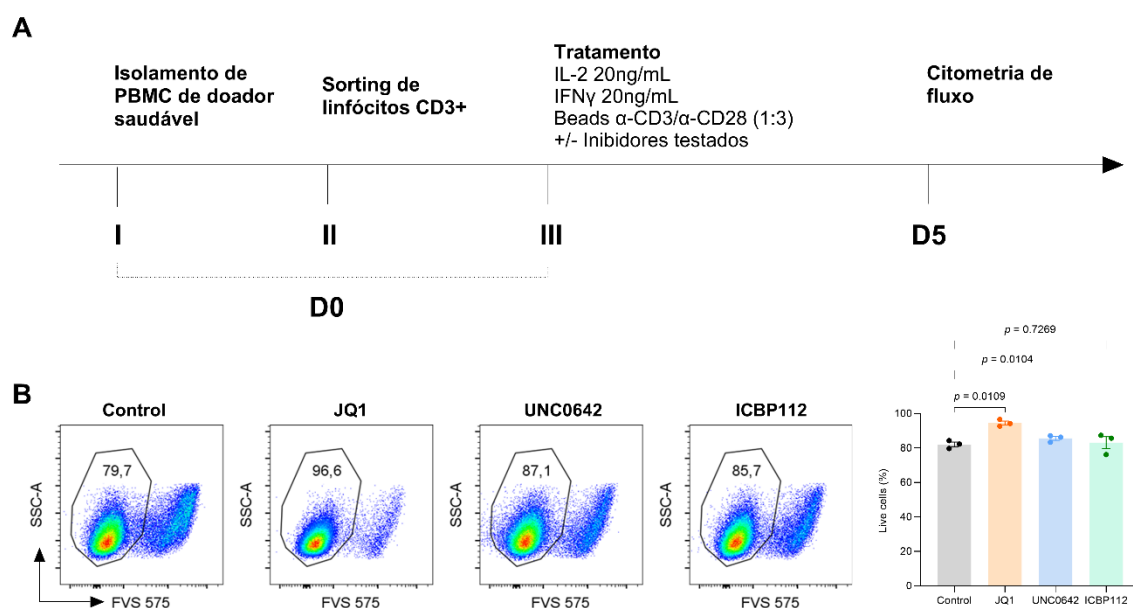
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da capacidade modulatória de inibidores epigenéticos em células T de doadores saudáveis

Buscando selecionar o inibidor epigenético com o melhor potencial modulador da funcionalidade de células T, foi feita uma triagem com diferentes inibidores epigenéticos selecionados a partir de informações consistentes na literatura. A concentração utilizada de cada inibidor foi determinada com base nesses registros. Dessa forma, os inibidores selecionados foram testados em linfócitos T do sangue periférico de doadores saudáveis durante 5 dias de cultura sob estímulo policlonal (**Fig 4A**). Para este estudo, foram selecionados três diferentes inibidores, JQ1, UNC-0642 e ICBP112, com base nos seus efeitos registrados na literatura (Zhong *et al.* 2022; Lam *et al.*, 2023).

As condições tratadas foram identificadas de acordo com o inibidor utilizado (JQ1, UNC0642 ou ICBP112) e comparadas à condição não tratada (controle, contendo apenas o solvente DMSO). Ao comparar o impacto dos inibidores epigenéticos na viabilidade das células T ativadas com estímulo policlonal, observou-se que o tratamento com JQ1 resultou em um aumento na viabilidade celular em relação à condição não tratada (**Fig. 4B**).

**Figura 4 | Avaliação da viabilidade celular de linfócitos T CD3+ tratados com inibidores de bromodomínio.**

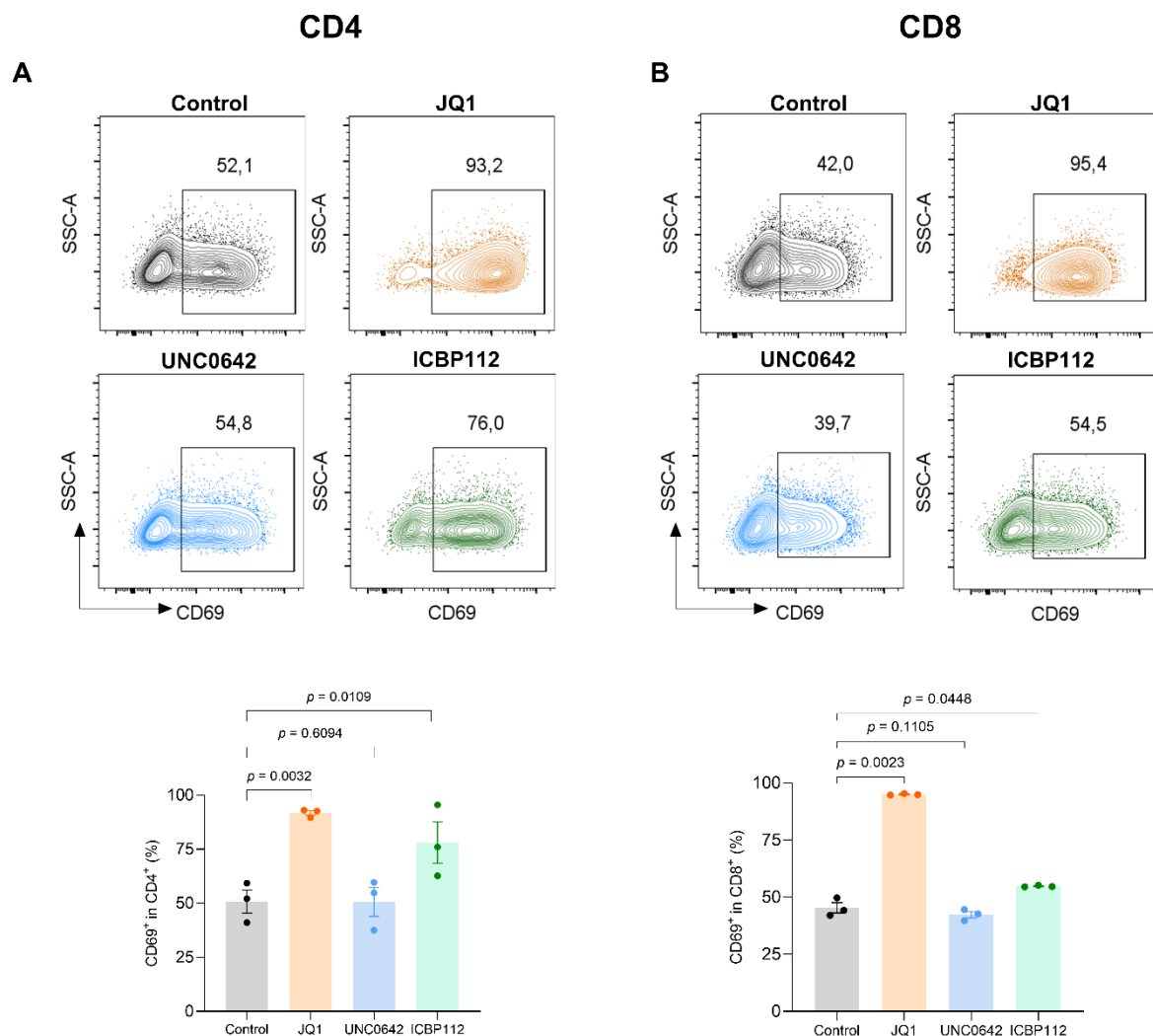


(A) Desenho experimental: isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), *sorting* de células T CD3+ e tratamento com diferentes inibidores (JQ1, UNC0642, ICBP 112) ou controle por 5 dias em condições controladas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). (B) *Dot plots* representativos da análise por citometria de fluxo mostrando a viabilidade celular após os tratamentos, com os percentuais de células viáveis indicados em cada

condição. Quantificação da viabilidade celular nos diferentes grupos experimentais, com valores de significância estatística ( $p$ ) indicados entre os grupos comparados. **Fonte:** Autoria própria.

Outro importante parâmetro analisado em nossos ensaios iniciais foi o impacto dos diferentes inibidores utilizados sobre o *status* de ativação celular. A ativação celular pode ser evidenciada em células T pela expressão de diversas proteínas nas suas membranas, como o CD69. Os nossos dados apontam que a inibição de BET, via JQ1 e via ICBP 112, induziu uma maior frequência de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando CD69 quando comparada com a condição não tratada, enquanto a inibição de G9a/GLP via UNC0642 não mostrou potencial modulatório sobre a frequência de células T CD69<sup>+</sup> (**Fig. 5A e B**).

**Figura 5 | Efeito dos inibidores de bromodomínio na expressão do marcador de ativação CD69 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.**

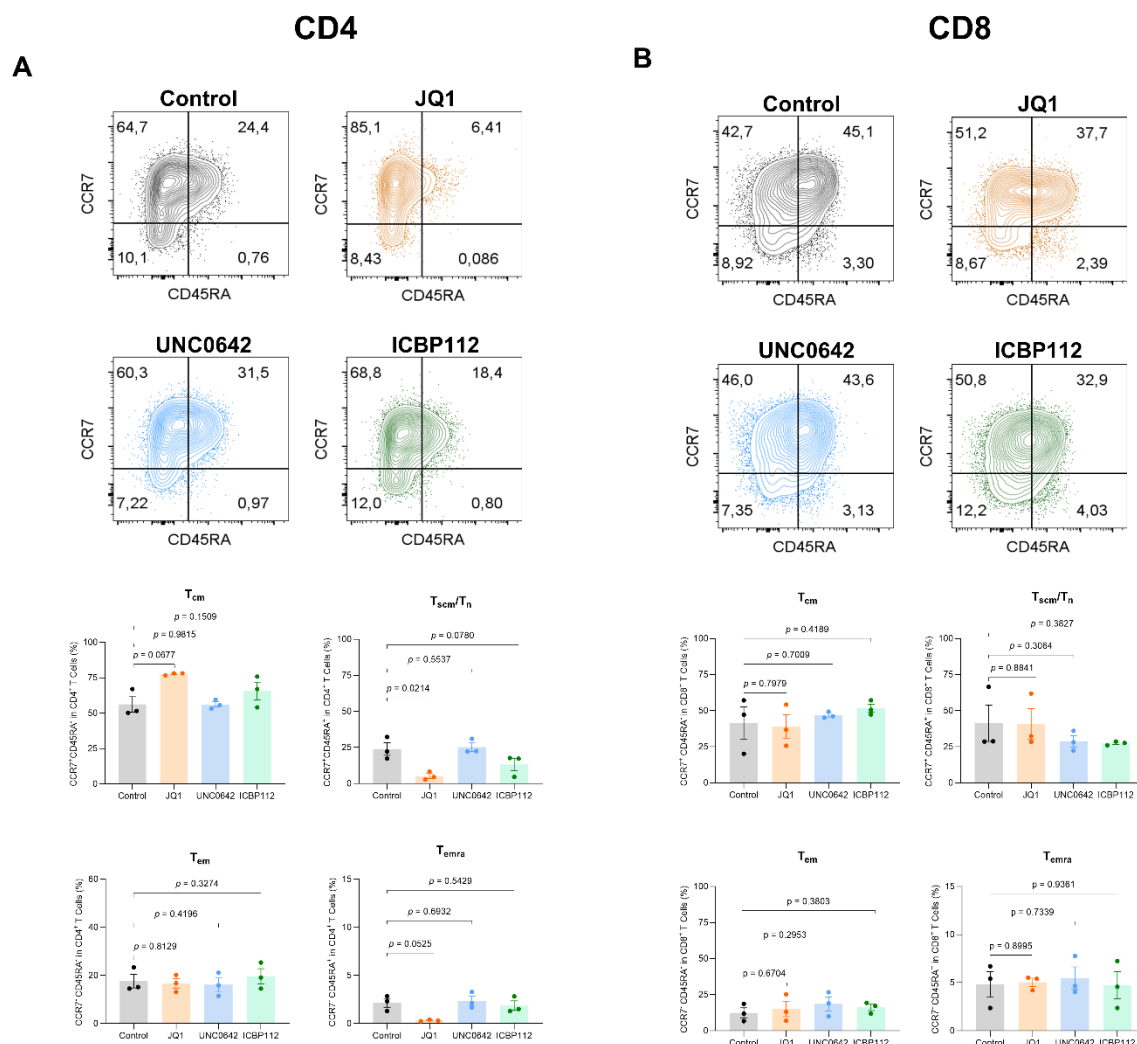


Análise por citometria de fluxo da expressão de CD69 em células T CD4<sup>+</sup> (**A**) e em células T CD8<sup>+</sup> (**B**) após tratamento com diferentes inibidores (JQ1, UNC0642, ICBP112) ou veículo (controle). Os painéis superiores mostram *dot plots* representativos da expressão de CD69 (SSC-A versus CD69) para cada condição experimental, com os percentuais de células T CD69<sup>+</sup> indicados. Os gráficos inferiores apresentam a

quantificação do percentual de células CD69<sup>+</sup> em cada subpopulação de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> à esquerda e CD8<sup>+</sup> à direita) os valores de significância estatística (p) indicados entre os grupos comparados. **Fonte:** Autoria própria.

