

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente  
Área de Oncologia

**Inibidores Epigenéticos como Reguladores de Linfócitos T CD8<sup>+</sup>  
Humanos**

**Amanda Rondinelli**

Orientador: **Tiago da Silva Medina**

São Paulo

2023

**Rondinelli, Amanda .**

**Inibidores Epigenéticos como Reguladores de Linfócitos T CD8+ humanos. / Amanda Rondinelli. São Paulo, 2023.**

**52f.**

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

**Orientador: Tiago da Silva Medina.**

**1. Linfócitos T CD8, 2. Modulação Epigenética, 3. Células CAR T**

**CDU 616**

**Amanda Rondinelli**

## **Inibidores Epigenéticos como Reguladores de Linfócitos T CD8<sup>+</sup> Humanos**

**Aprovado em: 13/12/2023**

### **Banca examinadora**

Orientador: Dr. Tiago da Silva Medina

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Aline Cristiane Planello

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Membro da banca: Rodrigo Nalio Ramos

Instituição: Universidade de São Paulo

Membro da banca: Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Instituição: Ac Camargo Cancer Center

## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de auxílio à Pesquisa – 88887.818058/2023-00

## AGRADECIMENTOS

Início os agradecimentos pelos meus pais Celso Rondinelli e Marilda Borba Rondinelli, que além de me proporcionarem a oportunidade de realizar minha graduação, sempre me apoiaram em minhas decisões, porém dando aquele empurrãozinho em direção ao caminho ideal. Eu amo muito vocês e nada nunca será o suficiente para agradecer todo apoio e amor que vocês me dão. Agradeço também a minha irmã Gabi Rondinelli não poderia ter irmã melhor do que você, esteve ao meu lado 100% do tempo e ao meu cunhado Gustavo Gukovas, que durante esses dois anos me deram muito apoio, me ajudaram com dicas financeiras, com conversas e principalmente com moradia em finais de semana e as vezes durante a semana, eu amo muito vocês, obrigada por tudo.

Agradeço também a todos meus amigos de dentro e fora do laboratório. Mari, Gi, Aninha, que são minhas irmãs de outra mãe, aos meus amigos Get, Zaque e Lucas, obrigada amigos por sempre me apoiarem, me ouvirem, aturarem meus surtos, por me colocarem no chão e estarem do meu lado sempre que precisei. Aos meus amigos do laboratório, por me ajudarem tanto durante esses 4 anos, por me fazerem rir no dia-dia no laboratório, cada barzinho, almoços que fomos, vocês foram essenciais para eu chegar aonde estou. Um agradecimento em especial a Lets por ser uma amiga maravilhosa e sempre presente me ajudando com tudo e a Malu que em poucos meses se tornou essencial no meu dia a dia, altas risadas juntas. Obrigada amigos, por tudo.

Agradeço imensamente a Mari e a Ari nossas técnicas maravilhosas, que me ajudaram muito durante meu mestrado e me proporcionaram muitas risadas, impossível descrever o quanto vocês foram importantes nesse trajeto. Vocês são maravilhosas. E um agradecimento eterno ao meu orientador Tiago Medina, que sem ele não teria tido a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, de aprender o quanto eu aprendi nesses 4 anos dentro do seu grupo, obrigada Tiago, por ter me aceitado em seu grupo e por me orientar esses anos todos.

## RESUMO

Rondinelli, Amanda. **Inibidores Epigenéticos como Reguladores de Linfócitos T CD8 Humanos**. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

Linfócitos T CD8 são células chave na resposta antitumoral. Uma vez ativadas, sofrem mudanças epigenéticas, adquirem fenótipos distintos e sua função está ligada ao potencial citotóxico e produção de mediadores inflamatórios. Porém, na resposta antitumoral, tais células encontram-se disfuncionais. Assim, estratégias capazes de reprogramar as células T CD8 podem aumentar sua eficácia. Inibidores epigenéticos são capazes de modular o perfil de células T CD4, mas os efeitos em células T CD8 ainda não estão totalmente esclarecidos. Portanto, buscamos identificar possíveis inibidores epigenéticos que sejam capazes de modular a atividade e o perfil fenotípico de linfócitos T CD8. Para tal, células T CD8 foram isoladas por *sorting* a partir de PBMC de doadores saudáveis e cultivados em placas de 96 poços na presença de coquetel de ativação (DynaBeads anti-CD3/CD28, IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes) e 1 $\mu$ M de diferentes inibidores epigenéticos (MS023, A485, L-MOSES, A-196, GSKLSD1, A366). Linfócitos T CD8 não estimulados e linfócitos T CD8 ativados na ausência de inibidores epigenéticos foram utilizados como controles. Após 4 ou 8 dias de cultura, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliação de marcadores ligados à ativação (CD69), função (IFN- $\gamma$  e granzima B), diferenciação (CCR7, CD45RA) e exaustão (PD-1, TIGIT). As células foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSymphony A5, e a análise estatística foi feita através do software GraphPad Prism 9. Realizamos ensaios *in vitro* nos quais células T CD8 foram ativadas na presença ou não de diferentes inibidores, com um deles apresentando intenso potencial de modular células T CD8: o A485, um inibidor seletivo do bromodomínio p300/CBP. Os nossos dados mostram que o A485 aumentou a ativação celular, evidenciado pelo aumento da frequência de células TCD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>. Este inibidor também foi capaz de modular o fenótipo de memória das células T, polarizando-as para um perfil TN/TSCM, diferentemente do controle e dos outros inibidores, que induziram um perfil TEM (células T efetoras de memória). Após oito dias, o tratamento com o inibidor A485 resultou em menor frequência de células PD-1<sup>+</sup> e de células TIGIT<sup>+</sup> em comparação com o controle. De relevância clínica, o inibidor A485 foi capaz de modular células CAR-T anti-CD19 isoladas de produtos de infusão, aumentando a frequência do marcador CD69 e modulando seu perfil fenotípico, menos diferenciado, em comparação ao controle. Além disso, o inibidor A485 potencializou a ação antitumoral das células CAR-T anti-CD19 em ensaios de co-cultura com a linhagem celular Daudi CD19<sup>+</sup>. Em resumo, os nossos dados mostram que a inibição de p300/CBP induz um perfil TN/TSCM em células T CD8 ativadas e em células CAR-T, potencializando as suas atividades antitumorais. Posto que a retenção do perfil TN/TSCM favorece o controle tumoral, esses achados podem ter implicações clínicas para pacientes com doenças hematológicas e com tumores sólidos.

**Palavras-Chave:** Linfócitos T CD8; Modulação Epigenética; Imunoterapia; Células CAR-T.

## ABSTRACT

Rondinelli, Amanda. **Epigenetic Inhibitors as Regulators of Human CD8 T Lymphocytes**. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

CD8 T lymphocytes are key cells for the induction of antitumor responses. Once activated, these cells undergo epigenetic changes, acquire distinct phenotypes, and their function is linked to the production of cytotoxic and inflammatory mediators. However, these cells are dysfunctional within the tumor microenvironment. Therefore, strategies capable of reprogramming CD8 T cells can enhance their antitumor efficacy. Previous studies have shown that epigenetic inhibitors can modulate the profile of CD4 T cells, but the effects on CD8 T cells are still to be clarified. Thus, we aimed to identify possible epigenetic inhibitors that can modulate the activity and phenotype of CD8 T lymphocytes. To do this, CD8 T lymphocytes were isolated by cell sorting from healthy blood samples and cultured in 96-well plates in the presence of a polyclonal stimulatory cocktail (i.e., anti-CD3/CD28 DynaBeads, recombinant (r)IFN- $\gamma$ , and rIL-2) along with 1 $\mu$ M of different epigenetic inhibitors (i.e., MS023, A485, L-MOSES, GSKLSD1, and A366). Unstimulated CD8 T lymphocytes and polyclonally-stimulated CD8 T lymphocytes in the absence of epigenetic inhibitors were used as controls. After 4 or 8 days of culture, the cells were analyzed by flow cytometry for the assessment of cell markers related to activation (CD69), function (IFN- $\gamma$  and granzyme B), differentiation (CCR7 and CD45RA) and exhaustion (PD-1 and TIGIT). Cells were acquired by the BD FACSymphony A5 cytometer, and statistical analyses were done using the GraphPad Prism 9 software. First, we conducted *in vitro* assays in which CD8 T cells were activated in the presence or absence of different inhibitors. A485, a p300/CBP bromodomain inhibitor, showed a potent modulatory effect on CD8 T cells. The inhibitor A485 increased T cell activation, observed by the increased frequency of CD69<sup>+</sup> CD8 T cells. This inhibitor could also modulate the T cell memory phenotype, polarizing them towards a TN/TSCM profile, unlike the control and the other inhibitors, which polarized them towards to the TEM (effector memory T cells) profile. When the analyses were conducted after eight days of culture, we observed that the treatment with the A485 inhibitor resulted in a lower frequency of PD-1<sup>+</sup> and TIGIT<sup>+</sup> T cells compared with CD8 T cells activated in the absence of the inhibitor. Of clinical relevance, A485 was able to modulate anti-CD19 CAR-T cells isolated from pre-infusion products by positively regulating the frequency of CD69<sup>+</sup> CAR-T cells and modulating their memory phenotype, keeping these cells less differentiated. In addition, A485 potentiated the *in vitro* antitumor activity of anti-CD19 CAR-T cells in co-culture assays with the CD19<sup>+</sup> Daudi cell line. In summary, our data show that the p300/CBP inhibition induces the TN/TSCM profile in CD8 T cells and CAR-T cells, thus boosting their antitumor activities. Since the TN/TSCM phenotype has been shown to be favorable for tumor control, these findings can be of clinical interest for patients with hematological malignancies and solid tumors.

**Keywords:** CD8 T lymphocytes; Epigenetic modulation; Immunotherapy; CAR-T cells.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação entre o sistema imune e as células tumorais.	2
Figura 2. Reconhecimento antigênico e ativação de células T CD8 com capacidade citotóxica.	4
Figura 3. Etapas e estados celulares observados durante a diferenciação de células T CD8 <sup>+</sup> humanas após o reconhecimento antigênico.	7
Figura 4. Modulação Epigenética em Histonas.	9
Figura 5. Fluxo de trabalho das diferentes etapas do protocolo experimental.	12
Figura 6. Condições de estímulo e tratamento com inibidores epigenéticos utilizadas nos ensaios in vitro com células T CD8 <sup>+</sup> humanas.	15
Figura 7. Estratégia de gates utilizada para a análise de diferentes marcadores em células TCD8 <sup>+</sup> humanas após a estimulação in vitro na presença de inibidores epigenéticos.	19
Figura 8. Screening da modulação de células T CD8 <sup>+</sup> efectoras com diferentes inibidores epigenéticos.	21
Figura 9. O inibidor epigenético A485 modula o fenótipo de diferenciação de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> humanos, induzindo um perfil de memória stem-cell.	23
Figura 10. Análise por redução de dimensionalidade, após o tratamento de células T CD8 <sup>+</sup> efectoras com os inibidores epigenéticos.	25
Figura 11. O inibidor epigenético A485 modula o fenótipo de diferenciação de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> humanos, induzindo um perfil Naïve/Stem-cell memory.	26
Figura 12. Inibidor A485 é capaz de modular a expressão de marcadores funcionais em células T CD8 após 8 dias de cultura.	29
Figura 13. Células T CD8 naives estimuladas na presença de A485 aumentam a expressão de marcador de ativação e reduzem a expressão de grânulos citotóxicos.	30
Figura 14. Células T CD8 naives estimuladas por 8 dias na presença de A485 diminuem a frequência de TIGIT e PD-1.	31
Figura 15. Células T CD8 naives estimuladas por 4 dias na presença de A485 retêm o fenótipo de memória stem-like.	33
Figura 16 O tratamento com o inibidor A485 é capaz de aumentar a capacidade proliferativa de células T CD8 <sup>+</sup> efectoras.	35
Figura 17 O perfil fenotípico TSCM em células T CD8 <sup>+</sup> ativadas com estímulo policlonal é mantido após o tratamento com o inibidor A485.	37
Figura 18 O inibidor A485 aumenta a frequência de células CAR-T expressando o marcador de ativação CD69, sem promover aumento de marcadores de exaustão celular.	39
Figura 19 Após re-estímulo policlonal, o inibidor A485 aumenta a frequência de células CAR-T CD4 <sup>+</sup> expressando CD69, sem impactar o seu perfil fenotípico e de exaustão.	40
Figura 20 Após re-estímulo policlonal, o inibidor A485 aumenta a frequência de células CAR-T CD8 <sup>+</sup> expressando CD69 e de células com o perfil de memória central, sem impactar o seu perfil de exaustão.	42
Figura 21 Análise visual da proliferação em células CAR T tratadas com o inibidor A485.	43
Figura 22. O inibidor A485 potencializa substancialmente a capacidade antitumoral de células CAR-T anti-CD19 em ensaio de co-cultura com linhagem de linfoblastos de células B CD19 <sup>+</sup> .	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

**APC** – Célula Apresentadora de Antígeno

**BD** – Becton Dickinson

**CAR** – Receptor de Antígeno Quimérico (do inglês – Chimeric Antigen Receptor)

**CBP** – CREB Binding Protein

**CD** – Cluster de Diferenciação (do inglês, Cluster of Differentiation)

**CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa

**CIPE** – Centro Internacional de Pesquisa

**CTV** – do inglês, Cell Trace Violet

**CXCL** – do inglês, chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**EDTA** – do inglês, Ethylenediamine Tetraacetic Acid

**FSC** – do inglês, Forward Scatter

**FT** – Fator de Transcrição

**GZMB** – Granzima B

**IFN- $\gamma$**  – Interferon- $\gamma$

**IL** – Interleucina

**LLA** – Leucemia Linfoblástica Aguda

**LSD1** – Desmetilase 1 Específica da Lisina

**MHC** – Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, Major Histocompatibility Complex)

**PBMC** – Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês, Peripheral Blood Mononuclear Cells)

**PBS** – Tampão Fosfato Salino (do inglês, Phosphate Buffered Saline)

**PCAF** – Fator Associado a p300/CBP (do inglês, The p300/CBP Associated Factor)

**PD-1** – Proteína de Morte Celular Programada-1

**PRF-1** – Perforina-1

**PRMT** – Proteína Arginina Metiltransferase

**RPMI** – Instituto Roswell Park Memorial

**SFB** – Soro Bovino Fetal

**TCM** – Célula T de Memória Central

**TCR** – Receptor de Células T

**TEFF** – Células T Efetoras

**TEM** – Células T de Memória Efetora

**TEMRA** – Células T de Memória Efetora Expressando RA

**TIGIT** – do inglês, T Cell Immunoglobulin and ITIM domain

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral

**TSCM** – Células T de Memória Stem-like

**tSNE** –do inglês, t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding

**TN** – Células T Naive

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A Biologia do Câncer .....	1
1.2 Resposta Imune contra tumores.....	2
1.2.1 Sistema Imune.....	2
1.2.2 Resposta Imune de Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> .....	3
1.2.3 Subtipos de Células T CD8 <sup>+</sup> .....	5
1.3 Modulação Epigenética.....	7
1.3.1 Estrutura da Cromatina e as Modificações de Histonas .....	7
1.3.2 Modulação Epigenética em Células Imunes Utilizando Inibidores Químicos.....	8
1.4 Terapia de Células T com Receptor de Antígeno Quimérico .....	10
2. JUSTIFICATIVA .....	11
3. OBJETIVO GERAL .....	12
3.1 Objetivos Específicos.....	12
4. METODOLOGIA.....	12
4.1 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico de Indivíduos Saudáveis .....	13
4.2 Isolamento de Células TCD8 <sup>+</sup> Naïves e Células TCD8 <sup>+</sup> Totais .....	13
4.3 Cultura de Células T CD8 <sup>+</sup> e Tratamento com Inibidores Epigenéticos .....	14
4.4 Ensaios de Citometria de Fluxo Multiparamétrica .....	15
4.5 Ensaios de Proliferação .....	16
4.6 Tratamento in vitro de Células CAR-T de Pacientes com Neoplasias Hematológicas com Inibidores Epigenéticos .....	17
5. RESULTADOS .....	18
5.1 Screening de Inibidores Epigenéticos Capazes de Modular Células T CD8 <sup>+</sup> Humanas .....	18
5.2 O inibidor A485 Induz as Células T CD8 <sup>+</sup> a um Fenótipo stem cell-like memory após 4 dias de Estímulo.....	22
5.3 A inibição Seletiva de CBP/p300 por Meio do Tratamento das Células T CD8 <sup>+</sup> com A485 Mantém as Células em Estágios mais Precoces de Diferenciação após 8 dias de Estímulo .....	25
5.4 Células T CD8 <sup>+</sup> Naïves Estimuladas na Presença do Inibidor A485 são Moduladas de Forma Semelhante ao Observado em Células T CD8 <sup>+</sup> Totais.....	29
5.5 O Tratamento com o Inibidor A485 Aumenta a Capacidade Proliferativa de Células T CD8 <sup>+</sup> Humanas .....	34
5.6 O Tratamento com o Inibidor A485 é Capaz de Modular Células CAR-T anti-CD19.....	38
6. DISCUSSÃO .....	44
7. CONCLUSÃO .....	49
REFERÊNCIAS .....	50

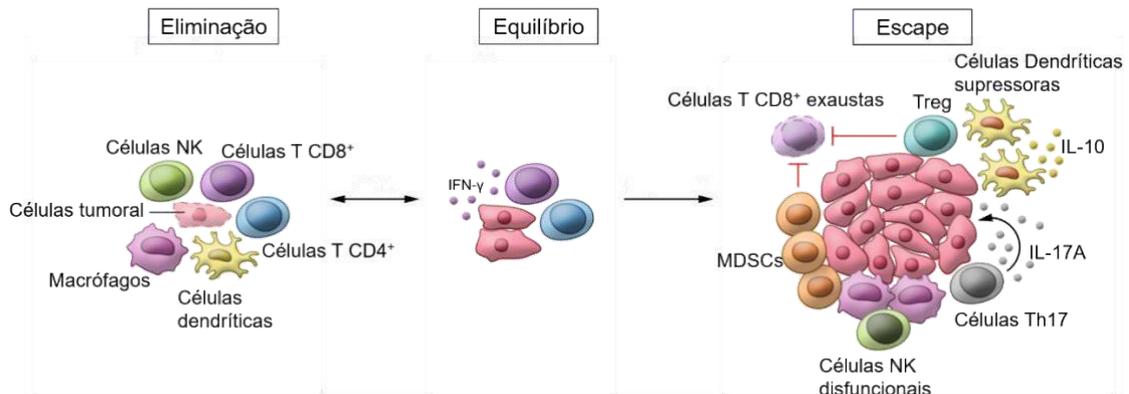
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A Biologia do Câncer

O crescimento descontrolado de células anormais, principal característica tumoral, é um processo resultante de mutações genéticas. As mutações genéticas podem alterar genes relacionados à proliferação e morte celular, levando à expansão descontrolada dessas células e dando origem ao tumor (CREE IA., 2011). Dentre estes genes, encontram-se os oncogenes, envolvidos no processo de divisão celular anormal, e os genes supressores de tumor que, ao contrário dos oncogenes, atuam no controle do crescimento tumoral e promovem a morte celular programada, processo conhecido como apoptose (STOWERS et al., 1987). Além disso, as células tumorais produzem mediadores pró-angiogênicos, que contribuem para formação de novos vasos sanguíneos que irrigam o microambiente tumoral e, assim, fornecem nutrientes e oxigênio suficientes para o crescimento tumoral (MIZUKAMI et al., 2012).

Durante o processo de desenvolvimento tumoral, há o surgimento da resposta imune antitumoral, na tentativa de controlar e erradicar o tumor. Numa ação coordenada entre células da imunidade inata e da imunidade adaptativa, as células imunes iniciam a fase de eliminação tumoral. Células NK, de maneira independente, conseguem reconhecer e eliminar células tumorais a partir de um desequilíbrio entre os sinais de ativação e de inibição oriundos de receptores celulares. Uma vez que os sinais de ativação se sobressaiam aos de inibição, as células NK destroem as células tumorais por meio da sua atividade citotóxica. A supressão de moléculas de MHC-I em células tumorais, como mecanismo de escape da ação citotóxica de linfócitos T CD8, pode ser reconhecida pelas células NK, que eliminam as células tumorais. À medida que a resposta se desenvolve, as células apresentadoras de antígenos, sobretudo as células dendríticas, podem expressar antígenos tumorais em moléculas de MHC-I/II e apresentá-los aos linfócitos T CD4 e T CD8. Ao serem ativados, os linfócitos T CD4 produzem citocinas inflamatórias, que promovem o recrutamento de células imunes efetoras para o microambiente tumoral, como forma de amplificar a inflamação local. Além disso, os linfócitos T CD8 podem reconhecer as células tumorais e eliminá-las através de mecanismos citotóxicos. Embora a eliminação de clones tumorais altamente imunogênicos seja feita de maneira bastante eficiente por células imunes efetoras, clones tumorais pouco imunogênicos são normalmente resistentes à ação antitumoral da resposta imune. A morte de clones

imunossensíveis durante a fase de equilíbrio seleciona clones imune evasivos, ou seja, clones capazes de escapar da resposta imunológica, dando início à fase de escape tumoral (MINNIE; HILL, 2020). Na fase de escape, os mecanismos supressores tumorais subvertem o sistema imune, favorecendo a indução de células imunes supressoras, o que auxilia o crescimento tumoral. Portanto, compreender os mecanismos de evasão imune do tumor e o desenvolvimento de imunoterapias capazes de restaurar a imunidade antitumoral é essencial.



**Figura 1. Interação entre o sistema imune e as células tumorais.** A interação imunológica com as células tumorais pode ser dividida em três fases bem distintas: eliminação, equilíbrio e escape. Durante a fase de eliminação, as células do sistema imune são capazes de combater eficientemente as células tumorais altamente imunogênicas. Na fase de equilíbrio, células tumorais pouco imunogênicas conseguem resistir à ação do sistema imune; esta é uma fase de intensa instabilidade genômica. Já o escape é caracterizado por células que adquiriram variação genética e conseguiram escapar do sistema imunológico. Adaptado de: Minnie, S & Hill, G - J Clin Invest. 2020.