Ao analisarmos o processo de diferenciação celular, foi observado o aumento da frequência de células T CD4<sup>+</sup> de memória central (T<sub>cm</sub>) nas condições tratadas com JQ1, simultaneamente associada à redução da frequência de células terminalmente diferenciadas (T<sub>emra</sub>) (**Fig. 6A**). Nenhum inibidor epigenético testado causou alterações significativas nas frequências das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> de memória (**Fig. 6B**).

**Figura 6 | Impacto dos inibidores de bromodomínio na distribuição de subpopulações de células T de memória CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.**



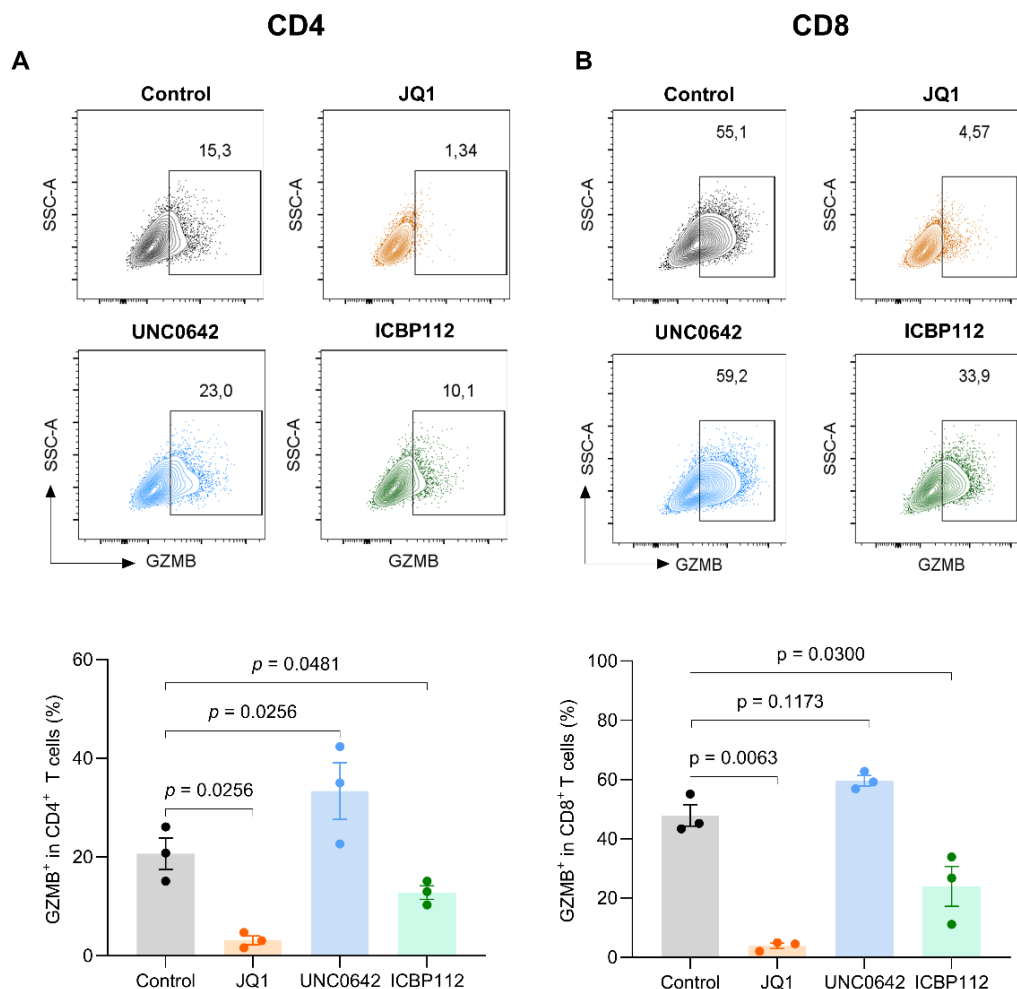
Análise por citometria de fluxo das subpopulações de células T de memória em **(A)** linfócitos T CD4<sup>+</sup> e **(B)** linfócitos T CD8<sup>+</sup> após tratamento com diferentes inibidores (JQ1, UNC0642, ICBP112) ou veículo (controle). Os painéis superiores mostram *dot plots* representativos da expressão de CCR7 versus CD45RA para identificação das subpopulações: células T de memória central/naive (T<sub>scm/n</sub>: CCR7+CD45RA<sup>+</sup>), células T de memória central (T<sub>cm</sub>: CCR7+CD45RA<sup>-</sup>), células T de memória efetora (T<sub>em</sub>: CCR7-CD45RA<sup>-</sup>) e células T de memória efetora RA<sup>+</sup> (T<sub>emra</sub>: CCR7-CD45RA<sup>+</sup>). Os gráficos inferiores apresentam a quantificação percentual de cada subpopulação com os valores de significância estatística (p) indicados entre os grupos

comparados. As análises são apresentadas separadamente para células CD4<sup>+</sup> (coluna A) e CD8<sup>+</sup> (coluna B).  
**Fonte:** Autoria própria.

Outro parâmetro avaliado na ação dos inibidores, foi a capacidade de modular a expressão de granzima B, uma proteína predominantemente produzida por linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) e células NK, sendo entregues no citoplasma das células-alvo por meio de sinapses imunológicas em cooperação com a proteína formadora de poros, a perforina. Após a internalização, as granzimas induzem a morte celular por meio da clivagem de substratos intracelulares. Dessa forma, são moléculas associadas e utilizadas classicamente como marcadores da capacidade citotóxica de linfócitos (Hay e Slansky, 2022). Além de indicar a capacidade citotóxica dos linfócitos, a produção de granzima B reflete um estágio avançado de diferenciação celular (Arcangeli *et al*, 2022).

Ao investigarmos a expressão deste mediador citotóxico em linfócitos T, identificamos uma redução significativa na frequência tanto de células T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup> expressando granzima B após tratamento com os inibidores de BET JQ1 e ICBP112. Em contraste, a inibição de metiltransferase de histonas via UNC0642 promoveu o aumento significativo na frequência de células T CD4<sup>+</sup> (**Fig. 7A**) expressando GZMB e uma tendência de elevação nas populações de células T CD8<sup>+</sup> expressando este marcador (**Fig. 7B**).

**Figura 7 | Efeito dos inibidores epigenéticos na expressão de granzima B (GZMB) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.**



Análise por citometria de fluxo da expressão de GZMB em **(A)** células T CD4<sup>+</sup> e **(B)** células T CD8<sup>+</sup> após tratamento com diferentes inibidores (JQ1, UNC0642, ICBP112) ou veículo (controle). Os painéis superiores mostram *dot plots* representativos da expressão de GZMB para cada condição experimental, com os percentuais de células GZMB<sup>+</sup> indicados. Os gráficos inferiores apresentam a quantificação do percentual de células GZMB<sup>+</sup> em cada subpopulação de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> à esquerda e CD8<sup>+</sup> à direita), com os valores de significância estatística ( $p$ ) indicados entre os grupos comparados. **Fonte:** Autoria própria.

As células T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) também possuem capacidade de produção de granzima B, porém de maneira distinta das células T CD8<sup>+</sup>. Conforme demonstrado por Lin *et al.* (2014), a produção de granzima B por células T CD4<sup>+</sup> de memória ocorre de forma menos regulada e, curiosamente, não está necessariamente associada à produção de perforina. Esta característica distingue fundamentalmente o mecanismo citotóxico das células T CD4<sup>+</sup> do padrão clássico observado em células T CD8<sup>+</sup>, onde a produção de granzima B é estritamente regulada e coordenada com a expressão de perforina. Assim, embora as células T CD4<sup>+</sup>

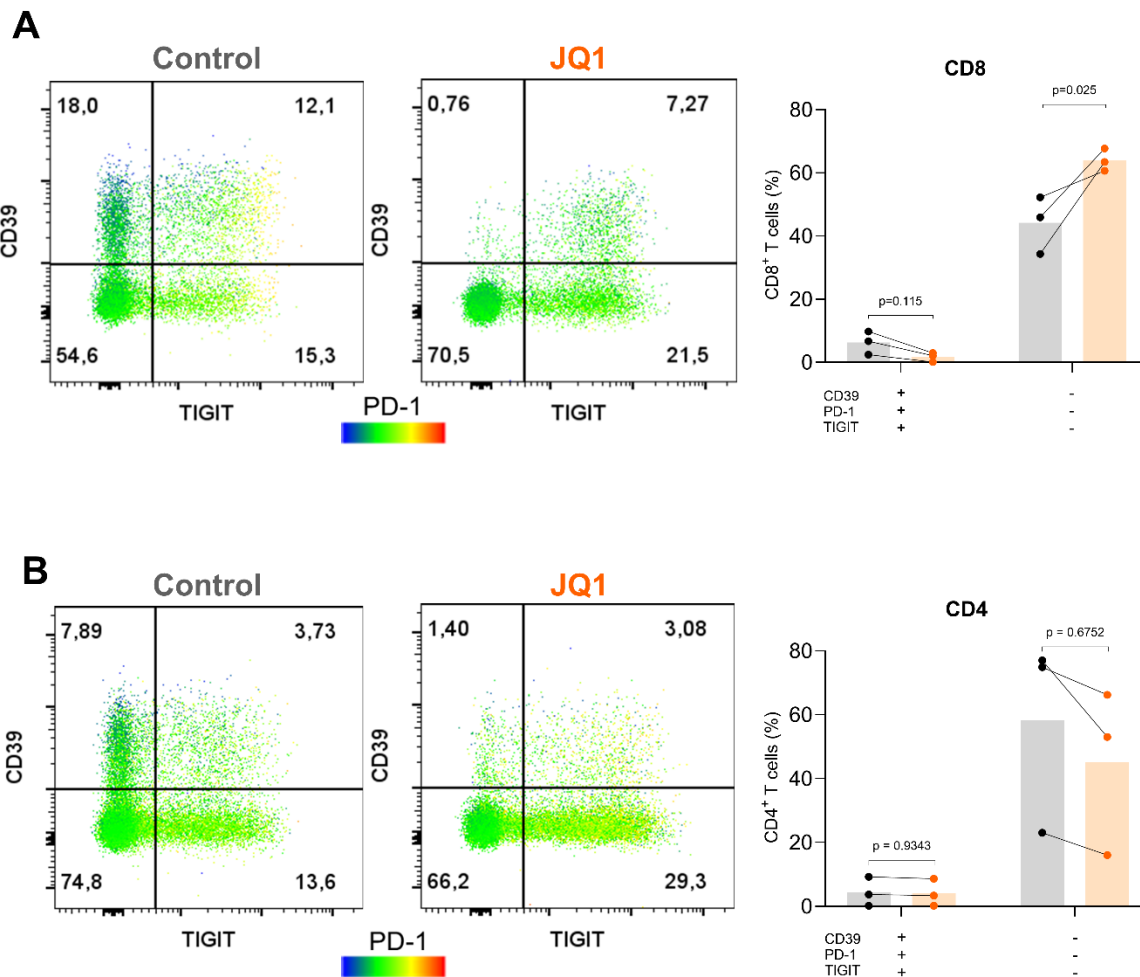
possam exercer função citotóxica através da produção de granzima B, seu mecanismo de ação e regulação apresenta particularidades que as diferenciam das células T CD8<sup>+</sup> tradicionalmente reconhecidas como células citotóxicas.

Atualmente, sabe-se que células T que apresentam um fenótipo menos diferenciado são importantes para manter o controle da proliferação de células tumorais a longo prazo. Associada a esse perfil menos diferenciado, é observada a redução da produção e liberação de moléculas como granzima B (Meyran *et al.*, 2023).

Quanto às células T, a exaustão está associada a um estado de diferenciação progressivo que ocorre em resposta à estimulação antigênica crônica, inicialmente descrita no contexto de infecções virais persistentes e observada em tumores. Como destacado por Blank *et al.* (2019), “exaustão” é um termo amplo que descreve células T que apresentam funcionalidade alterada, caracterizada por diminuição da produção de citocinas, expressão aumentada de receptores inibitórios como PD-1, TIM3 e LAG3, capacidade proliferativa reduzida, além de um programa transcricional único envolvendo o fator de transcrição TOX e um cenário epigenético específico.

A fim de avaliar a coexpressão dos marcadores de exaustão em linfócitos T, realizamos uma análise booleana, revelando que o tratamento com JQ1 promove uma redução simultânea e coordenada na expressão de marcadores como PD-1, CD39 e TIGIT. Os demais inibidores não apresentaram efeito modulatório nesses marcadores (dados não mostrados). Observou-se um incremento significativo na frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> triplo-negativos (não expressando nenhum dos marcadores avaliados) nas amostras submetidas ao inibidor JQ1, quando comparadas ao grupo controle não tratado. Paralelamente, verificou-se uma diminuição na proporção de células T CD8<sup>+</sup> triplo-positivas (coexpressando os três marcadores investigados) após a inibição farmacológica das proteínas BET via JQ1 em relação ao grupo controle (**Fig. 8A**). Estes resultados sugerem que a modulação epigenética mediada por JQ1 atua de maneira integrada sobre o programa transcricional associado à exaustão de células T. Em células CD4<sup>+</sup> não houve diferença com significância estatística (**Fig. 8B**).