## 1.2 Resposta Imune contra tumores

### 1.2.1 Sistema Imune

O sistema imune pode ser didaticamente dividido em dois eixos inter-relacionados: a imunidade inata, primeira a agir e com uma resposta mais rápida e, posteriormente, a imunidade adaptativa, mediada pela ação efetora dos linfócitos. A imunidade adaptativa pode ser dividida em dois tipos de imunidade: a imunidade humoral, mediada por linfócitos B, e a imunidade celular, mediada pelos linfócitos T (Abbas et al., 2019.).

As células B produzem anticorpos responsáveis por reconhecer antígenos tumorais, neutralizá-los e opsonizá-los, o que facilita a eliminação de células tumorais por fagócitos e pelo sistema complemento. Os linfócitos T, por outro lado, atuam através do reconhecimento de antígenos estranhos apresentados complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) expresso na superfície de células nucleadas (MHC-I) ou na superfície de células apresentadoras de

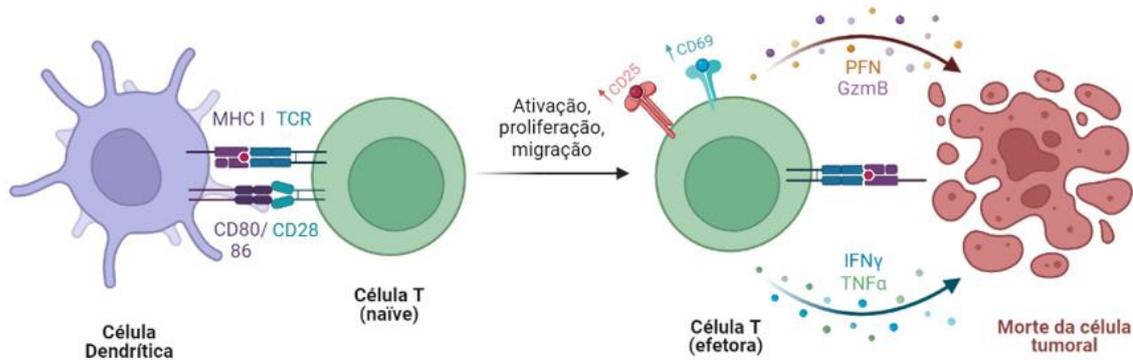
antígeno profissionais (MHC-II) (Abbas et al., 2019). Os linfócitos T possuem diferentes subtipos, dentre os quais podem ser destacados os linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares, que atuam principalmente no controle e na orquestração da resposta imune, e os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, responsáveis pela produção de moléculas capazes de eliminar células alteradas, sendo, portanto, a principal defesa contra células tumorais (XU et al., 2018). As células T CD4<sup>+</sup> apresentam especificidade para moléculas de MHC de classe II (MHC-II); já as células T CD8<sup>+</sup> apresentam especificidade para moléculas de MHC de classe I (MHC-I) (TAKADA; JAMESON, 2009).

### **1.2.2 Resposta Imune de Linfócitos T CD8<sup>+</sup>**

As células T CD8<sup>+</sup> têm sido alvo constante de imunoterapias contra o câncer, sobretudo pela sua capacidade de eliminar células transformadas (VATAKIS et al., 2011). As células dendríticas fagocitam antígenos tumorais e através desse mecanismo são capazes de processar e apresentar peptídeos tumorais. Ao apresentá-los, as células dendríticas ativam linfócitos T CD4 e T CD8, que passam a desempenhar suas atividades antitumorais. Após o reconhecimento antigênico expresso por células dendríticas via MHC-I, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> aumentam a expressão de CD69, uma proteína responsável por retê-los dentro dos órgãos linfoides secundários, onde recebem sinais para iniciar os processos de proliferação e diferenciação em células T efetoras. Outra molécula de superfície que passa a ser expressa por essas células após o contato com antígeno é o receptor de IL-2, conhecido como CD25. O fator de crescimento IL-2, ao se ligar ao seu receptor, emite sinal de proliferação, sobrevivência e manutenção das células T funcionais (Fig. 2) (Abbas et al., 2019).

Por serem altamente móveis, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> conseguem facilmente migrar através dos tecidos, onde reconhecem células tumorais. O receptor de célula T (TCR) reconhece o complexo peptídeo-MHC-I, formando a chamada sinapse imunológica (BIJLSMA et al., 2007). Durante essa interação célula-célula, o citoesqueleto de actina é reorganizado para a periferia da sinapse, enquanto o centróssomo e os grânulos líticos movem-se para o centro da sinapse imunológica. Quando o centróssomo se movimenta em direção à sinapse imunológica, os grânulos líticos são liberados na fenda sináptica, agindo sobre a célula-alvo. Nesse instante, ocorre a liberação de duas proteínas, a perforina e a granzima. A perforina age na membrana da célula-alvo, formando grandes poros transmembrânicos, o que facilita a entrada e a difusão de granzimas no citoplasma (VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI,

2015). Já as granzimas são moléculas pró-apoptóticas que atuam na ativação da via das caspases. A granzima B, dentre outras granzimas, é a mais eficaz, com uma atuação rápida e eficiente sobre células tumorais ou infectadas (Figura 2, à direita).



**Figura 2. Reconhecimento antigênico e ativação de células T CD8 com capacidade citotóxica.** Após o reconhecimento antigênico mediado por células dendríticas, as células T CD8 naïves são ativadas, sofrem proliferação clonal, adquirem capacidade migratória e passam a expressar os receptores CD25 e CD69. Essas células também passam a produzir e liberar grânulos citotóxicos, como granzima B e perforina-1, assim como os mediadores inflamatórios IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Imagem produzida no Biorender.

Além de granzimas e perforinas, as células T CD8<sup>+</sup> também produzem mediadores inflamatórios, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (JOHANSSON; PRICE; MODO, 2008; NIELL; MAUER; RADEMACHER, 1994), citocinas capazes de induzir e manter o perfil de resposta Th1 de células TCD4<sup>+</sup>, normalmente envolvido com o melhor prognóstico em cânceres. Esses mediadores também são capazes de induzir a polarização de macrófagos para um perfil M1. Os macrófagos de perfil M1 possuem a capacidade de apresentação de antígeno, promovem a secreção de mediadores pró-inflamatórios, ainda possuem também uma capacidade aprimorada de agir contra patógenos intracelulares e células tumorais (Zhang et al., 2022). Além disso, a citocina TNF- $\alpha$  também induz o aumento da expressão de MHC-I, favorecendo a apresentação antigênica (Tanabe et al., 2010). Outra função característica de linfócitos T CD8 produtores de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é a secreção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10, que estão normalmente envolvidas com o recrutamento de células Th1, células NK e T CD8<sup>+</sup> citotóxicas para o microambiente tumoral (NAGARSHETH; WICHA; ZOU, 2017). Portanto, a indução e manutenção de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas no microambiente tumoral é essencial para o controle da tumorigênese.

### 1.2.3 Subtipos de Células T CD8<sup>+</sup>

Após a ativação, as células T CD8<sup>+</sup> se proliferam e adquirem capacidade funcional, podendo apresentar diferentes fenótipos. A diferenciação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em diferentes subtipos é um processo complexo que envolve sinais co-estimulatórios, ativação de diferentes fatores de transcrição (FT) e liberação de citocinas no microambiente no qual se encontram as células T CD8<sup>+</sup>. Esses fatores interagem para direcionar a polarização dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em subtipos efetores ou de memória, adaptando-se às necessidades específicas da resposta imunológica (HENNING; ROYCHOUDHURI; RESTIFO, 2018). As células TCD8<sup>+</sup> que ainda não sofreram a ativação via reconhecimento do complexo peptídeo – MHC I na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs), usualmente células dendríticas, são chamadas células naives. Essas células se encontram em um estado de repouso e possuem um papel crucial na resposta imunológica, pois representam uma reserva de células para a montagem de novas respostas contra ameaças à homeostasia do organismo (Dorfman & Germain, 2002.). As células T naives estão em constante circulação pela corrente sanguínea e órgãos linfoides, em um processo de imunovigilância e, uma vez ativadas pelas APCs, sofrem expansão clonal e se diferenciam em células efectoras e de memória (APPAY; SAUCE, 2014).

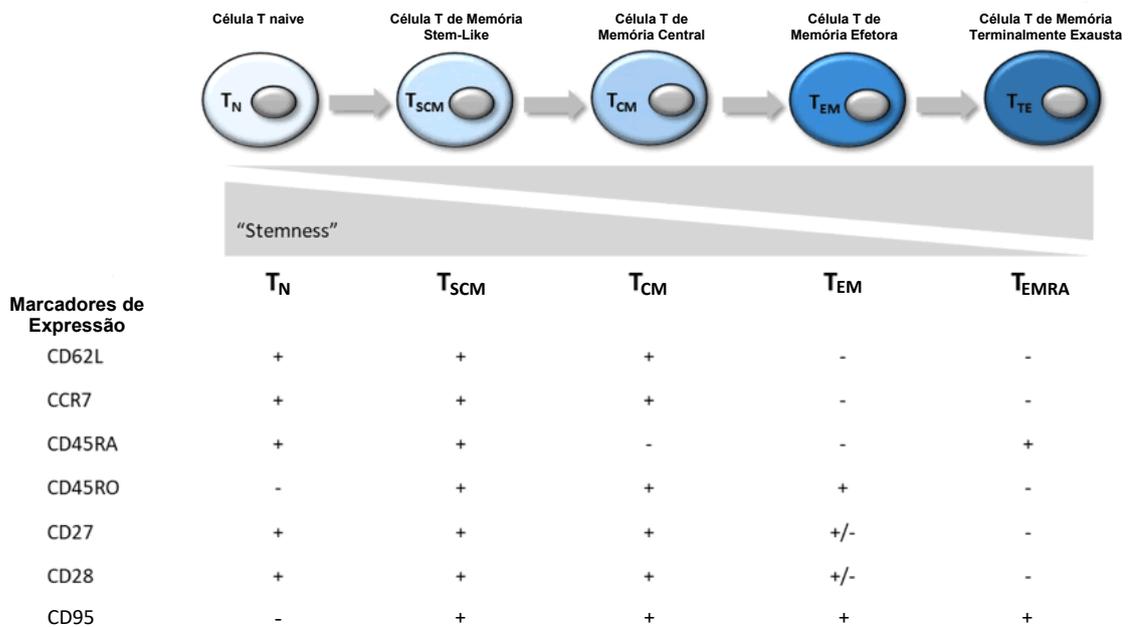
Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores desempenham atividade citotóxica na resposta imunológica, agindo contra células infectadas e células tumorais. Apesar de possuírem características semelhantes a níveis molecular, epigenético, metabólico e funcional, as células de memória persistem a longo prazo e possuem alta capacidade proliferativa após o reencontro com antígeno, enquanto as células efectoras sofrem contração celular robusta após a eliminação antigênica (KNÖRCK et al., 2022). As células T precursoras de memória, diferentemente das células T efectoras de vida curta (TEFF), podem se diferenciar em distintos subtipos, como o de memória efetora (TEM), de memória central (TCM), de memória terminalmente exaustas (TEMRA) e de memória *stem-like* (TSCM), (SAMJI; KHANNA, 2017).

As células T CD8<sup>+</sup> de memória central expressam predominantemente altos níveis de IL-2, expandem-se de maneira clonal e são capazes de se diferenciar em TEFF e em células T efectoras de memória (TEM), (MATOS et al., 2022). Já as células TEM, em comparação com as células TCM, são menos proliferativas e secretam grandes quantidades de moléculas efectoras, incluindo IFN- $\gamma$  e perforina-1 (SAMJI; KHANNA, 2017). Um outro subtipo de células de memória são as células de memória terminalmente exaustas (TEMRA), que possuem

capacidade de expressar em abundância mediadores citotóxicos e moléculas relacionadas à exaustão celular e, em comparação com as células TEM, são altamente diferenciadas, possuem baixa resposta antigênica e baixa proliferação, características de células terminalmente exaustas (STRICKLAND et al., 2023). Descrito pela primeira vez em infecção viral crônica e associada à persistência antigênica prolongada, a exaustão, estado caracterizado por diminuição na funcionalidade celular, com reduzida capacidade proliferativa, citotóxica e de liberação de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , compromete a eliminação antigênica e favorece a apoptose linfocitária. A rigor, o processo de exaustão celular cursa com o aumento na expressão de receptores inibitórios, como PD1 e LAG-3, facilitando o escape das células tumorais à vigilância imunológica (DOLINA et al., 2021). Sob o prisma epigenético, essas células possuem alterações por todo o seu genoma, com regiões do DNA diferencialmente acessíveis, quando comparado com as células TEFF (SALUMETS et al., 2022). O comprometimento epigenético visto sobretudo em células T terminalmente exaustas é de difícil reversão, o que contribui para a formação de um ambiente supressor propício para o crescimento tumoral e ao mesmo tempo dificulta a atuação das células imunes efetoras. O processo de desenvolvimento das células T exaustas é caracterizado por mecanismos de transcrição, expressão gênica, alterações metabólicas e regulação epigenética. Essas particularidades apoiam o conceito de que as células T terminalmente exaustas apresentam um estado da cromatina que é distinto daquele observado em células T efetoras. Portanto, estratégias que modifiquem o estado da cromatina são apontadas como as mais promissoras para a reversão do estado de exaustão das células T CD8<sup>+</sup>, com o intuito de restabelecer sua ação citotóxica contra o tumor e promover o desenvolvimento racional de imunoterapias efetivas contra o câncer. Mais recentemente, um subtipo de células T CD8<sup>+</sup> de memória que vem ganhando grande importância no campo das imunoterapias são os linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória *stem like* (TSCM). Estas células apresentam um estado menos diferenciado, caracterizado pela preservação do seu fenótipo de “células-tronco” (do inglês, stemness), tornando-as mais resistentes à ação do tempo, condição esta que possibilita a geração de respostas imunes de longa duração, com capacidade de autorrenovação e diferenciação em outros subtipos, como em células TCM e, em sequência, em células TEM (XU et al., 2015). Além disso, possuem baixo nível de produção de moléculas efetoras, como granzimas e perforinas, encontradas em outros subtipos de células T CD8<sup>+</sup> de memória. Juntas, essas características conferem aos linfócitos

T CD8<sup>+</sup> TSCM uma maior capacidade de manutenção da memória imunológica a longo prazo, o que pode ser interessante no campo da imunoterapia (VAHIDI et al., 2020).

Fenotipicamente, os diferentes subtipos de diferenciação de células TCD8<sup>+</sup> podem ser classificados por meio da expressão de um conjunto de marcadores de superfície, como descrito na Figura 3, abaixo.



**Figura 3. Etapas e estados celulares observados durante a diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> humanas após o reconhecimento antigênico.** À medida que reconhecem antígenos tumorais, as células T CD8<sup>+</sup> humanas naïves passam por uma série de transformações fenotípicas e funcionais, podendo expressar diferentes marcadores celulares e apresentar diferentes características ao longo da diferenciação linfocitária. Por exemplo, células com perfil de memória stem-like adquirem a expressão de CD95, preservam características de *stemness* e são menos diferenciadas que os outros fenótipos. As células T de memória central perdem a expressão de CD45RA, retêm parcialmente as características de *stemness*, enquanto são mais diferenciadas do que as células com perfil de memória stem-like. As células T de memória efetora perdem a expressão de CD62L, CCR7 e CD45RA, retêm poucas características de *stemness*, são mais diferenciadas e com características de células efetoras. Por fim, as células de memória terminalmente exaustas são as mais diferenciadas e apresentam características de exaustão celular, com capacidade efetora reduzida. *Adaptado de Alyssa Master, 2018.*

### 1.3 Modulação Epigenética

#### 1.3.1 Estrutura da Cromatina e as Modificações de Histonas

A epigenética age na regulação da atividade gênica sem promover qualquer alteração na sequência de DNA e é responsável por determinar a acessibilidade dos genes, tornando-os ativos ou inativos, definindo, assim, a identidade celular. As mudanças epigenéticas medeiam a plasticidade celular, promovendo a reprogramação celular (WILSON C, B. 2009). Esse processo é dinâmico e reversível, sendo capaz de estabilizar e manter fenótipos

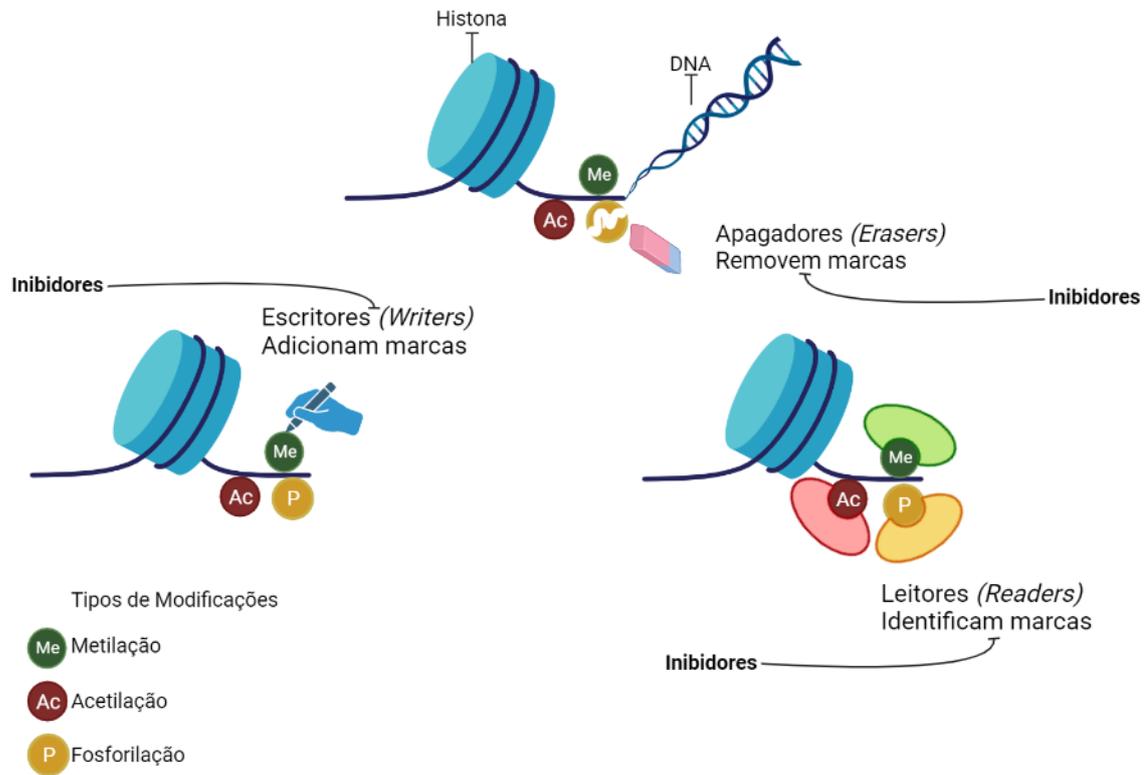
celulares (SPEISER; HO; VERDEIL, 2016). Dentro das células, o DNA é empacotado no estado de cromatina e envolvido ao redor de proteínas chamadas histonas, um componente central da subunidade nucleossômica que forma um octâmero contendo as quatro principais histonas: H1, H2, H3 e H4 (PHILIP et al., 2017). Cada uma dessas histonas apresenta uma cadeia curta (cauda) contendo em torno de 30 aminoácidos, sujeita a várias modificações pós-traducionais (PMTs, do inglês *post-translational modifications*), como acetilação, metilação, fosforilação, entre outras.

Dentre essas modificações, a acetilação de histonas tem surgido como um elemento regulador fundamental da biologia celular, promovendo ativação gênica, enquanto a metilação pode ter efeitos ativadores ou repressivos. Essas e outras modificações determinam a acessibilidade à cromatina, dessa forma determinando a acessibilidade de sítios de ligação na molécula de DNA a fatores de transcrição (XU et al., 2015). Sendo assim, a metilação do DNA e as PTMs das histonas podem, juntos, ser regulados para controlar o estado transcricional de uma célula, alterando a acessibilidade da cromatina e determinando a expressão gênica. Essas e outras modificações são induzidas por metiltransferases distintas, removidas por demetilases específicas e reconhecidas por famílias de proteínas que se ligam especificamente a marcadores metil-lisina (MENDENHALL E,M. 2013). Conhecidos como leitores (*readers*), escritores (*writers*) e apagadores (*erasers*) de histona, esses marcadores compõem um grupo de proteínas-alvo com potencial para terapias futuras, já que podem ser inibidos farmacologicamente, mas cujo papel na biologia do câncer ainda precisa ser mais bem caracterizado (HOGG et al., 2020).

### **1.3.2 Modulação Epigenética em Células Imunes Utilizando Inibidores Químicos**

O sistema imune adaptativo exibe uma notável plasticidade fenotípica durante a resposta imune, e o processo de indução e manutenção das células imunes é fortemente controlado pela indução de fatores de transcrição específicos para cada linhagem. Porém, a capacidade desses FT de se ligar ao DNA é dependente da acessibilidade à cromatina. Sendo assim, está claro que os mecanismos epigenéticos desempenham um papel crítico na regulação das alterações transcricionais, associadas à diferenciação de células T CD8<sup>+</sup>, sendo essencial para a indução de uma resposta imune antitumoral sustentada e eficiente, e estratégias que visem a modulação epigenética de linfócitos para maior eficácia antitumoral possuem considerável potencial terapêutico (SPEISER; HO; VERDEIL, 2016).

Uma possível ferramenta de modulação do epigenoma de células T CD8<sup>+</sup> é a utilização de inibidores epigenéticos com potência biológica bem definida. Estes inibidores são capazes de interagir com uma proteína específica, inibindo-a rápida e reversivelmente (Figura 4) (DHANAK; JACKSON, 2014).