**Figura 8 | Análise da coexpressão de receptores inibitórios em linfócitos T após tratamento com JQ1.**



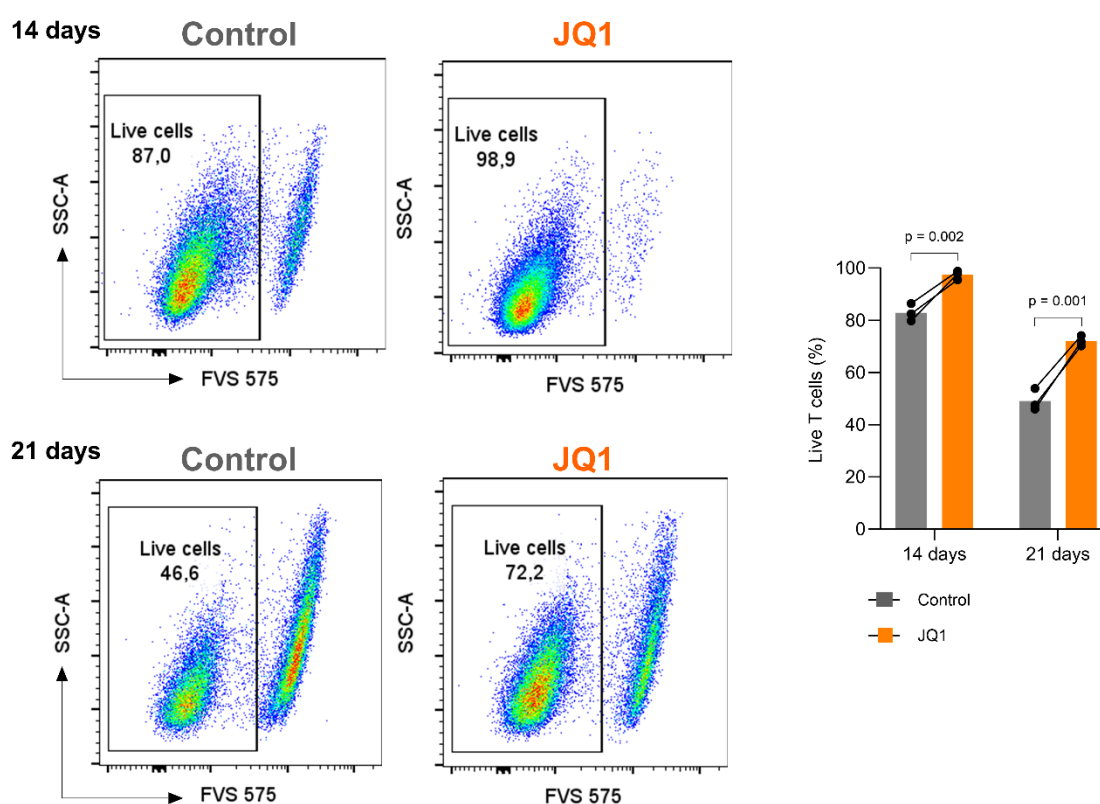
Análise por citometria de fluxo da coexpressão de CD39, PD-1 e TIGIT em **(A)** células T CD8<sup>+</sup> e **(B)** células T CD4<sup>+</sup> comparando o tratamento com JQ1 *versus* controle. Os painéis da esquerda mostram *dot plots* representativos da expressão de CD39 versus TIGIT em condição controle e após tratamento com JQ1, com os percentuais de cada quadrante indicados. A expressão de PD-1 é representada pela intensidade de cores nos *dots*. Os gráficos à direita quantificam as populações celulares com diferentes padrões de expressão dos três marcadores (CD39<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>TIGIT<sup>+</sup>) após tratamento com JQ1. **Fonte:** Autoria própria.

A capacidade superior do inibidor JQ1 em modular estes parâmetros, em comparação aos demais inibidores epigenéticos avaliados, fundamentou sua seleção como droga principal para as análises subsequentes, buscando uma caracterização mais ampla de seus efeitos sobre a funcionalidade das células T e seu potencial terapêutico na reversão do estado de exaustão celular.

## 5.2 Inibição de BRD4 via JQ1 reduz a expressão de receptores inibitórios em linfócitos T de doadores saudáveis ao longo do tempo

A fim de investigar os efeitos de longo prazo do inibidor JQ1 sobre a exaustão celular, linfócitos T isolados de doadores saudáveis foram submetidos à estimulação policlonal e tratamento com JQ1, e a análise foi realizada após 14 ou 21 dias de cultura. Semelhante ao observado em ensaios mais curtos, o tratamento com JQ1 revelou um aumento significativo na viabilidade dos linfócitos T tratados tanto por 14 quanto por 21 dias de cultura (**Fig. 9**).

**Figura 9 |** Análise de viabilidade celular de linfócitos T estimulados após 14 e 21 dias de tratamento com inibidor epigenético JQ1.

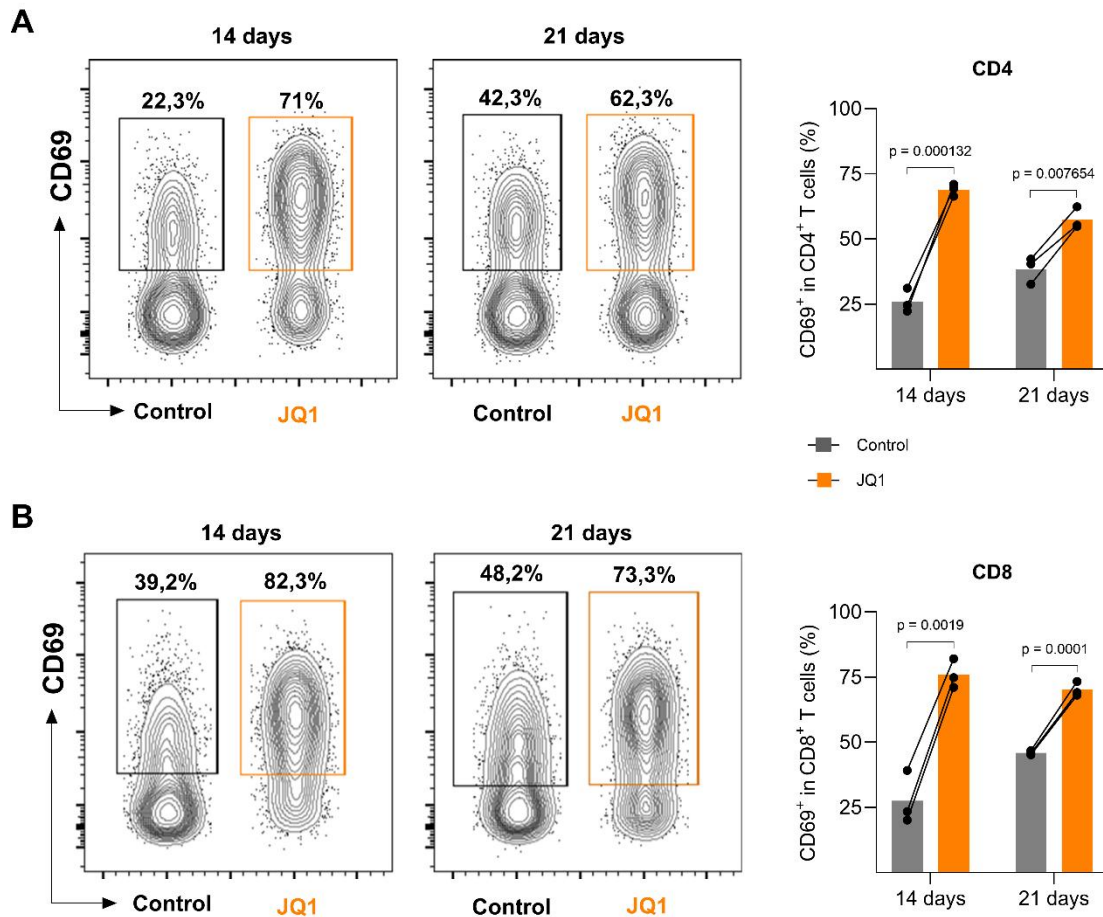


Comparação da frequência de células T viáveis com e sem tratamento com o inibidor epigenético JQ1 (à esquerda) e quantificação da viabilidade de linfócitos T após tratamento com inibidor epigenético JQ1 por 14 e 21 dias (à direita). **Fonte:** Autoria própria.

As células T  $CD4^+$  tratadas com JQ1 apresentaram frequência marcadamente aumentada de células expressando CD69 em comparação ao grupo controle aos 14 dias de cultura. Este fenômeno persistiu até os 21 dias, embora com diferença menos pronunciada, porém ainda estatisticamente significativa (**Fig. 10A**). Padrão semelhante foi observado nas células T  $CD8^+$ , visto que o tratamento com JQ1 promoveu aumento substancial na expressão de CD69 aos 14 dias. Esta diferença significativa entre os grupos tratado e controle se

manteve aos 21 dias de cultura, indicando um efeito sustentado do inibidor epigenético sobre o estado de ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (**Fig. 10B**).

**Figura 10 | Efeito do inibidor epigenético JQ1 na expressão do marcador de ativação CD69 em linfócitos T.**



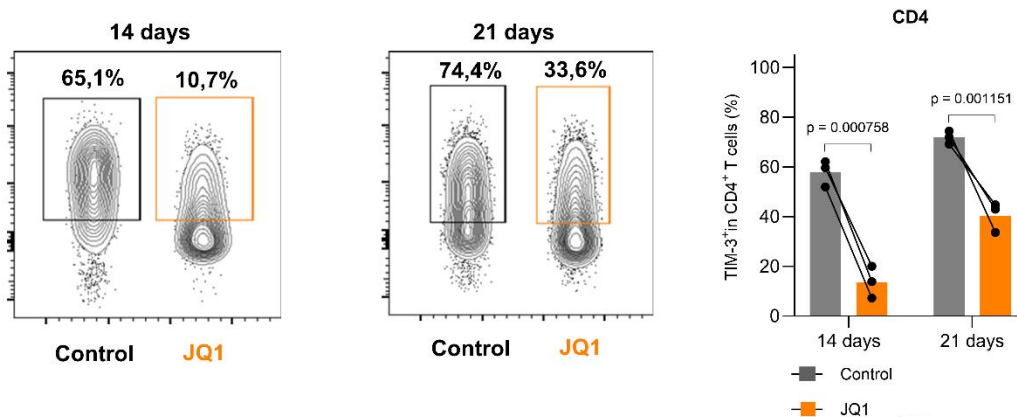
(A) Análise representativa por citometria de fluxo e quantificação da expressão de CD69 em células T CD4<sup>+</sup> tratadas com JQ1 (laranja) ou veículo controle (cinza) após 14 e 21 dias de cultura. Os *dot plots* mostram a distribuição da população de células T CD69<sup>+</sup>. Os gráficos de barras à direita apresentam a análise quantitativa entre os grupos. (B) Perfil de expressão de CD69 em células T CD8<sup>+</sup> nas mesmas condições experimentais. As linhas conectando os pontos representam experimentos pareados. **Fonte:** Autoria própria.

A avaliação dos efeitos do inibidor epigenético JQ1 sobre o perfil de exaustão de linfócitos T demonstrou alterações significativas nos fenótipos celulares. A análise por citometria de fluxo revelou frequência diminuída de células T CD4<sup>+</sup> expressando TIM-3 quando tratadas com JQ1 em comparação com o grupo controle, tanto aos 14 dias quanto aos 21 dias (**Fig. 11A**). Padrão semelhante foi observado nas células T CD8<sup>+</sup>, com redução significativa na frequência de células expressando TIM-3 após tratamento com JQ1 aos 14 dias, embora essa diferença tenha se tornado marginalmente significativa aos 21 dias (**Fig. 11B**). Ao analisarmos o fenótipo de exaustão caracterizado pela ausência da coexpressão de

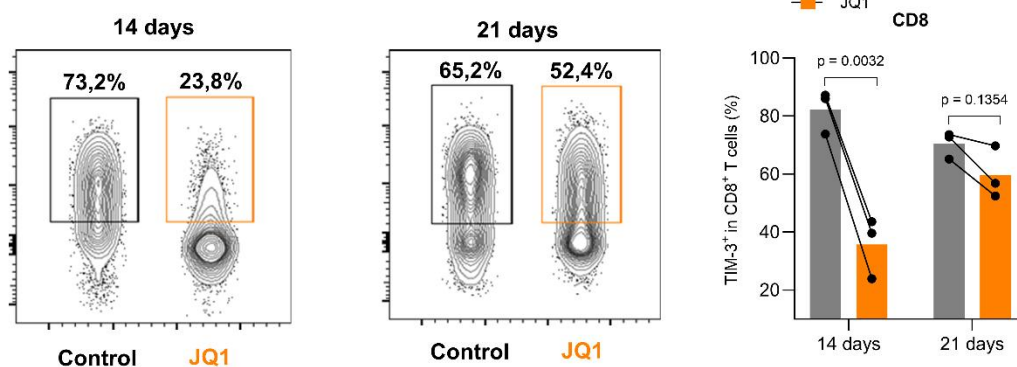
múltiplos receptores inibitórios, verificamos que o tratamento com JQ1 promoveu um aumento significativo na população de células triplo-negativas para LAG-3, PD-1 e TIM-3 (**Fig. 11C**). Este efeito foi mais pronunciado aos 14 dias, tanto em células CD4<sup>+</sup> quanto em células CD8<sup>+</sup>. Embora menos expressivo, o aumento da população triplo-negativa persistiu aos 21 dias nas células T CD4<sup>+</sup>, não mantendo significância estatística nas células T CD8<sup>+</sup>.