**Figura 4. Modulação Epigenética em Histonas.** Representação das possíveis alterações epigenéticas que podem ocorrer e onde ocorrem a ação de inibidores epigenéticos. As proteínas conhecidas com *writers* são responsáveis por adicionar grupos químicos na fita de DNA, como a metilação, que irá compactar a cromatina, dificultando o acesso à região do DNA onde a marca for adicionada, impedindo a transcrição dos genes codificados naquela região. Já a acetilação de determinada região torna acessível aquela região da cromatina, permitindo a transcrição gênica. As proteínas conhecidas como *Erasers* são responsáveis por remover essas marcas, podendo assim modular a transcrição gênica local. O grupo de *Readers* é responsável por interpretar a marca adicionada à determinada região. Já os inibidores agem nessas proteínas impedindo sua ação na fita de DNA. Imagem produzida no Biorender.

A capacidade modulatória dos inibidores epigenéticos pode, dentre outros efeitos, potencializar a função celular, o que já foi demonstrado em trabalhos anteriores. Por exemplo, um estudo recente demonstrou a capacidade modulatória de diferentes inibidores epigenéticos sobre a função e polarização de células T CD4<sup>+</sup> murinas e humanas (SCHEER et al., 2019). Sendo assim, uma possível estratégia para a potencialização da resposta antitumoral seria a utilização de inibidores

epigenéticos, na tentativa de modular a resposta células T CD8<sup>+</sup>, com o objetivo de torná-las mais eficientes no contexto da imunidade antitumoral.

Alguns inibidores já foram identificados como potenciais moduladores celulares, como o MS023 – um potente inibidor de PRMT's humanas do tipo 1, responsáveis por catalisar a dimetilação assimétrica de resíduos de arginina de histonas (ERAM et al., 2016); o L-MOSES – inibidor do brodomínio PCAF (Fator associado ao bromodomínio p300/CBP), um inibidor responsável por interromper a interação de PCAF com a histona 3 (MOUSTAKIM et al., 2017); o A485 – um inibidor catalítico do domínio p300/CBP, que age como co-ativador transcricional em diversos processos celulares (LASKO et al., 2017); o GSKLSD1 – inibidor responsável por interromper a atividade de LSD1 (Desmetilase 1 específica da lisina), que é uma histona demetilase nuclear (ALSAQER et al., 2017); e o A366 – potente inibidor da histona metiltransferase G9A, responsável pela metilação ou dimetilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9) (KHANBAN; FATTAHI; TALKHABI, 2019). No entanto, o potencial modulatório destes inibidores sobre células T CD8 humanas permanece desconhecido.

#### **1.4 Terapia de Células T com Receptor de Antígeno Quimérico**

Os CARs são moléculas projetadas para direcionar células T de maneira não restrita ao complexo MHC, através de gene quiméricos de receptores de células T. Os CARs possuem um ectodomínio de fragmento variável de cadeia única (scFv) para reconhecer o antígeno, um endodomínio responsável pela sinalização com intracelular, composta pelo domínio CD3 $\zeta$ . A construção do CAR passou por gerações que diferem na região do endodomínio.(ESHAR et al., 1993) A primeira geração de CAR possui apenas o domínio CD3 $\zeta$ , que apresentou carência na persistência dessas células. Levando em consideração a baixa persistência das células CAR T de primeira geração, a segunda geração de células CAR T passaram a apresentar um domínio co-estimulatório, incorporando moléculas co-estimuladoras como CD28 ou 4-1BB, conferindo as células de segunda geração os dois sinais necessários para ativação completa de uma célula T. A adição dessas moléculas promoveu significativamente as células CAR T uma maior expansão e persistência. O CAR de terceira geração tem em sua composição duas moléculas co-estimuladoras, enquanto o de quarta geração

foi combinado com outras proteínas acessórias, como quimiocinas. Mesmo com a geração de diferentes CARs, o mais utilizado continua sendo o de segunda geração (TOMASIK; JASIŃSKI; BASAK, 2022)

A aprovação da utilização de terapias com células CAR T, no Brasil aprovada em 2020 pela ANVISA apresenta uma série de barreiras a serem enfrentadas, como o alto custo para produção, por tanto estratégias que possam reduzir o custo dessa terapia, é uma estratégia muito visada para o futuro da terapia gênica. Apesar uma parcela significativa de pacientes com leucemia e linfoma de grandes células B terem apresentado resposta completa ao tratamento, o que tem revolucionado o tratamento de neoplasias hematológicas (MAVI et al., 2023), um considerável número de pacientes, mais de 50%, com doenças hematológicas ou de tumores sólidos não se beneficiam das terapias com células CAR-T (BEIDER et al., 2022). Dentre os problemas a serem enfrentados na imunoterapia com células CAR-T, destaca-se a hostilidade do microambiente tumoral, um microambiente imunossupressor que dificulta o bom funcionamento de linfócitos T, promovendo a exaustão celular, assim comprometendo as respostas imunes antitumorais de longa duração. Destacam-se também a baixa capacidade migratória das células CAR-T para o sítio tumoral e a dificuldade em identificar um antígeno-alvo específico que seja expresso universalmente por tumores sólidos (DAGAR et al., 2023a). Tendo em vista os empasses que esse tratamento possui, estratégias de modulação do epigenoma dessas células podem ser capazes de potencializar sua ação antitumoral.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Tem-se demonstrado que as mudanças no programa intracelular de células imunes presentes no microambiente tumoral, causadas pela inflamação crônica, são orquestradas por mecanismos epigenéticos. Sabendo-se que as mudanças epigenéticas são reversíveis, nós acreditamos que a modulação do epigenoma é uma abordagem promissora capaz de potencializar a resposta antitumoral de células TCD8<sup>+</sup>. Posto que a utilização de inibidores epigenéticos em células T CD4<sup>+</sup> foi capaz de modular sua polarização e função, nós investigamos neste estudo o efeito de diferentes inibidores epigenéticos sobre linfócitos T CD8<sup>+</sup> humanos, a fim de

identificar alvos terapêuticos capazes aumentar a resposta antitumoral de linfócitos TCD8<sup>+</sup>.

### 3. OBJETIVO GERAL

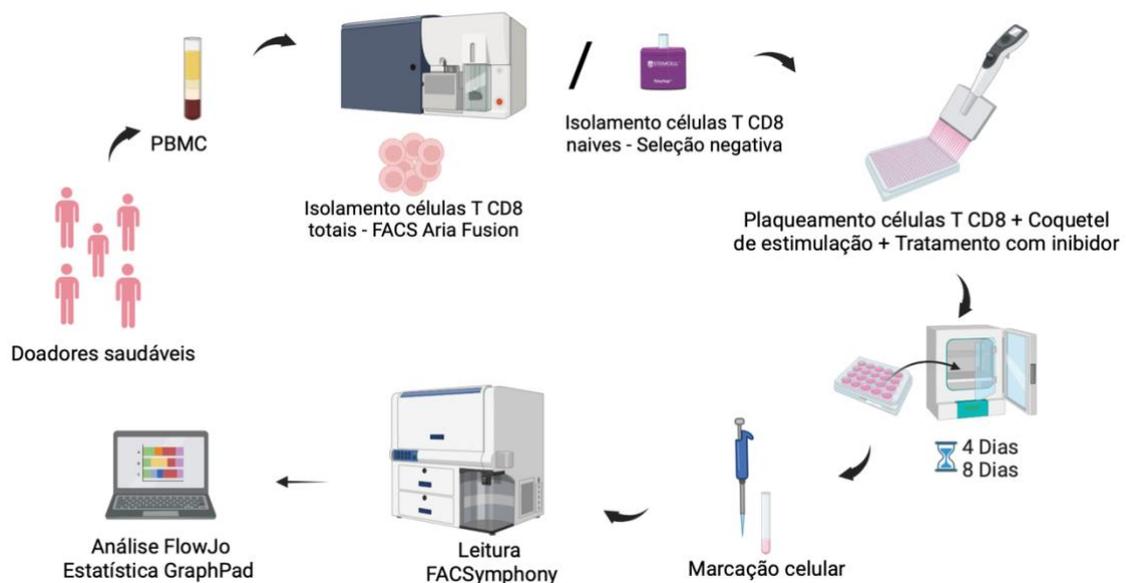
Identificar possíveis inibidores epigenéticos que sejam capazes de modular a atividade e o perfil fenotípico de linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Realizar um *screening in vitro* com diferentes inibidores epigenéticos em células TCD8<sup>+</sup> totais, avaliando-se a modulação da expressão de marcadores de ativação, função e de diferenciação celular;
- Analisar o efeito de inibidores selecionados a partir do *screening* na modulação de células T CD8<sup>+</sup> naíves de doadores saudáveis;
- Analisar o efeito de inibidores selecionados a partir do *screening* na modulação de células CAR-T de pacientes com neoplasias hematológicas.

### 4. METODOLOGIA

Para um melhor entendimento do desenho experimental deste estudo, todas as etapas dos protocolos utilizados encontram-se ilustradas na Figura 5, a seguir.



**Figura 5. Fluxo de trabalho das diferentes etapas do protocolo experimental.** Inicialmente, foi realizada a coleta de sangue de doadores saudáveis e obtenção das células mononucleares

(PBMCs). A partir das PBMCs, foram obtidas i) células T CD8<sup>+</sup> totais por meio de sorting celular ou ii) células T CD8<sup>+</sup> naïves por meio de seleção negativa. As células obtidas foram então estimuladas *in vitro* (com dynabeads anti-CD3/CD28, IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes) na presença ou não de diferentes inibidores epigenéticos. Após 4 ou 8 dias de cultura, as células foram coletadas, submetidas à marcação com anticorpos e imediatamente analisadas por citometria de fluxo multiparamétrica (FACSymphony A5, BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando-se os softwares FlowJo e GraphPad Prism 9. Imagem produzida no Biorender.

#### **4.1 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico de Indivíduos Saudáveis**

Inicialmente, coletamos sangue de doadores saudáveis de ambos os sexos e idade entre 20-50 anos para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico, PBMC (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). O isolamento dessas células foi feito por meio de separação por densidade em gradiente de centrifugação Ficoll-Paque (GE Healthcare). Para isto, o sangue obtido em tubos contendo EDTA foi centrifugado a 400g, por 10 minutos, à temperatura ambiente, e o plasma foi, então, desprezado. A seguir, a fração sanguínea remanescente foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS-1x) (Sigma – Aldrich) e, então, dispensada sobre a camada de Ficoll na proporção 2:1, sem que houvesse mistura dos componentes. A amostra foi, em seguida, centrifugada (25 minutos, 20°C, 2200 rpm, com aceleração 1 e freio 0), e o anel de PBMC foi coletado, transferido para um novo tubo e lavado com PBS-1x. As células obtidas foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando azul de Trypan (Sigma), e congeladas em solução contendo 90% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich). As células foram armazenadas em nitrogênio líquido e descongeladas no momento da realização dos ensaios *in vitro*. Todos os procedimentos envolvendo amostras humanas realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do A.C. Camargo Cancer Center (processo 2710/19).

#### **4.2 Isolamento de Células TCD8<sup>+</sup> Naïves e Células TCD8<sup>+</sup> Totais**

Para a realização dos ensaios *in vitro* com células T CD8<sup>+</sup> estimuladas na presença de diferentes inibidores epigenéticos, as PBMC foram descongeladas em banho-maria (37°C) e imediatamente transferidas para um tubo contendo 10mL de meio RPMI (Sigma) suplementado (10% SFB e 1% penicilina/estreptomicina). As células foram, em seguida, centrifugadas (400g, 10 minutos, temperatura ambiente),

lavadas em PBS e ressuspensas em meio RPMI suplementado, diluídas em azul de Trypan e contadas em câmara de Neubauer.