**Figura 11 | Efeito do inibidor epigenético JQ1 na expressão de TIM-3, LAG-3 e PD-1 em células T CD4+ e CD8+ em diferentes tempos de cultura.**

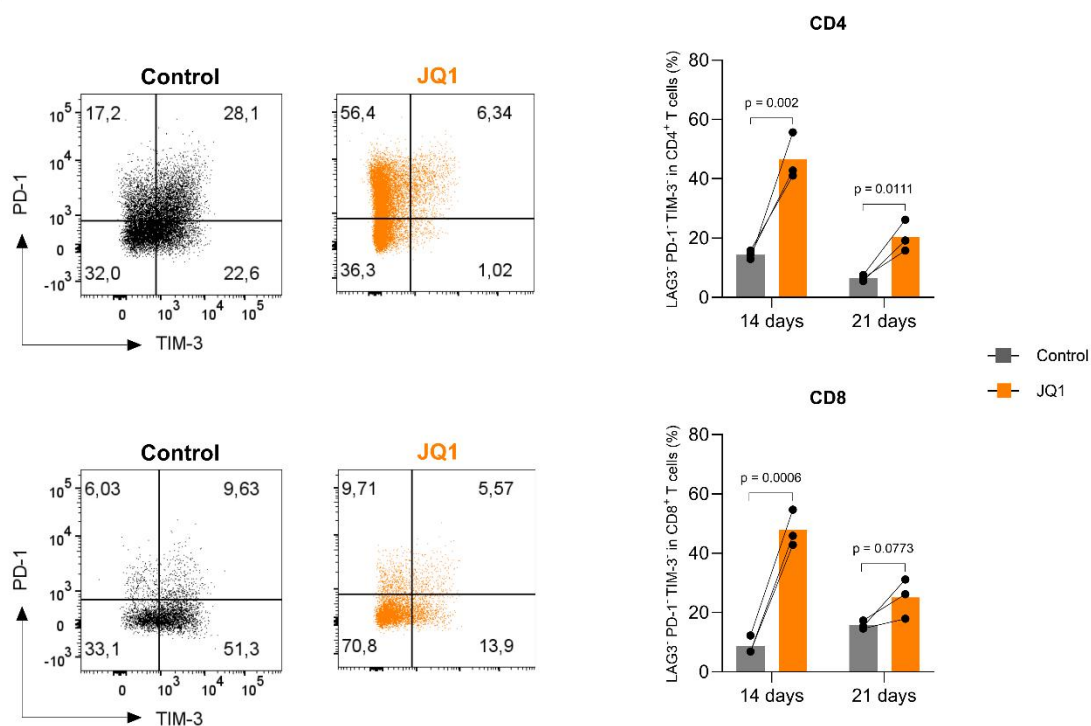
**A**



**B**



**C**



*Dot plots* representativos de citometria mostrando a expressão de TIM-3 em células T CD4+ (**A**) e T CD8+ (**B**)

após 14 dias e 21 dias de cultura nas condições controle (cinza) e JQ1 (laranja) e, à direita, as quantificações das porcentagens de células TIM-3<sup>+</sup> nas respectivas populações. **(C)** Quantificação da frequência de células triplamente negativas para a expressão de LAG-3, PD-1 e TIM-3 em células T CD4<sup>+</sup> (gráfico superior) e CD8<sup>+</sup> (gráfico inferior). **Fonte:** Autoria própria.

Nossos resultados demonstram que o inibidor epigenético JQ1 exerce efeitos modulatórios de longo prazo sobre a expressão de receptores inibitórios e marcadores de ativação em linfócitos T, promovendo maior viabilidade celular e sustentando um perfil fenotípico de ativação mesmo após períodos prolongados de cultura. O tratamento com JQ1 resultou em aumento significativo e persistente na expressão de CD69 tanto em células T CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, sugerindo manutenção do potencial efetivo destas células. Paralelamente, observamos redução significativa na expressão de marcadores de exaustão, particularmente TIM-3, assim como aumento considerável na proporção de células triplo-negativas para receptores inibitórios (LAG-3, PD-1 e TIM-3), especialmente nos períodos iniciais de avaliação. Embora alguns efeitos tenham apresentado atenuação aos 21 dias de cultura, as diferenças em relação ao grupo controle permaneceram significativas para a maioria dos parâmetros analisados.

### 5.3 Inibição de BRD4 via JQ1 em linfócitos T do microambiente tumoral de CRCC

#### 5.3.1 JQ1 reduz a expressão de receptores inibitórios em TILs de CRCC

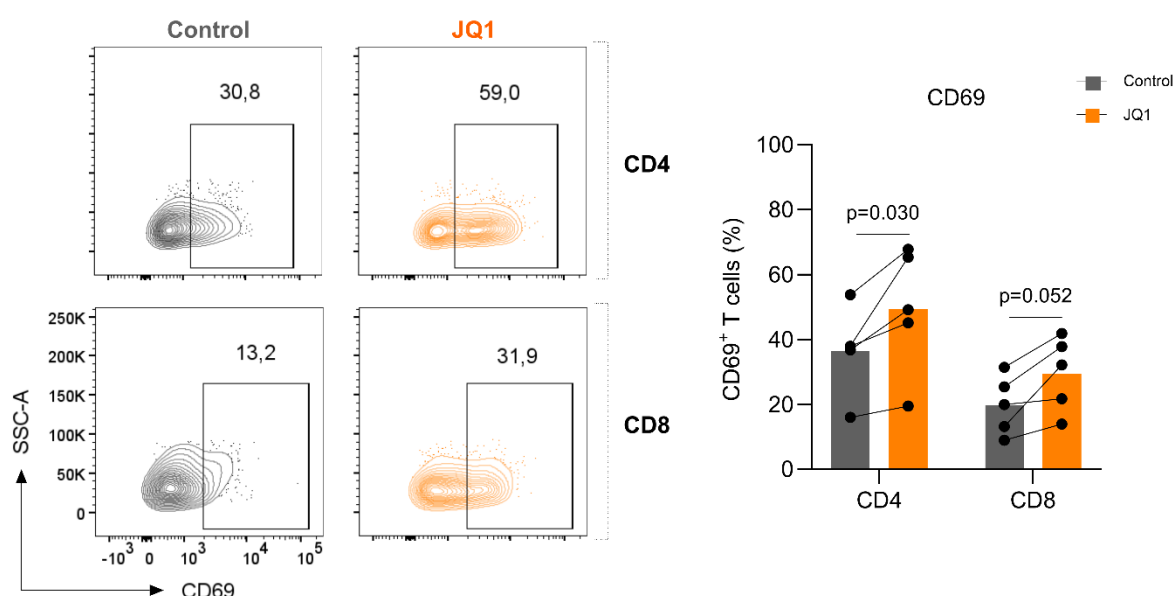
Uma vez evidenciada a ação da inibição de BET por JQ1 sobre marcadores associados à exaustão em linfócitos T de doadores saudáveis, avaliamos a capacidade modulatória de JQ1 sobre a expressão de marcadores associados à disfuncionalidade de linfócitos T do microambiente tumoral, isolados a partir de peças cirúrgicas de pacientes com CRCC.

Considerando a contínua exposição a antígenos sofrida pelas células imunes advindas do infiltrado imune tumoral e a influência de outros fatores imunossupressores, é sabido que os linfócitos T isolados desse meio apresentam um perfil celular mais exausto. Dessa forma, o tempo de estímulo e as condições de cultura para essas células tiveram de ser adaptadas, aumentando a concentração de IL-2, retirando IFN- $\gamma$  e reduzindo a proporção *Dynabeads* anti-CD3/anti-CD28. Além disso, o tempo de cultura também foi reduzido, sendo as análises realizadas após 24 horas de tratamento com JQ1.

Após 24 horas de exposição ao inibidor, foi observado um aumento expressivo na frequência de TILs expressando o marcador de ativação precoce CD69, tanto em linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto em T CD8<sup>+</sup>. Nas células TIL CD4<sup>+</sup>, a frequência de células expressando CD69

elevou-se nas células tratadas com JQ1, representando um incremento na frequência de células positivas para este marcador. De forma similar, na população de linfócitos TIL  $CD8^+$ , o tratamento com o inibidor de BRD4 também induziu um aumento na frequência de células  $CD69^+$  (**Fig. 12**).

**Figura 12 | Efeito modulatório da inibição de BRD4 na expressão de CD69 em TIL de CRCC.**



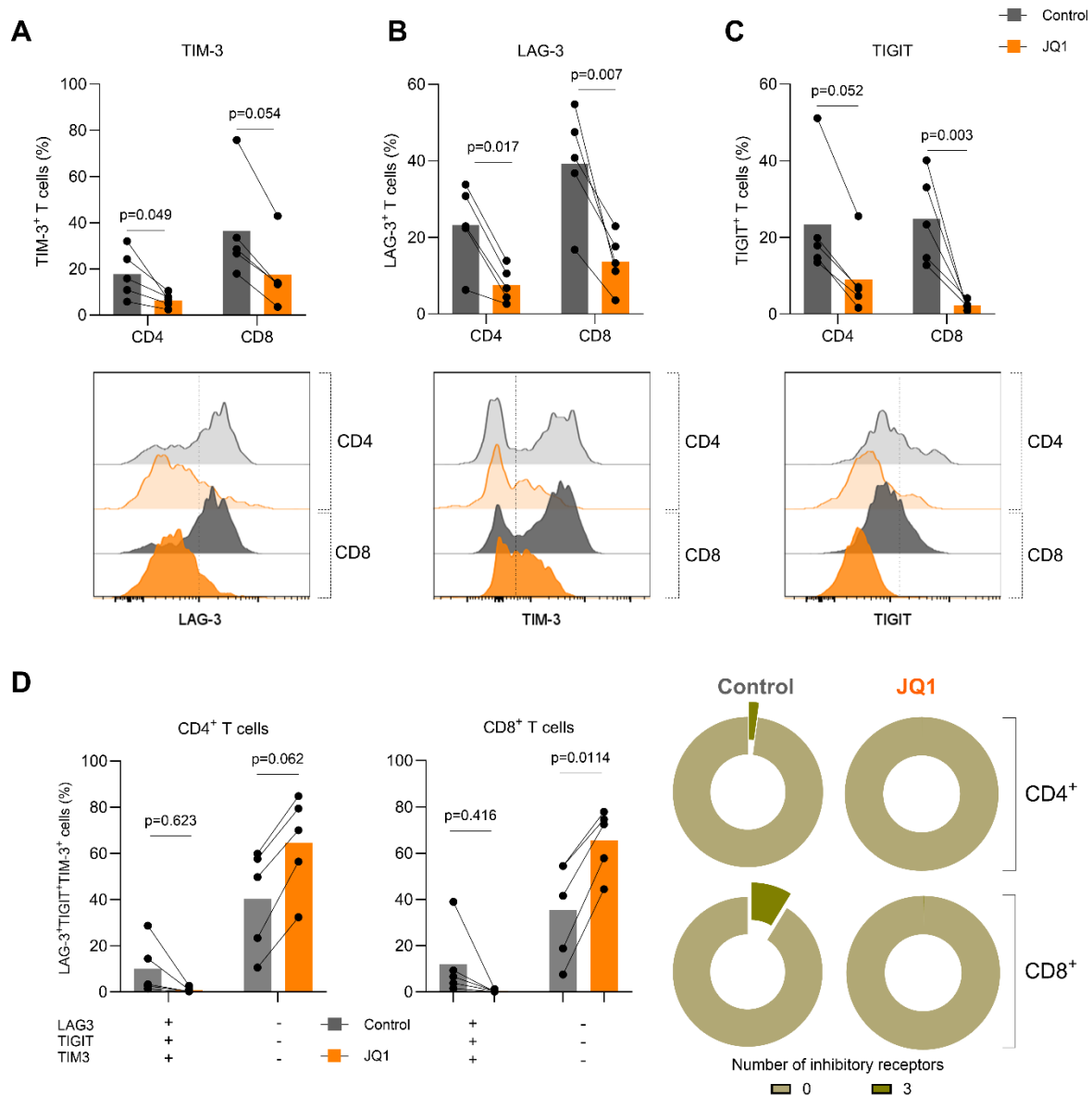
*Dot Plots* representativos da frequência de TIL  $CD4^+$  (acima) e  $CD8^+$  (abaixo) expressando  $CD69^+$  e respectiva quantificação (à direita). TILs isolados de quatro pacientes com CCRC foram ativados *in vitro* com estímulo policlonal na presença ou não de JQ1 e analisados, por citometria de fluxos, quanto à expressão de CD69 após 24h de estímulo. **Fonte:** Autoria própria.

Em relação aos grupos não tratados, as condições tratadas com inibidor JQ1 mostraram redução da frequência de células expressando de marcadores associados à exaustão nas populações de células T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  (**Fig. 13**). Após 24h de tratamento com JQ1, houve drástica redução da frequência de TILs  $CD4^+$  e  $CD8^+$  expressando LAG-3, TIM-3 e TIGIT (**Fig. 13A-C**).

O efeito do inibidor epigenético JQ1 na coexpressão de receptores inibitórios (LAG3, TIGIT e TIM3) nas subpopulações de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  (**Fig. 13D**) promoveu uma redução significativa na proporção de TILs  $CD4^+$  que coexpressam simultaneamente os três receptores inibitórios após o tratamento com JQ1, diminuindo a frequência de células triplo-positivas ( $LAG3^+TIGIT^+TIM3^+$ ) em comparação ao controle. Similarmente, o tratamento com JQ1 resultou em uma diminuição estatisticamente significativa na coexpressão dos três receptores inibitórios nos TILs  $CD8^+$ . Os *donut charts* à direita ilustram essa modulação, evidenciando o aumento na proporção de células que não expressam nenhum dos receptores

inibitórios analisados (0) e a consequente redução da população celular com fenótipo exausto caracterizado pela coexpressão dos três marcadores inibitórios (3). Estes dados sugerem que a inibição de BRD4 promove uma reversão significativa do fenótipo de exaustão em ambas as populações de TILs, potencialmente contribuindo para uma melhora na funcionalidade destas células.

**Figura 13 | Efeito de JQ1 na expressão de múltiplos receptores inibitórios em TILs de CRCC.**



Quantificação da frequência de TILs CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando (A) LAG-3, (B) TIM-3 e (C) TIGIT. Abaixo, os respectivos histogramas representativos mostrando os perfis de expressão de LAG-3, TIM-3 e TIGIT em TILs CD4<sup>+</sup> (painéis superiores) e CD8<sup>+</sup> (painéis inferiores) nas condições controle (cinza) e JQ1 (laranja). (D) Quantificação das frequências de células coexpressando LAG-3, TIGIT e TIM-3 nas subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (à esquerda) e CD8<sup>+</sup> (ao centro), um gráfico de setores (à direita) ilustrando a diferença na coexpressão desses marcadores. **Fonte:** Autoria própria.

A diminuição da expressão de receptores inibitórios e a indução de um fenótipo menos exausto em células T tratadas com JQ1 representa um achado significativo do ponto de vista translacional da terapia com TILs. Estes resultados são particularmente relevantes considerando que a exaustão de células T é um dos principais obstáculos para a eficácia da terapia baseada em TILs, onde frequentemente observa-se uma diminuição progressiva da função efetora dessas células expostas ao microambiente tumoral. A capacidade de JQ1 em modular este fenótipo sugere uma possibilidade de otimizar a persistência e funcionalidade dos TILs, podendo resultar em respostas antitumorais mais duradouras e efetivas.

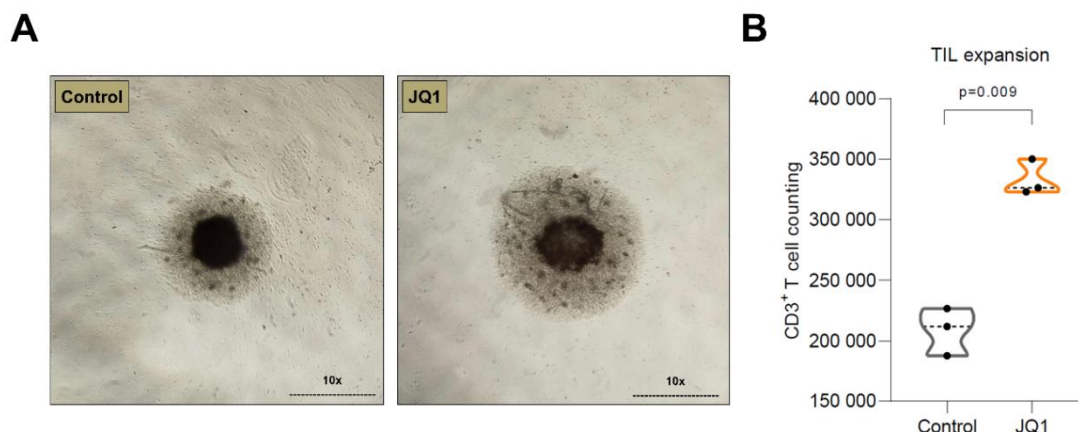
### **5.3.2 JQ1 aumenta a capacidade de expansão *in vitro* dos TILs de CRCC**

No contexto da terapia celular com TILs, um dos principais desafios técnicos enfrentados é a baixa viabilidade celular durante o processo de expansão *in vitro*, bem como a limitada persistência *in vivo* destas células, fatores que podem comprometer o sucesso do tratamento.

Nós, então, avaliamos o impacto dessa modulação na expansão e viabilidade celular dos TILs tratados com JQ1 por 48 horas. Por microscopia óptica, foi evidenciado um aparente aumento da celularidade nas condições tratadas com o inibidor epigenético (**Fig. 14A**). Em seguida, essas células foram analisadas utilizando uma técnica precisa de contagem absoluta por citometria de fluxo, empregando BD *Liquid Counting Beads* como referência. Os resultados obtidos revelaram um aumento significativo no número absoluto de TILs viáveis no grupo tratado com o inibidor JQ1, em comparação com o grupo controle (**Fig. 14B**).

Este achado é particularmente relevante pois sugere que a inibição farmacológica de BRD4 por JQ1 pode contribuir positivamente para a manutenção da viabilidade dos linfócitos T e para sua expansão *in vitro*.

**Figura 14 | Efeito do inibidor JQ1 na expansão de TILs de pacientes com CRCC.**



**(A)** Imagens representativas (aumento 10x) mostrando a expansão de TILs em cultura nas condições controle (esquerda) e JQ1 (direita). **(B)** Quantificação da expansão de TILs medida por contagem de células CD3<sup>+</sup>, utilizando *counting beads*, após 48h de cultura. **Fonte:** Autoria própria.

Considerando que o sucesso da terapia com TILs depende fundamentalmente da capacidade de expandir um número suficiente de células funcionais, a descoberta de que o JQ1 pode potencializar este aspecto representa um avanço significativo para a otimização desta abordagem terapêutica. Esta melhoria na expansão celular pode ter implicações diretas na eficácia do tratamento, possibilitando a produção de um maior número de células viáveis para a terapia. O repertório de citocinas, a capacidade citotóxica e a persistência *in vivo* dessas células tratadas com inibidores de BRD4 ainda são fundamentais para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes pelos quais a reprogramação epigenética potencializa a atividade antitumoral das células T de TIL.

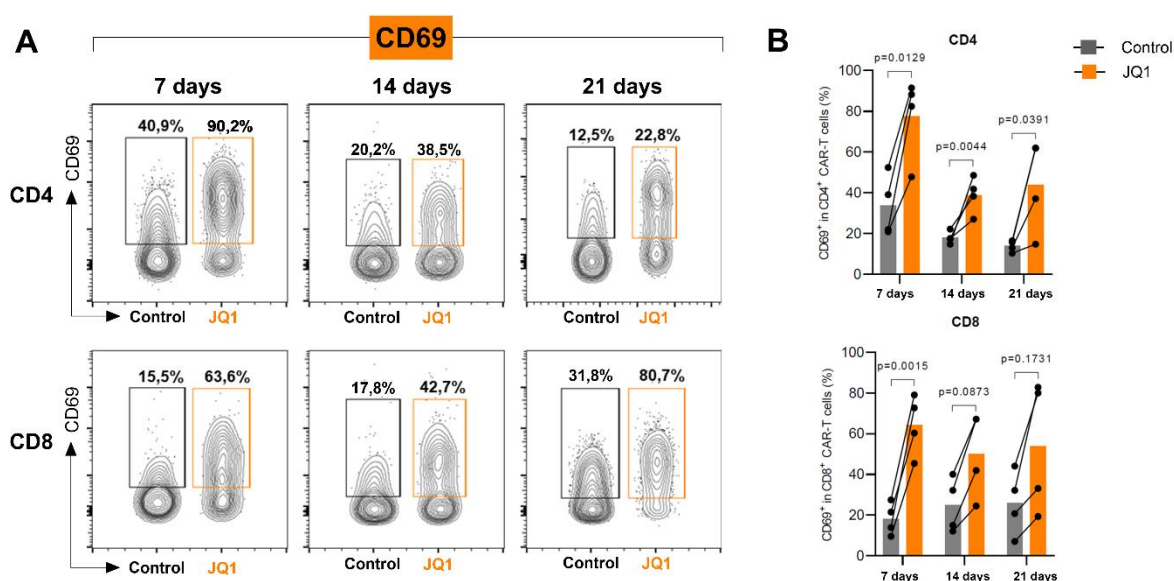
#### 5.4 Inibição de BRD4 via JQ1 em células CAR-T anti-CD19

Uma vez constatado o efeito modulatório do inibidor JQ1 em linfócitos T, tanto de doadores saudáveis quanto advindos do microambiente tumoral de pacientes com CRRC, avançamos para investigar seu impacto em células CAR-T, uma modalidade de imunoterapia altamente promissora que, apesar de seu potencial terapêutico significativo, ainda enfrenta importantes limitações relacionadas à exaustão celular e perda de persistência *in vivo*.

### 5.4.1 JQ1 aumenta expressão do marcador de ativação precoce CD69 em células CAR-T anti-CD19

A expressão do marcador de ativação precoce CD69 em células CAR-T foi avaliada ao longo de 7, 14 e 21 dias de cultura na presença ou ausência do inibidor epigenético JQ1. Os nossos resultados demonstraram que o tratamento com JQ1 induziu um aumento substancial na frequência de células CD69<sup>+</sup> em ambas as populações de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, sendo esse aumento representado na **Fig. 15A**. Nas células CAR-T CD4<sup>+</sup>, observou-se um incremento significativo na expressão de CD69 aos 7 dias de cultura, fenômeno que persistiu aos 14 dias e aos 21 dias de cultura. Padrão semelhante foi observado na população de células CAR-T CD8<sup>+</sup>, onde o tratamento com JQ1 promoveu elevação significativa na expressão de CD69 aos 7 dias, com tendência à manutenção deste efeito aos 14 dias, embora sem significância estatística aos 21 dias de cultura (**Fig. 15B**).

**Figura 15 | Efeito modulatório da inibição de BRD4 via JQ1 em células CAR-T**



(A) *Dot plots* representativos da expressão de CD69 em células CAR-T CD4<sup>+</sup> (painéis superiores) e CD8<sup>+</sup> (painéis inferiores) tratadas com JQ1 ou controle, avaliadas nos dias 7, 14 e 21 após transdução, com os percentuais de células CD69<sup>+</sup> indicados. Quantificação do percentual de células CD69<sup>+</sup> dentro de células CAR<sup>+</sup> e em cada subpopulação de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> à esquerda e CD8<sup>+</sup> à direita) ao longo do tempo. **Fonte:** Autoria própria.

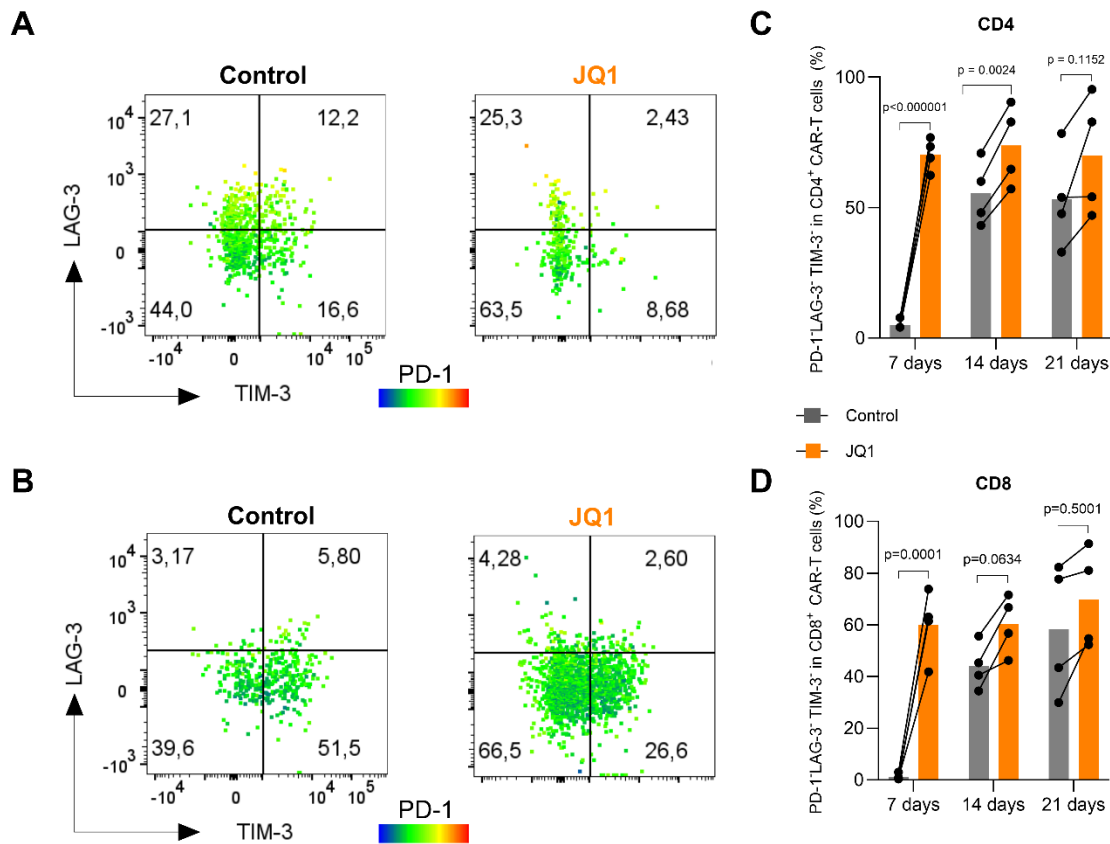
É importante ressaltar que, apesar da redução gradual observada na expressão de CD69 ao longo do tempo em ambos os grupos, as células tratadas com o inibidor mantiveram consistentemente maior frequência de células expressando este marcador de ativação em comparação às células da condição controle, sugerindo um efeito sustentado do inibidor de

BRD4 na preservação do estado funcional das células CAR-T mesmo após períodos prolongados de cultura.