Para o *screening* inicial, as células T CD8<sup>+</sup> totais foram isoladas por *sorting* celular. Para tanto, as células foram marcadas com o corante de viabilidade Sytox Green (Invitrogen) e os seguintes anticorpos: anti-CD45 (PerCP5.5 – BD Pharmigen), anti-CD8 (PE), anti-CD3 (APC – Biolegend), anti-CD56 (PE-Cy7 – BD Pharmigen) e anti-CD4 (APC-Cy7 – Biolegend). As células foram incubadas a 4°C, durante 40 minutos, ao abrigo da luz e, em seguida, lavadas em PBS-1x e ressuspensas em PBS-1x suplementado com 10% de SFB. As células TCD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> viáveis) foram isoladas em citômetro FACS Aria (BD Biosciences), lavadas e imediatamente utilizadas nos ensaios *in vitro*.

Para os ensaios posteriores, células T CD8<sup>+</sup> naïves foram obtidas utilizando o kit de seleção negativa EasySep™ Human Naïve CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation kit II (StemCell Technologies), seguindo as especificações do fabricante.

#### **4.3 Cultura de Células T CD8<sup>+</sup> e Tratamento com Inibidores Epigenéticos**

Para a análise do potencial modulatório de diferentes inibidores epigenéticos sobre linfócitos T CD8<sup>+</sup>, realizamos ensaios *in vitro* utilizando tanto células T CD8<sup>+</sup> naïves quanto células T CD8<sup>+</sup> totais. Para tanto, as células foram cultivadas em placas não aderentes de fundo em U (cento e cinquenta mil células/poço) em um volume final de 200 µL de meio RPMI (ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina + estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram, então, estimuladas com coquetel contendo Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies) na proporção de 3:1 (célula:bead), IL-2 [10ng/mL] (BioLegend) e IFN-γ [20ng/mL] (BioLegend) recombinantes, na presença ou não de 1µM dos inibidores epigenéticos. Além disso, células TCD8<sup>+</sup> não estimuladas e cultivadas somente na presença de IL-2 recombinante foram utilizadas como controle negativo. As células foram mantidas em cultura a 37°C por 4 ou 8 dias e, após estes períodos, foram coletadas para análise por citometria de fluxo multiparamétrica.

As condições de tratamento analisadas encontram-se esquematizadas na Figura 6, a seguir.

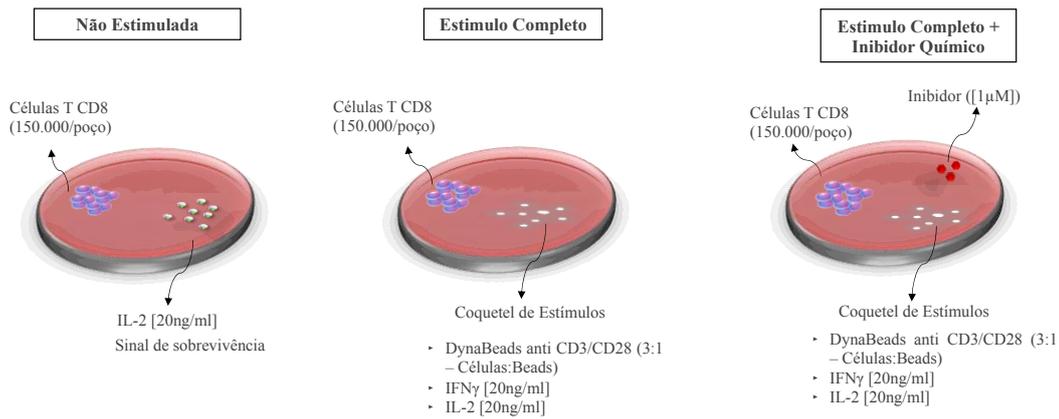


Imagem produzida em PowerPoint

**Figura 6. Condições de estímulo e tratamento com inibidores epigenéticos utilizadas nos ensaios *in vitro* com células T CD8<sup>+</sup> humanas.** Para a análise do potencial modulatório de diferentes inibidores epigenéticos sobre as células TCD8<sup>+</sup> humanas, foram utilizadas as seguintes condições: (i) células T CD8<sup>+</sup> não estimuladas, cultivadas na presença de IL-2 recombinante (controle negativo – esquerda); (ii) células T CD8<sup>+</sup> estimuladas com coquetel contendo beads anti-CD3/CD28, IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes (controle positivo – meio) e (iii) células T CD8<sup>+</sup> estimuladas com coquetel contendo beads anti-CD3/CD28, IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes na presença de 1 $\mu$ M de diferentes inibidores epigenéticos (condições teste – direita).

#### 4.4 Ensaios de Citometria de Fluxo Multiparamétrica

A fim de analisarmos os efeitos do tratamento com diferentes inibidores epigenéticos sobre a ativação, função e diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> humanas, realizamos ensaios de citometria de fluxo após o estímulo *in vitro*. Nos ensaios de *screening* das potenciais sondas com efeito modulatório, após 4 dias de estimulação em cultura, as células foram incubadas com inibidor de transporte proteico (*BD GolgiStop*) durante 4 horas a 37°C, junto com o marcador CD107a (PE – Biolegend). Após o período de incubação, as células foram coletadas, e as beads anti-CD3/CD28 foram retiradas utilizando uma coluna magnética, para não haver nenhuma interferência na marcação das amostras. As células foram, então, lavadas em PBS-1x e, em seguida, marcadas com o *dye* de viabilidade *Fixable Viability Stain BV570* (BD Horizon), incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e novamente lavadas com PBS-1x. Após esta etapa, seguimos para a marcação de antígenos de superfície com anti-CD8 (BV650 – BD Horizon) e anti-CD69 (BUV805 – BD OptiBuild), os quais foram incubados por 30 minutos a 4°C. As células foram então lavadas em PBS-1x, fixadas e permeabilizadas utilizando tampão *BD Cytotfix/Cytoperm* de acordo com as instruções do fabricante (BD Pharmingen). Após lavagem com solução *Perm/Wash*,

as células foram marcadas com anti-IFN- $\gamma$  BV605 – BD Horizon e anti-Granzima B BV510 – BD Horizon. A marcação intracelular foi realizada por 30 minutos a 4°C e, após este período, as células foram novamente lavadas com solução Perm/Wash e ressuspensas em 300 $\mu$ L de PBS-1x.

Após o *screening* de diferentes inibidores epigenéticos, realizamos outros ensaios de citometria de fluxo, a fim de verificarmos a modulação fenotípica e a expressão de marcadores de exaustão em células T CD8<sup>+</sup> humanas. Para isso, os ensaios de citometria de fluxo foram realizados após 4 e 8 dias de cultura, seguindo o mesmo protocolo descrito acima, porém com algumas modificações. Desse modo, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD8 (BUV496 – BD Horizon), anti-CD69 (BUV805 – BD OptiBuild), anti-CD45RA (AlexaFluor700 – BD Pharmigen), anti-CD27 (BV421 – BD Horizon), anti-CD95 (BB515 – BD Horizon), anti-PD-1 (BUV737 – BD Horizon), anti-TIGIT (PeDazzle – Biolegend) e anti-CCR7 (PeCy-7 – BD Pharmigen), sendo este último adicionado isoladamente, antes dos demais anticorpos de superfície e incubado por 10 minutos a 37°C, e anti-Granzima B (BV510 – BD Horizon), após fixação e permeabilização. Para o experimento utilizando células T CD8 naives, utilizamos o seguinte painel anti-CD8 (BUV496 – BD Horizon), anti-CD69 (BV421 – BD Horizon), anti-perforina-1 (PE – BD Pharmigen), anti-CD45RA (AF700 – BD Pharmigen), anti-CCR7 (PeCy7 – BD Pharmigen) anti-granzima B (BV510 – BD Horizon), anti-PD1 (BUV737 – BD Horizon), anti-TIGIT (PE Daz-le - Biolegend), anti-CD127 (BV786 – BD Horizon), anti-CD95 (BB515 – BD Horizon).

As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACSymphony A5 (BD Biosciences), e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo v10 (BD Biosciences). Foram utilizados controles FMO durante as análises.

#### **4.5 Ensaios de Proliferação**

Para analisarmos a capacidade proliferativa das células T CD8<sup>+</sup> após tratamento com inibidores epigenéticos, realizamos ensaio *in vitro* utilizando células T CD8<sup>+</sup> naives marcadas com *Cell Trace Violet* (–TV - ThermoFisher Scientific). Para isso, as células T CD8<sup>+</sup> naives foram isoladas conforme descrito anteriormente, lavadas e incubadas com 1mL de solução de CTV diluído em PBS-1x por 20 minutos a

37°C. Após este período, adicionamos às células 4mL de meio RPMI contendo 10% de SFB e, novamente, realizamos uma etapa de incubação de 5 minutos a 37°C, para a inibição do corante não incorporado às células. Após marcação, as células foram lavadas em PBS-1x, contadas em câmara de Neubauer e mantidas *in vitro* na presença do estímulo policlonal e dos tratamentos descritos anteriormente. Após 8 dias de cultura, as células foram coletadas, e a diluição de CTV foi analisada por citometria de fluxo.

#### **4.6 Tratamento *in vitro* de Células CAR-T de Pacientes com Neoplasias Hematológicas com Inibidores Epigenéticos**

Após a seleção de potenciais inibidores epigenéticos capazes de potencializar a resposta dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, partimos para ensaios utilizando células CAR-T advindas de produtos de infusão de pacientes com Leucemia Linfoblástica aguda (LLA) e Linfoma Não-Hodgkin tratados no AC Camargo Cancer Center. Para a realização destes ensaios, as bolsas que seriam descartadas após a infusão foram coletadas, as células remanescentes foram obtidas por meio de lavagem com PBS-1x e deixadas em repouso na estufa por 3 horas até a realização dos experimentos, que ocorreram de maneira semelhante ao descrito anteriormente. Sucintamente, as células T isoladas foram estimuladas com dynabeads anti-CD3/CD28 na presença de IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes na presença de 1uM dos inibidores com potencial modulatório selecionados no *screening*. Após o estímulo por 7 dias, as células T foram marcadas com o painel de anticorpos descrito anteriormente, porém com a adição de anticorpo anti-CAR (AF647 – CytoArt), que nos permitiu analisar os efeitos dos inibidores epigenéticos sobre as células T CAR<sup>+</sup>.

#### **4.7 Ensaio de citotoxicidade de células CAR T tratadas com o inibidor A485, em co-cultura com células Daudi.**

Para o ensaio de citotoxicidade celular, as células CAR-T derivadas do produto de infusão de pacientes com linfoma não-Hodgkin tratados no hospital A.C Camargo foram mantidas em cultura com estímulo policlonal (dynabeads anti-CD3/CD28) na proporção de 1:5 (célula:bead), além de IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes na presença ou ausência do inibidor epigenético A485. Após 7 dias foi realizada a contagem de células utilizando a câmara de Neubauer e retirada uma alíquota para análise dos

seguintes marcadores por citometria de fluxo, viabilidade (BV570 – BD Horizon), CD3 (FITC – Biolegend) e CAR (AF647 – CytoArt).