#### 5.4.2 JQ1 reduz marcadores associados à exaustão em células CAR-T anti-CD19

A inibição de BRD4 promoveu modulação na expressão de marcadores de exaustão em células CAR-T. Observou-se redução expressiva da coexpressão de PD-1, TIM-3 e LAG-3 após o tratamento com JQ1 tanto nas subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (**Fig. 16A**) quanto na subpopulação CD8<sup>+</sup> (**Fig. 16B**) com concomitante aumento das populações negativas para esses mesmos os marcadores. A análise quantitativa apresenta o efeito de JQ1 ao longo do tempo (7, 14 e 21 dias) nas populações de células CAR-T triplo-negativas para PD-1, LAG-3 e TIM-3. Nas células CAR-T CD4<sup>+</sup> (**Fig. 16C**), observou-se aumento significativo na frequência de células triplo-negativas após tratamento com JQ1 aos 7 dias ( $p < 0,0001$ ) e 14 dias ( $p = 0,0024$ ), com tendência de manutenção deste efeito aos 21 dias, embora sem significância estatística ( $p = 0,1152$ ). Padrão similar foi observado nas células CAR-T CD8<sup>+</sup> (**Fig. 16D**), com aumento significativo na frequência da população triplo-negativa aos 7 dias ( $p = 0,0001$ ) e 14 dias ( $p = 0,0634$ ), mas não mantendo o efeito após 21 dias de cultura ( $p = 0,5001$ ).

**Figura 16 | Modulação da coexpressão de marcadores de exaustão em células CAR-T após tratamento com JQ1.**



**(A)** Dot plots representativos (à esquerda) de células CAR-T co-expressando de PD-1 (MFI em escala de cor), TIM-3 e LAG-3 (frequência de células) e quantificação da análise booleana das frequências de células CAR-T CD4<sup>+</sup> co-expressando esses três marcadores ao longo de 7, 14 e 21 dias. **(B)** Dot plots representativos (à esquerda) de células CAR-T co-expressando de PD-1 (MFI em escala de cor), TIM-3 e LAG-3 (frequência de células) e a respectiva quantificação da análise booleana das frequências de células CAR-T CD8<sup>+</sup> co-expressando PD-1, TIM-3 e LAG-3 e quantificação da análise booleana das frequências de células CAR-T CD8<sup>+</sup> co-expressando esses marcadores ao longo de 7, 14 e 21 dias. **Fonte:** Autoria própria.

Nossos dados mostram que o inibidor epigenético JQ1, que atua na inibição de BRD4, exerce efeitos benéficos sobre o perfil funcional de linfócitos T, com potencial aplicação para otimização de terapias celulares. Em células CAR-T anti-CD19, o tratamento com JQ1 não apenas aumentou a expressão de CD69 como também reduziu múltiplos marcadores de exaustão.

#### 5.4.4 A inibição de BRD4 aumenta o potencial antitumoral *in vitro* de células CAR-T anti-CD19

O ensaio de citotoxicidade (*killing*) realizado com células CAR-T em co-cultura com células tumorais Nalm6, comparando a atividade antitumoral de células CAR-T tratadas ou

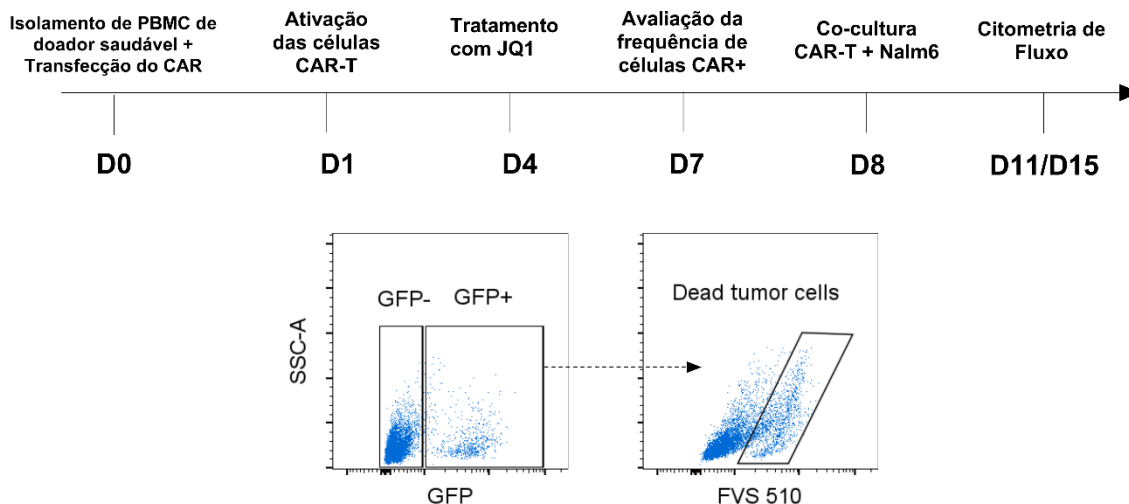
não com o inibidor epigenético JQ1, foi feito em duas razões efetora:alvo diferentes (1:5 no painel superior e 1:10 no inferior). Na razão 1:5, as células tratadas com JQ1 apresentaram 74,0% de morte celular tumoral no dia 3 (D3), comparado a 50,8% no controle. Esta superioridade também foi observada na razão mais desafiadora de 1:10, onde o tratamento com JQ1 resultou em 62,0% de morte celular versus apenas 28,0% no grupo controle (**Fig. 17A e B**).

Os gráficos de barras quantificam estes resultados tanto no dia 3 (D3) quanto no dia 7 (D7) do experimento (**Fig. 17B à direita**). No D3, observa-se maior porcentagem de morte celular nas células tratadas com JQ1 em ambas as razões. No D7, o padrão se repete, particularmente na razão 1:10, mostrando que o efeito do JQ1 na potencialização da atividade citotóxica das células CAR-T é sustentado ao longo do tempo.

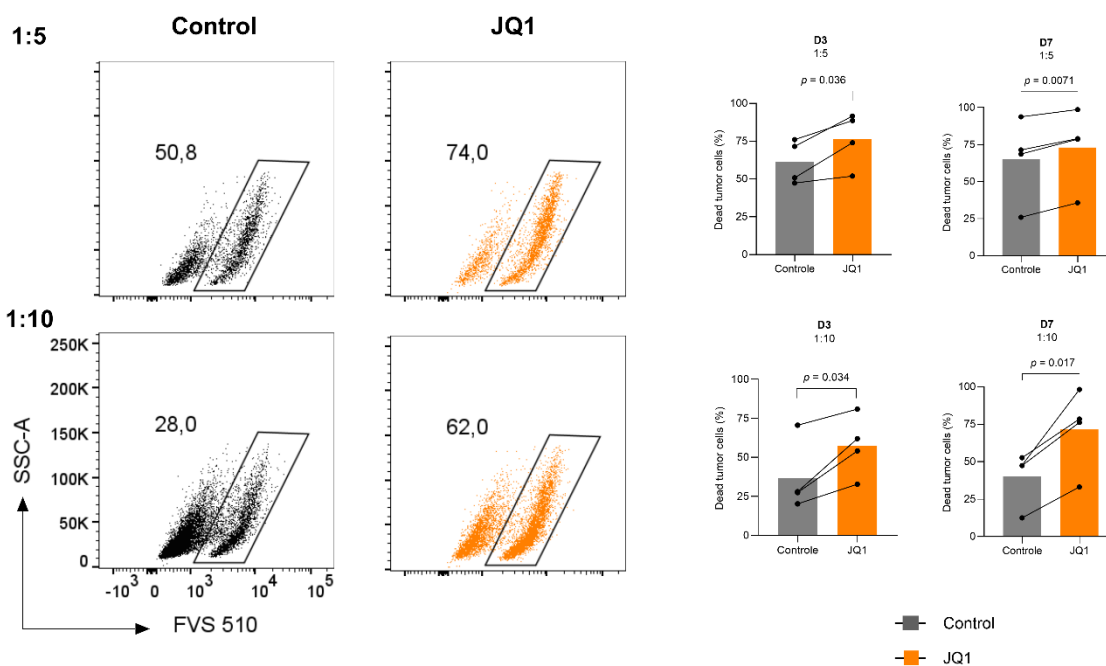
Estes dados indicam que a modulação epigenética por JQ1 aumenta significativamente a eficácia citotóxica das células CAR-T contra células tumorais Nalm6, mesmo em condições em que as células efetoras estão em menor número, evidenciando o potencial desta abordagem para melhorar a eficácia terapêutica da imunoterapia celular.

**Figura 17 | Avaliação da atividade citotóxica de células CAR-T tratadas com JQ1 contra células leucêmicas Nalm6.**

**A**



**B**



**(A)** Desenho experimental do ensaio de citotoxicidade. Os *dot plots* representam a estratégia de *gating* utilizada para identificar células GFP+ (CAR-T) e células tumorais mortas positivas para o marcador de viabilidade FVS 510. **(B)** Comparação da atividade citotóxica de células CAR-T controle e tratadas com JQ1 contra células Nalm6 em diferentes razões efetora:alvo (1:5 e 1:10). Os *dot plots* ilustram a morte celular tumoral nos dias 3 e 7 de co-cultura. **Fonte:** Autoria própria.

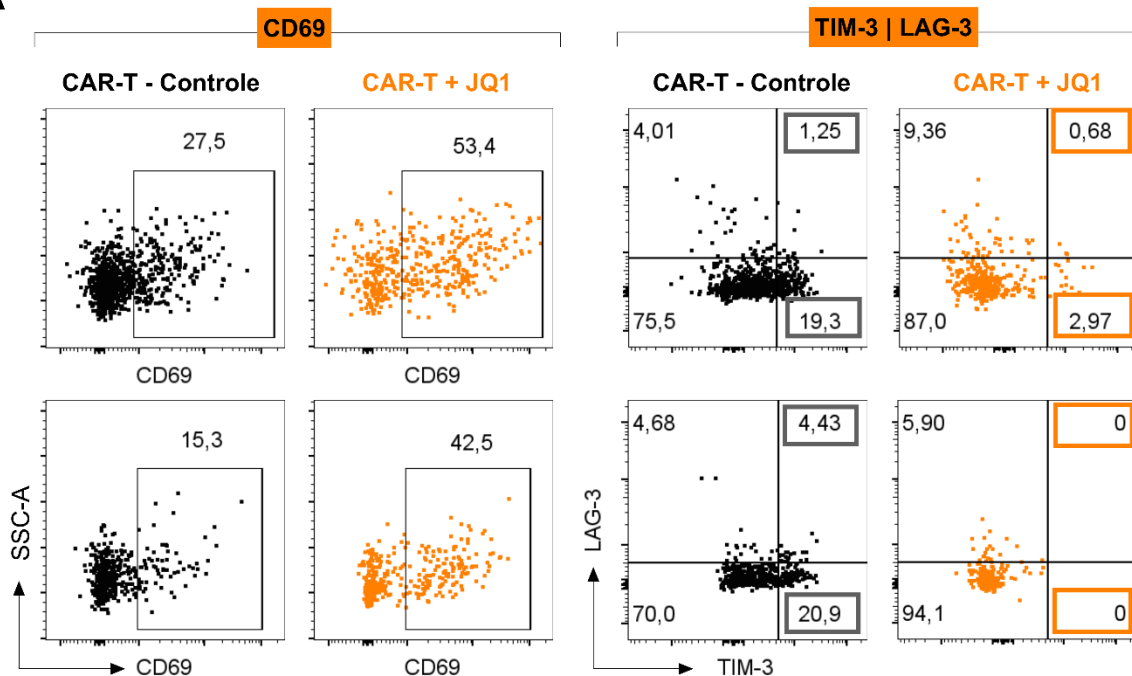
#### 5.4.4 A inibição de BRD4 aumenta o potencial antitumoral *in vitro* de células CAR-T anti-CD19 de paciente com neoplasia hematológica

Uma vez observada a capacidade modulatória do inibidor JQ1 em células CAR-T produzidas a partir de linfócitos T de doadores saudáveis, partimos para a investigação desse efeito em CAR-T oriundas de pacientes com neoplasias hematológicas. Dessa forma, foi realizado um ensaio de *killing* no qual células CAR-T, advindas do produto de infusão de pacientes com LLA-B, tratadas ou não com JQ1, foram desafiadas com a linhagem Nalm-6 CD19<sup>+</sup>, de LLA-B.