A partir da contagem realizada na câmara de Neubauer, visando o número absoluto de células e frequência de CAR, realizamos os cálculos para definirmos o número de células plaqueadas em cada condição, normalizando para que todas recebam o mesmo número de células CAR+. Já as células alvo, Daudi, são mantidas em cultura em meio RPMI 10% SFB e, no dia da co-cultura, foram lavadas, contadas e plaqueadas em placa de 96 poços fundo U. Para todas as condições, plaqueamos 100.000 Daudi / poço. A partir disso, plaqueamos as células do produto de infusão de modo a se obter uma proporção células CAR+ / Daudi 1:1 ou 0,2:1 (volume final de 200ul).

As co-culturas foram então deixadas em estufa por 24h ou 7 dias. Após estes períodos, as células são coletadas para marcação por citometria de fluxo (viabilidade – BV570, CD19 – APC-H7 (BD Pharmigen), CD20 – PE (BD Pharmigen), CD3- FITC (Biolegend)) para a análise da morte de células CD19+CD20+CD3-.

#### 4.8 Análise Estatística

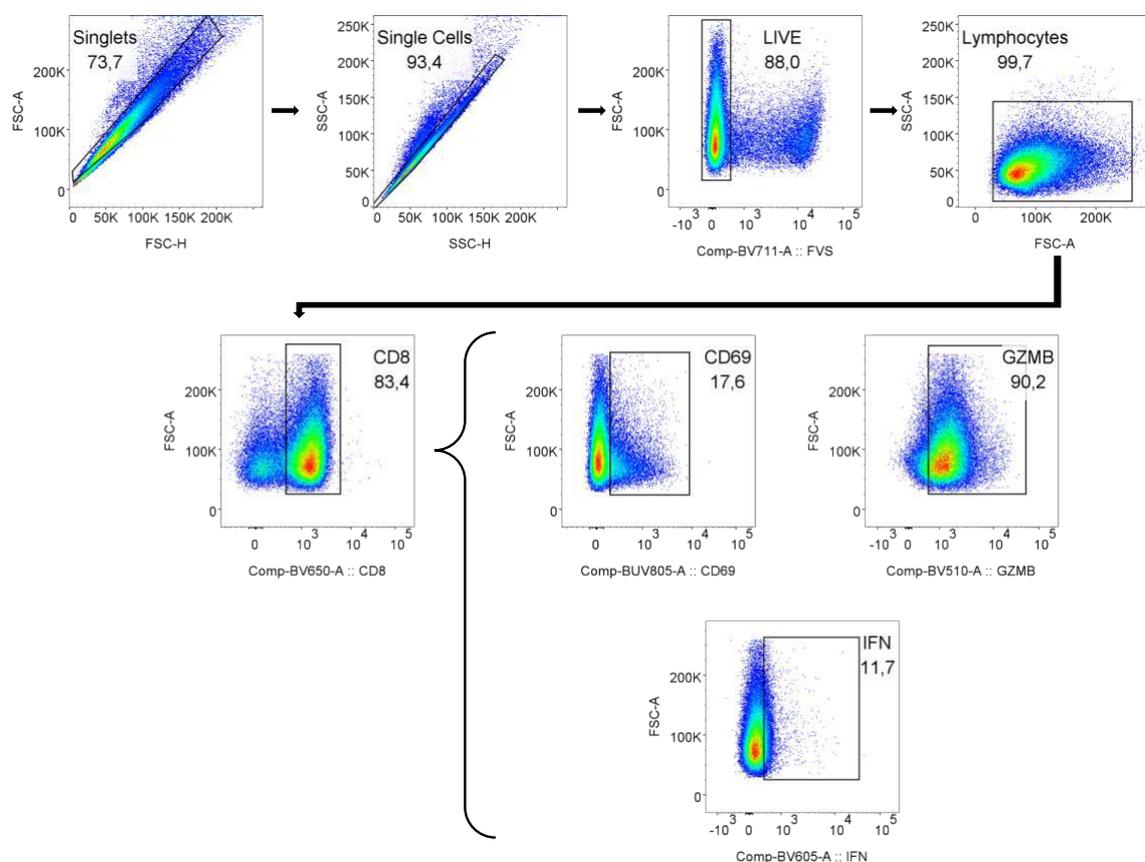
Os dados foram gerados e analisados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 9. Foi realizado o teste ANOVA (one way) quando analisados mais de dois grupos, enquanto o teste t de *Student* pareado foi utilizado em comparações entre as condições tratadas com o inibidor epigenético e controle não tratado. Em todos os testes, consideramos significativo um valor de  $p < 0.05$ .

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 *Screening* de Inibidores Epigenéticos Capazes de Modular Células T CD8<sup>+</sup> Humanas

A fim de encontrarmos possíveis moduladores da atividade de células TCD8<sup>+</sup> humanas, realizamos, em um primeiro momento, um *screening in vitro* no qual células T CD8<sup>+</sup> de doadores saudáveis foram estimuladas na presença ou não de diferentes inibidores epigenéticos. Para isso, linfócitos T CD8<sup>+</sup> totais foram isolados por meio de *sorting* em citômetro de fluxo e estimulados utilizando-se um coquetel

contendo *dynabeads* anti-CD3/CD28, IL-2 e IFN- $\gamma$  recombinantes, na presença ou não de 1 $\mu$ M dos inibidores: MS023, L-MOSES, A485, GSKLSD1 e A366. Após 4 dias de cultura, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo. A fim de investigarmos os efeitos dos inibidores testados sobre a ativação e função de células TCD8<sup>+</sup>, analisamos inicialmente a expressão de CD69 (molécula conhecida como marcador de ativação celular e associada à retenção tecidual de células T ativadas), IFN- $\gamma$  (citocina pró-inflamatória), granzima B (proteína indutora de citotoxicidade celular) e CD107a (marcador de degranulação). A estratégia de *gates* utilizada em nossas análises encontra-se ilustrada na Figura 7, abaixo.

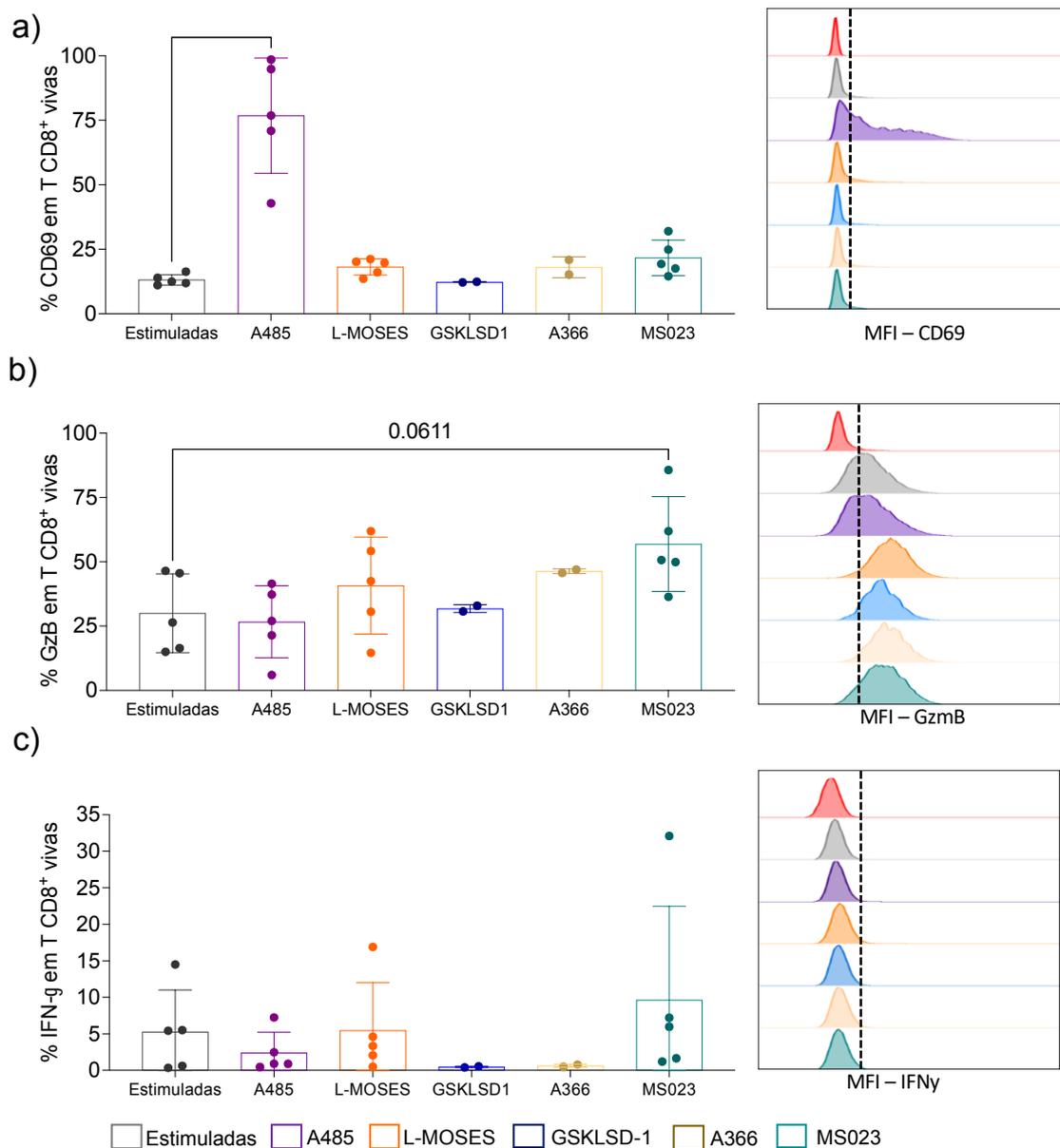


**Figura 7. Estratégia de gates utilizada para a análise de diferentes marcadores em células TCD8<sup>+</sup> humanas após a estimulação *in vitro* na presença de inibidores epigenéticos.** Visando a exclusão de possíveis *doublets*, identificamos inicialmente os *singlets*, analisando-os isoladamente. Em seguida, utilizando o marcador de viabilidade FVS575, excluimos a população de células mortas. Dentro de células vivas, identificamos apenas a população de linfócitos (células pequenas e pouco granulosas), analisando-se os parâmetros relativos ao tamanho e à complexidade das células. Utilizando o anticorpo anti-CD8, identificamos apenas a população de linfócitos T CD8, que são nossas células de interesse. Dentro de linfócitos, identificamos a população de células expressando cada marcador utilizado nesse estudo (i.e., CD107a, IFN- $\gamma$ , granzima B, CD69 etc.).

A partir do tratamento de células T CD8<sup>+</sup> totais com os diferentes inibidores epigenéticos, observamos que o inibidor A485 foi capaz de aumentar a ativação

celular, evidenciado pelo aumento robusto da frequência de células T CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> em comparação com as células T CD8 estimuladas na ausência de inibidores ou na presença dos outros inibidores testados (Fig. 8A). Por outro lado, o estímulo das células na presença do inibidor MS023 foi o único tratamento capaz de aumentar a frequência de células CD8<sup>+</sup> granzima B<sup>+</sup> em relação às células T efetoras (Fig. 8B). Os inibidores testados não tiveram efeito sobre a frequência de células T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> após a estimulação celular (Fig. 8C). Os outros inibidores testados, A366, GSKLSD1 e L-Moses, por sua vez, não demonstraram efeito sobre nenhum dos marcadores analisados (Fig. 8).