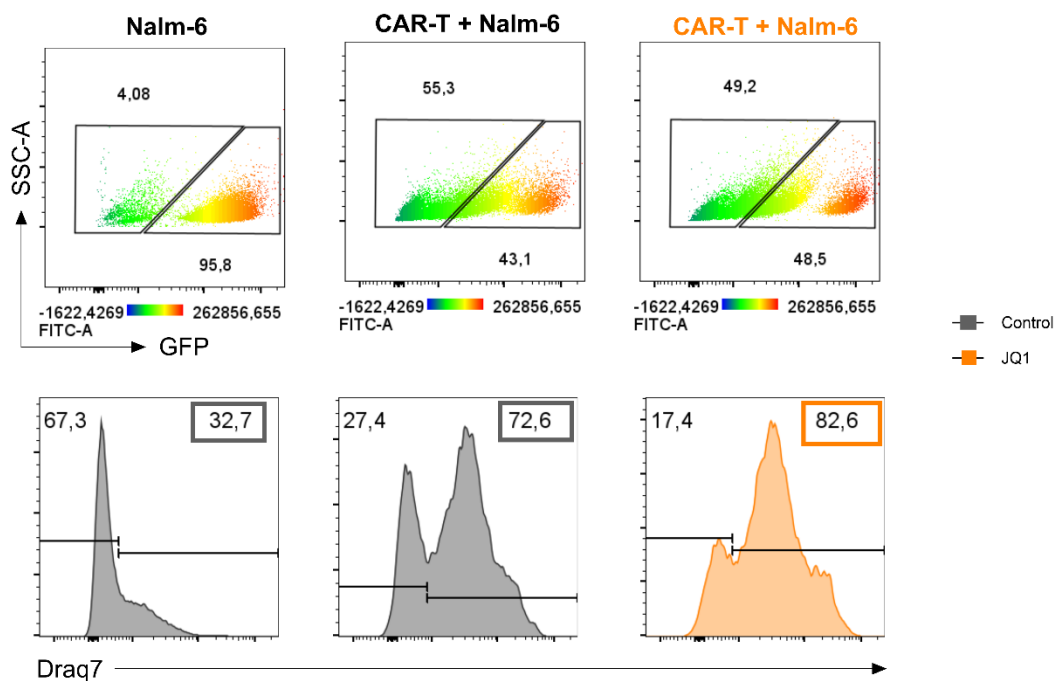
Além da avaliação do percentual de morte tumoral, foram avaliados alguns marcadores-chave, como CD69, TIM-3 e LAG-3, que são determinantes para definir o efeito modulatório do inibidor de BRD4 (**Fig. 18A**). O tratamento com JQ1 culminou em um aumento na capacidade antitumoral das células CAR-T, evidenciado pela maior frequência de células Nalm-6 positivas para o marcador de viabilidade Draq7 (**Fig. 18B**).

**Figura 18 | A** inibição de BRD4 reduz marcadores associados à exaustão em células CAR-T anti-CD19 e potencializa sua capacidade antitumoral sobre linhagem de LLA-B.

**A**



**B**



**(A)** Dot plots representando as frequências de células CAR-T expressando CD69 (à esquerda) e coexpressando TIM-3 e LAG-3 (à direita) com ou sem o tratamento com JQ1. **(B)** Frequência de células tumorais mortas em cada condição avaliada: controle negativo, contendo apenas células tumorais (32,7%), co-cultura entre células tumorais e células CAR-T sem tratamento prévio com JQ1 (72,6%) e co-cultura entre células tumorais e células CAR-T tratadas previamente com JQ1 (82,6%). **Fonte:** Autoria própria.

Os resultados apresentados demonstram que a inibição de BRD4 via JQ1 exerce um efeito significativo na modulação do fenótipo de linfócitos T de diferentes modalidades terapêuticas, sejam células CAR-T ou TILs. O tratamento com JQ1 promoveu uma significativa redução na coexpressão de receptores inibitórios tanto em TILs quanto em células CAR-T, revertendo parcialmente o fenótipo de exaustão que frequentemente limita a eficácia dessas terapias. A reprogramação epigenética resultou em um efeito funcional, evidenciado pelo aumento da capacidade antitumoral das células CAR-T contra células leucêmicas Nalm-6, mesmo em condições desafiadoras com baixa proporção efetora:alvo (1:10). A persistência deste efeito até o dia 7 de co-cultura sugere uma modulação sustentada no programa transcricional dessas células, indicando potencial para respostas terapêuticas mais duradouras.

De forma conjunta, estes dados revelam que a intervenção farmacológica com inibidores de BRD4 representa uma estratégia promissora para otimizar terapias celulares adotivas, potencialmente aumentando sua eficácia terapêutica por meio da modulação de mecanismos epigenéticos que regulam a exaustão de células T. Experimentos adicionais estão atualmente em andamento para aumentar o conjunto amostral, utilizando células de múltiplos doadores para produção de células CAR-T.

## 6 DISCUSSÃO

Entre os três inibidores epigenéticos avaliados (JQ1, UNC0642 e ICBP112), o JQ1 destacou-se por seu efeito modulatório mais consistente em células T de doadores saudáveis. O aumento significativo na viabilidade celular observado nas condições tratadas com JQ1 pode ser explicado pela capacidade do JQ1 de modular vias metabólicas e de sobrevivência, como demonstrado por Wang *et al.* (2023), que observaram alterações no metabolismo celular e na bioenergética após inibição de BRD4.

O aumento na expressão de CD69 em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após tratamento com JQ1 sugere um impacto positivo na ativação inicial destas células. O CD69 é um receptor de C-lectina tipo II ligado à membrana e marcador precoce clássico de ativação de linfócitos devido ao seu rápido aparecimento na superfície da membrana plasmática após estimulação. O CD69 é um marcador de ativação precoce altamente expresso em CTLs e células natural killer (NK). Evidências recentes revelaram que CD69 regula algumas funções específicas de subtipos de células T selecionados, determinando a aquisição de fenótipos efetores ou reguladores. O CD69 é expresso em leucócitos infiltrados em locais inflamatórios em várias condições inflamatórias crônicas humanas (Cibrián e Sánchez-Madrid, 2017).

Este aumento na expressão de CD69 ocorreu simultaneamente à redução na expressão de marcadores de exaustão, indicando que o JQ1 pode promover um estado de ativação funcional sem induzir exaustão, uma característica altamente desejável para terapias celulares.

A correlação inversa entre expressão de Granzima B e susceptibilidade à exaustão celular pode ser discutida utilizando esse status de diferenciação linfocitária de memória. Subpopulações T com fenótipo menos diferenciado, incluindo células T de memória central (Tcm) e células T stem cell-like de memória (Tscm), caracterizam-se pela expressão reduzida de Granzima B concomitante à preservação de propriedades stem-like, maior capacidade proliferativa e resistência aumentada à disfunção celular crônica. Estas populações, definidas fenotipicamente pela expressão de CCR7 e CD45RA, exibem capacidade de auto-renovação e plasticidade funcional significativamente preservadas, atributos que conferem maior resistência ao estabelecimento do programa transcricional de exaustão. Essa aparente dicotomia sugere que níveis basais reduzidos de Granzima B podem constituir um estado celular favorável à manutenção da funcionalidade imunológica, aspecto particularmente

relevante no contexto de respostas antitumorais, além de correlacionar-se com superior responsividade em terapias celulares como células CAR-T (Arcangeli *et al.*, 2022).

A análise do perfil de expressão de receptores inibitórios após tratamento com moduladores epigenéticos revela um cenário complexo de regulação imunológica. Particularmente intrigante é o aumento significativo de TIGIT em células T CD4<sup>+</sup> induzido por JQ1, contrastando com a redução concomitante de CD39 em T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e de PD-1 em linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Este padrão divergente sugere um mecanismo compensatório de regulação imune, onde a inibição das proteínas BET por JQ1 pode estar reduzindo a expressão de certos receptores inibitórios enquanto indiretamente promove a expressão de TIGIT como estratégia de manutenção da homeostase celular. Conforme descrito por Joller, Anderson e Kuchroo (2024), TIGIT possui funções imunomoduladoras distintas dos demais receptores inibitórios, atuando tanto por meio da competição com receptores coestimulatórios por ligantes compartilhados, como o CD226, quanto pela indução de sinais inibitórios intrínsecos, podendo contornar os efeitos modulatórios da inibição de BRD4 causados pelo inibidor JQ1. Esta regulação diferencial evidencia a complexidade dos circuitos epigenéticos que controlam a expressão de moléculas coinibidoras em linfócitos T e sugere que intervenções farmacológicas dirigidas a modificadores epigenéticos podem gerar respostas compensatórias imprevistas, necessitando abordagens combinatoriais para obtenção de fenótipos celulares otimizados em aplicações imunoterapêuticas.

A análise das subpopulações de memória revelou que o JQ1 aumentou significativamente a frequência de células T CD4<sup>+</sup> de memória central (Tcm: CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), enquanto reduziu as células terminalmente diferenciadas (Temra: CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>). Wang *et al.* (2022) destacam que células menos diferenciadas possuem maior capacidade de autorrenovação, aspecto crucial para respostas antitumorais duradouras. Este perfil de memória favorável induzido pelo JQ1 alinha-se com o conceito de que células T com características *stem-like* são mais eficazes em terapias celulares adotivas.

A capacidade do JQ1 de preservar ou promover fenótipos menos diferenciados pode estar relacionada à sua ação na modulação de programas transcricionais associados à diferenciação celular. Zhong *et al.* (2022) demonstraram que a inibição de BET pode interferir em vias de sinalização que controlam a diferenciação terminal de células T, favorecendo a manutenção de características de memória. Este efeito é particularmente

relevante para terapias celulares, onde a persistência de células T funcionais é determinante para a eficácia clínica.

Um dos achados mais significativos deste estudo foi a consistente redução na expressão de receptores inibitórios (PD-1, CD39, TIM-3, LAG-3) em células T tratadas com JQ1. Este efeito foi observado tanto em células de doadores saudáveis quanto em TILs de pacientes com CRCC, sugerindo um potencial terapêutico abrangente.

A análise booleana demonstrou aumento na frequência de células T triplo-negativas para CD39, PD-1 e TIGIT e redução de células triplo-positivas para esses mesmos marcadores após tratamento com JQ1, evidenciando sua capacidade de modular múltiplos receptores simultaneamente. Blank *et al.* (2019) descrevem que a exaustão de células T envolve programas transcricionais específicos, incluindo o fator de transcrição TOX, que podem ser alvo de modulação epigenética. A capacidade do JQ1 de reverter aspectos fenotípicos da exaustão sugere sua interferência nestes programas moleculares.

Especificamente, a redução na expressão de PD-1 é particularmente relevante, considerando seu papel central na imunossupressão tumoral. Zhong *et al.* (2022) demonstraram que a inibição de BET pode resgatar a exaustão mediada por PD-1 em células T, corroborando nossos achados. Além disso, o aumento de TIGIT, que pode inibir a ativação de células T via nanoclusters induzidos por ligação, independentemente da co-estimulação via CD226 (Worboys *et al.*, 2023), sugere um impacto em múltiplos mecanismos de regulação negativa. Os ensaios de longo prazo (14 e 21 dias) confirmaram a capacidade do JQ1 de sustentar a viabilidade celular e reduzir a frequência de células coexpressando os receptores inibitórios LAG-3, PD-1 e TIM-3, mesmo após estimulação prolongada.

A inibição de BRD4 através do JQ1 demonstrou notável eficácia na reversão do fenótipo exausto em TILs isolados de pacientes com CRCC, um cenário particularmente relevante para investigações em imunoterapia. O CRCC caracteriza-se como um "tumor quente" devido ao seu abundante infiltrado imune, característica essencial para o estudo e desenvolvimento de terapias celulares baseadas em TILs (Vuong *et al.*, 2019). Esta característica foi corroborada por Xu *et al.* (2020), que, ao analisarem 533 pacientes com CRCC, documentaram elevada presença de células imunes no microambiente tumoral, cuja distribuição correlaciona-se com aspectos clinicopatológicos da doença.

Nossos resultados revelaram que, mesmo em células naturalmente submetidas à exaustão crônica devido à exposição antigênica persistente no microambiente tumoral, o tratamento com JQ1 promoveu redução significativa na expressão de múltiplos receptores inibitórios, incluindo LAG-3, TIM-3 e TIGIT. Esta rica infiltração imunológica não apenas posiciona o CRCC como um tumor potencialmente mais responsivo à imunoterapia, mas também oferece um cenário promissor para intervenções terapêuticas baseadas na manipulação epigenética de TILs, abrindo novas perspectivas para o tratamento desta neoplasia.

Este achado tem implicações translacionais importantes, considerando que já tem sido demonstrado que o infiltrado imune no CRCC tem distribuição dinâmica relacionada às características clinicopatológicas da doença. A capacidade de modular farmacologicamente o fenótipo destas células pode representar uma estratégia para otimizar o potencial terapêutico de terapias adotivas com TIL (Xu *et al*, 2020).