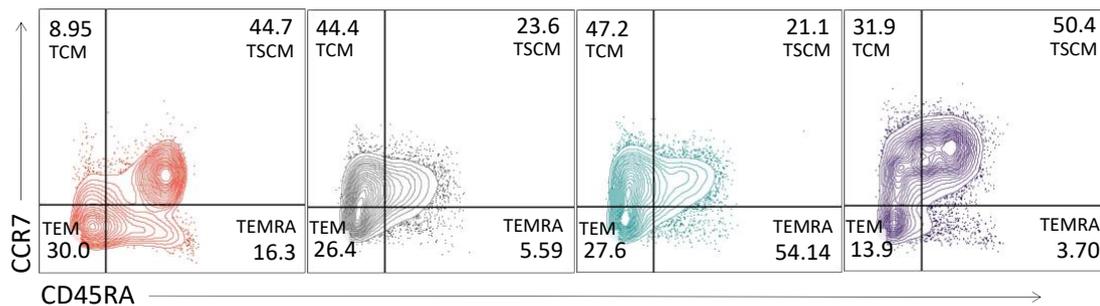
Em resumo, a partir deste *screening*, foi possível identificarmos dois inibidores capazes de modular a resposta de células T CD8<sup>+</sup> humanas: o A485, que modulou a ativação celular, e o MS023, que aumentou a frequência de células T CD8 expressando Granzima B. A partir destes dados, partimos então para experimentos adicionais, utilizando somente os inibidores A485 e MS023.



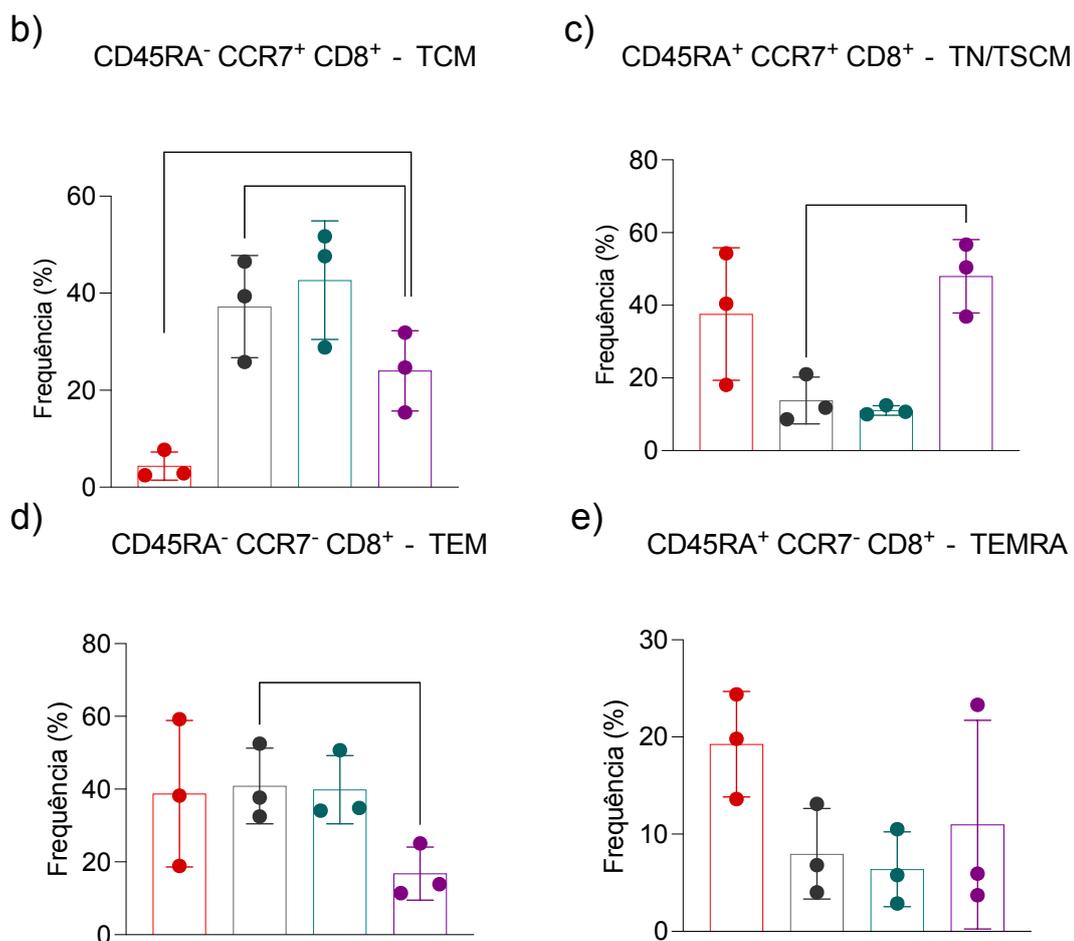
**Figura 8. Screening da modulação de células T CD8<sup>+</sup> efectoras com diferentes inibidores epigenéticos. A)** Análise da frequência de células TCD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (gráfico de barras à esquerda) e de intensidade média de fluorescência de CD69 (histogramas à direita) nas diferentes condições de estímulo testadas: cinza, estímulo completo; roxo – estímulo completo com A485; laranja – estímulo completo com L-Moses; azul – estímulo completo com GSKLSD1; bege: estímulo completo com A366; e verde – estímulo completo com MS023. **B)** Análise da frequência de células TCD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (gráfico de barras à esquerda) e de intensidade média de fluorescência de IFN- $\gamma$  (histogramas à direita) nas diferentes condições de estímulo testadas. **C)** Análise da frequência de células TCD8<sup>+</sup>Granzima B<sup>+</sup> (gráfico de barras à esquerda) e de intensidade média de fluorescência de Granzima B (histogramas à direita) nas diferentes condições de estímulo testadas. Os gráficos de barras representam média  $\pm$  desvio padrão de cinco (estimuladas, A485, L-Moses e MS023) ou duas (GSKLSD-1 e A366) amostras de sangue de doadores saudáveis. As frequências de células T CD8 expressando os marcadores celulares foram analisados em FlowJo, e os gráficos foram gerados em GraphPad Prism 9.

## 5.2 O inibidor A485 Induz as Células T CD8<sup>+</sup> a um Fenótipo *stem cell-like memory* após 4 dias de Estímulo

Tendo em vista a capacidade de modulação da resposta de células T CD8<sup>+</sup> totais observados no tratamento com A485 e MS023, procuramos avaliar se tais inibidores seriam capazes de modular o perfil de diferenciação das células T CD8<sup>+</sup>, visto que o fenótipo adquirido pelas células após ativação pode influenciar na qualidade de suas respostas. Para isso, de maneira semelhante ao descrito anteriormente, estimulamos as células TCD8<sup>+</sup> totais na presença ou não de 1 $\mu$ M de A485 ou MS023 e, após 4 dias de estímulo, analisamos a expressão dos marcadores CCR7 e CD45RA. Nestes ensaios, observamos que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estimulados na presença da molécula A485 apresentaram um perfil de diferenciação distinto daquele observado nos linfócitos ativados somente com o estímulo policlonal. A saber, o tratamento das células T CD8<sup>+</sup> com o inibidor A485 foi capaz de aumentar a frequência de células T com o perfil TSCM (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) e diminuir a frequência de células terminalmente diferenciadas (TEMRA – CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>). As células tratadas com o inibidor MS023, por sua vez, apresentaram um perfil semelhante aos das células estimuladas e não tratadas com inibidores (Fig. 9A-E).

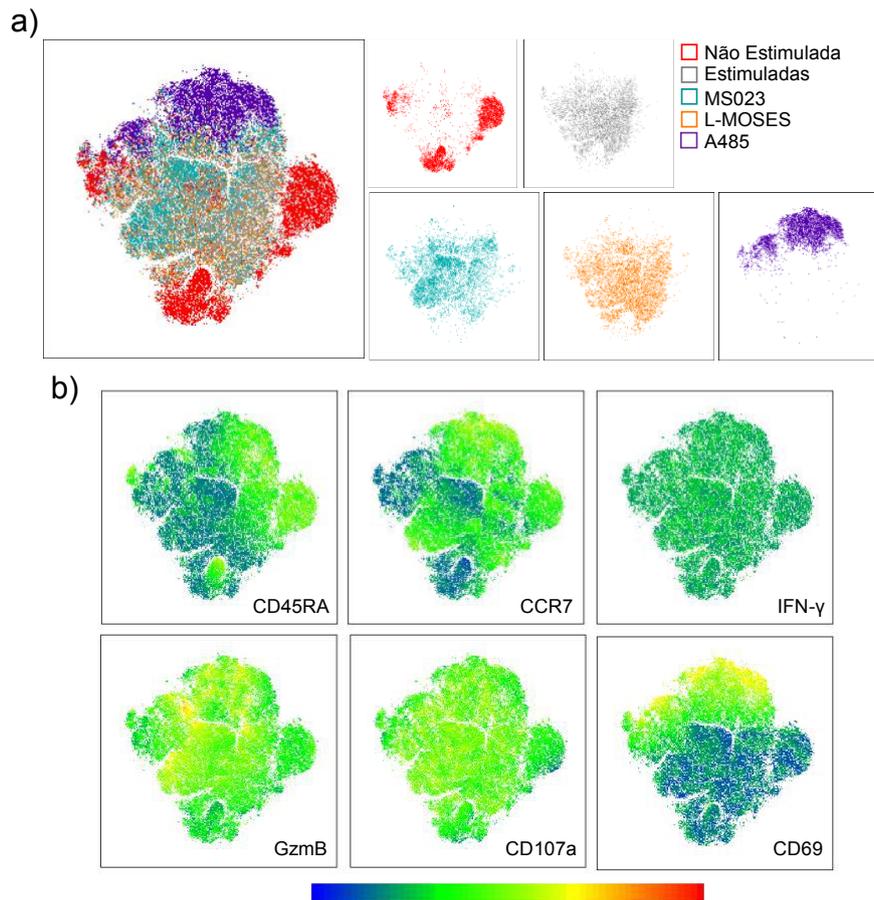


□ Não Estimulada   
 □ Estimuladas   
 □ MS023   
 □ A485



**Figura 9. O inibidor epigenético A485 modula o fenótipo de diferenciação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> humanos, induzindo um perfil de memória stem-cell. A)** Dots plots representativos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não estimulados mantidos na presença de IL-2 recombinante (laranja), linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados in vitro sem adição de inibidor epigenético (cinza) ou estimulados na presença de MS023 (verde) ou de A485 (roxo) após 4 dias de cultura. **B)** Análise quantitativa da frequência de células T de memória central – CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>, **C)** de células T naíves/TSCM – CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, **D)** de células T efetoras de memória – CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> ou **E)** de células T terminalmente diferenciadas – CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> após 4 dias de cultura. Os gráficos de barras representam média  $\pm$  desvio padrão de três amostras de sangue de indivíduos saudáveis.