O aumento significativo na expansão de TILs após 48 horas de tratamento com JQ1 representa um dos achados mais promissores deste estudo do ponto de vista translacional. A limitada expansão *ex vivo* é um dos principais desafios técnicos na produção de TILs para terapia celular adotiva, como destacado por Zhang *et al*. (2023).

O mecanismo subjacente a este efeito pode estar relacionado à modulação de vias metabólicas e de proliferação celular. Reggiani *et al*. (2024) demonstraram que inibidores de BET podem atuar via BRD4 e SMAD3, afetando não apenas a ativação celular, mas também vias de proliferação. Adicionalmente, a redução de marcadores de exaustão pode contribuir para este fenômeno, considerando que células menos exaustas apresentam maior capacidade proliferativa.

Os resultados apresentados sugerem que a inibição epigenética via JQ1 pode otimizar múltiplos aspectos funcionais de células T, incluindo viabilidade, estado de diferenciação, perfil de exaustão e capacidade de expansão. Estas características são fundamentais para o sucesso da terapia celular adotiva, como destacado por Albarrán *et al*. (2024) em sua revisão sobre desafios atuais neste campo.

A abordagem de modulação epigenética oferece vantagens em relação a estratégias convencionais baseadas apenas em inibidores de checkpoints imunológicos. Como observado por Blank *et al*. (2019), estados avançados de exaustão envolvem alterações epigenéticas que

podem ser refratárias às terapias convencionais com ICIs. Neste contexto, a intervenção epigenética direta via JQ1 pode representar uma alternativa para casos de resistência a imunoterapias convencionais.

Os resultados obtidos com células CAR-T anti-CD19 expandem significativamente o potencial de aplicação da modulação epigenética via JQ1 no contexto da terapia celular adotiva. As células CAR-T representam uma das abordagens mais promissoras da imunoterapia, porém enfrentam desafios críticos relacionados à exaustão celular e limitada persistência, especialmente quando consideramos sua aplicação em tumores sólidos (Cappell & Kochenderfer, 2023).

A análise da coexpressão de TIM-3 e PD-1 em células CAR-T revelou uma redução significativa de células co-expressando esses marcadores após tratamento com JQ1, tanto em CD4<sup>+</sup> quanto em CD8<sup>+</sup> em função principalmente de TIM-3. Este efeito foi consistentemente observado ao longo de diferentes tempos de análise (7, 14 e 21 dias), demonstrando a capacidade do inibidor de sustentar a modulação fenotípica mesmo após estimulação prolongada. A persistência deste efeito é particularmente relevante considerando que a terapia com células CAR-T requer atividade funcional prolongada das células infundidas para controle tumoral efetivo.

Estes resultados com células CAR-T anti-CD19 são congruentes com estudos recentes que exploram abordagens epigenéticas para otimização de terapias celulares. Wang *et al.* (2023) demonstraram que a modulação de BET pode afetar programas transcricionais associados à diferenciação e exaustão de células T, enquanto Lam *et al.* (2023) observaram que a inibição epigenética de BET em células CAR-T direcionadas contra carcinoma hepatocelular resultou em aumento da citotoxicidade *in vivo*.

A tradução destes achados para o contexto clínico pode ser particularmente relevante para superar limitações atuais da terapia com células CAR-T, como destacado por Cappell & Kochenderfer (2023) em sua revisão sobre desfechos a longo prazo dessa abordagem de terapia celular. A capacidade do JQ1 de promover um fenótipo menos exausto em células CAR-T poderia potencialmente melhorar sua persistência e eficácia, especialmente em contextos onde a resistência à terapia está associada à perda de função das células infundidas.

A modulação observada tanto em células de doadores saudáveis quanto em TILs e células CAR-T sugere que esta abordagem pode ser aplicada em diferentes modalidades de terapia celular, com amplo espectro de aplicação clínica. Apesar dos resultados promissores, algumas limitações devem ser consideradas. Estudos *in vivo* serão fundamentais para avaliar a persistência e eficácia destas células em modelos tumorais, bem como potenciais efeitos adversos da modulação epigenética.

Nosso estudo abre a possibilidade de investigações mais aprofundadas dos efeitos do tratamento com JQ1 em células T, que incluem a investigação dos mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados, a avaliação da combinação de JQ1 com outras estratégias imunomoduladoras, e estudos de otimização de dose e regime de tratamento visando aplicação na produção de terapias adotivas.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a inibição epigenética pelo inibidor JQ1, que tem como alvo a proteína BRD4 pertencente à subfamília Bromodomínio Extra-Terminal (BET), demonstrou capacidade de modular o fenótipo de exaustão de células T do infiltrado tumoral bem como de células CAR-T e aumentou a capacidade antitumoral da terapia com células CAR-T.

O JQ1 mostrou-se eficaz na modulação da expressão de receptores inibitórios, reduzindo a expressão desses marcadores associados à exaustão tanto em células T de doadores saudáveis quanto em células CAR-T, bem como em TILs de pacientes com CRCC. Nas células T do infiltrado tumoral, o tratamento com JQ1 resultou em aumento significativo da viabilidade celular e maior capacidade de expansão dos TILs, aspectos cruciais para a aplicação clínica da terapia celular. Em células CAR-T, a modulação do perfil de exaustão dessas células refletiu em uma maior capacidade de destruição das células tumorais.

Estes resultados sugerem que a modulação epigenética via inibição de BET representa uma estratégia promissora para potencializar a ação antitumoral de linfócitos.

## REFERÊNCIAS

- ALBARRÁN, Víctor *et al.* Adoptive T cell therapy for solid tumors: current landscape and future challenges. *Frontiers in Immunology*, v. 15, artigo 1352805, mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1352805>. Acesso em: 27 fev. 2025.
- ANTONIOLI, Luca; PACHER, Pál; VIZI, E. Sylvester; HASKÓ, György. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 355-367, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>
- BLANK, Christian U. *et al.* Defining 'T cell exhaustion'. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, n. 11, p. 665-674, Nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0221-9>. Acesso em: 27 fev. 2025.
- CAPPELL, Kathryn M.; KOCHENDERFER, James N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 359-371, 13 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-023-00754-1>.
- CARVALHO, M. L. R. *et al.* Targeting PRC2 Enhances the Cytotoxic Capacity of Anti-CD19 CAR T Cells against Hematologic Malignancies. **Cancer Research**, v. 85, n. 12, p. 2234-2249, 2025.
- CIBRIÁN, Danay; SÁNCHEZ-MADRID, Francisco. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 47, n. 6, p. 946-953, jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201646837>.
- DUHEN, Thomas; DUHEN, Rebekka; MONTLER, Ryan; MOSES, Jake; MOUDGIL, Tarsem; MIRANDA, Noel F. de; GOODALL, Cheri P.; BLAIR, Tiffany C.; FOX, Bernard A.; MCDERMOTT, Jason E. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 327-345, 13 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05072-0>
- HAY, Zachary L. Z.; SLANSKY, Jill E.. Granzymes: the molecular executors of immune-mediated cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 1833-1845, 6 fev. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23031833>
- HOGG, S.J., BEAVIS, P.A., DAWSON, M.A. *et al.* Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity. **Nat Rev Drug Discov** v. 19, p. 776–800 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0077-5>
- HOU AJ, CHANG ZL, LORENZINI MH, ZAH E, CHEN YY. TGF- $\beta$ -responsive CAR-T cells promote anti-tumor immune function. **Bioeng Transl Med**. 2018 Jul 27;3(2):75-86. doi: 10.1002/btm2.10097. PMID: 30065964; PMCID: PMC6063867.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (EUA). First Cancer TIL Therapy Gets FDA Approval for Advanced Melanoma. Cancer Currents Blog, 5 mar. 2024. Disponível em: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2024/fda-amtagvi-til-therapy-melanoma>. Acesso em: 9 jun. 2025.

JOLLER, N.; ANDERSON, A. C.; KUCHROO, V. K. LAG-3, TIM-3, and TIGIT: Distinct functions in immune regulation. Gene Lay Institute of Immunology and Inflammation, Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School and Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA; Department of Quantitative Biomedicine, University of Zurich, 8057 Zurich, Switzerland

LAM, Maxine S. Y.; REALES-CALDERON, Jose Antonio; OW, Jin Rong; AW, Joey J. Y.; TAN, Damien; VIJAYAKUMAR, Ragavi; CECCARELLO, Erica; TABAGLIO, Tommaso; LIM, Yan Ting; CHIEN, Wang Loo. G9a/GLP inhibition during ex vivo lymphocyte expansion increases in vivo cytotoxicity of engineered T cells against hepatocellular carcinoma. **Nature Communications**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 327-345, 2 fev. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-36160-5>

LIN, L.; COUTURIER, J.; YU, X.; MEDINA, M. A.; KOZINETZ, C. A.; LEWIS, D. E. Granzyme B secretion by human memory CD4 T cells is less strictly regulated compared to memory CD8 T cells. *BMC Immunology*, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2014. MAHMOUD, Fade; SHIELDS, Bradley; MAKHOUL, Issam; AVARITT, Nathan; WONG, Henry K.; HUTCHINS, Laura F.; SHALIN, Sara; TACKETT, Alan J. Immune surveillance in melanoma: from immune attack to melanoma escape and even counterattack. **Cancer Biology & Therapy**. 18, 451-469 (2017).

PICAVET, L. W. et al. CBP/P300 Inhibition Impairs CD4+ T Cell Activation: Implications for Autoimmune Disorders. **Biomedicines**, v. 12, n. 6, p. 1344, 18 jun. 2024. DOI: 10.3390/biomedicines12061344.

REGGIANI, Francesca; TALARICO, Giovanna; GOBBI, Giulia; SAUTA, Elisabetta; TORRICELLI, Federica; MANICARDI, Veronica; ZANETTI, Eleonora; ORECCHIONI, Stefania; FALVO, Paolo; PIANA, Simonetta. BET inhibitors drive Natural Killer activation in non-small cell lung cancer via BRD4 and SMAD3. **Nature Communications**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 327-345, 22 mar. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-024-46778-8>

SCHEER, Sebastian; ACKLOO, Suzanne; MEDINA, Tiago S.; SCHAPIRA, Matthieu; LI, Fengling; WARD, Jennifer A.; LEWIS, Andrew M.; NORTHROP, Jeffrey P.; RICHARDSON, Paul L.; KANISKAN, H. Ümit. A chemical biology toolbox to study protein methyltransferases and epigenetic signaling. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 352-365, 3 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07905-4>.

STRACHOWSKA M, ROBASZKIEWICZ A. Characteristics of anticancer activity of CBP/p300 inhibitors - Features of their classes, intracellular targets and future perspectives of their application in cancer treatment. **Pharmacol Ther**. 2024 May;257:108636. doi: 10.1016/j.pharmthera.2024.108636. Epub 2024 Mar 22. PMID: 38521246.

VUONG, Lynda; KOTECHA, Ritesh R.; VOSS, Martin H.; HAKIMI, A. Ari. Tumor Microenvironment Dynamics in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 1349-1357, 1 out. 2019. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-19-0499>.

WANG, Fengdi; CHENG, Fanjun; ZHENG, Fang. Stem cell like memory T cells: a new paradigm in cancer immunotherapy. **Clinical Immunology**, [S.L.], v. 241, p. 109078, ago. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2022.109078>.

WANG, Zhi-Qiang; ZHANG, Zhao-Cong; WU, Yu-Yang; PI, Ya-Nan; LOU, Sheng-Han; LIU, Tian-Bo; LOU, Ge; YANG, Chang. Bromodomain and extraterminal (BET) proteins: biological functions, diseases, and targeted therapy. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 327-345, 6 nov. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-023-01647-6>.

WORBOYS, J. D. *et al.* TIGIT can inhibit T cell activation via ligation-induced nanoclusters, independent of CD226 co-stimulation. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 5016, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40755-3>. Acesso em: 9 jun. 2025.

XU, Weiqiang *et al.* The prognostic and predictive value of tumor infiltrating Macrophage and Neutrophil in patient with clear cell renal cell carcinoma: Tumor infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma. **Medicine**, v. 99, n. 46, p. e23181, 2020. DOI: 10.1097/MD.00000000000023181.

Yang, J. C. & Rosenberg, S. A. Adoptive T-cell therapy for cancer. *Advances in Immunology*, v. 130, p. 279-294, 2016. DOI: 10.1016/bs.ai.2015.12.006.

ZEBLEY, Caitlin C.; ZEHN, Dietmar; GOTTSCHALK, Stephen; CHI, Hongbo. T cell dysfunction and therapeutic intervention in cancer. **Nature Immunology**, [S.L.], p. 327-345, 18 jul. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-024-01896-9>

ZHANG, Pengchao; ZHANG, Guizhong; WAN, Xiaochun. Challenges and new technologies in adoptive cell therapy. **Journal Of Hematology & Oncology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 327-345, 18 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-023-01492-8>

ZHONG, Mengjun; GAO, Rili; ZHAO, Rucong; HUANG, Youxue; CHEN, Cunte; LI, Kehan; YU, Xibao; NIE, Dingrui; CHEN, Zheng; LIU, Xin. BET bromodomain inhibition rescues PD-1-mediated T-cell exhaustion in acute myeloid leukemia. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 327-345, 2 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC.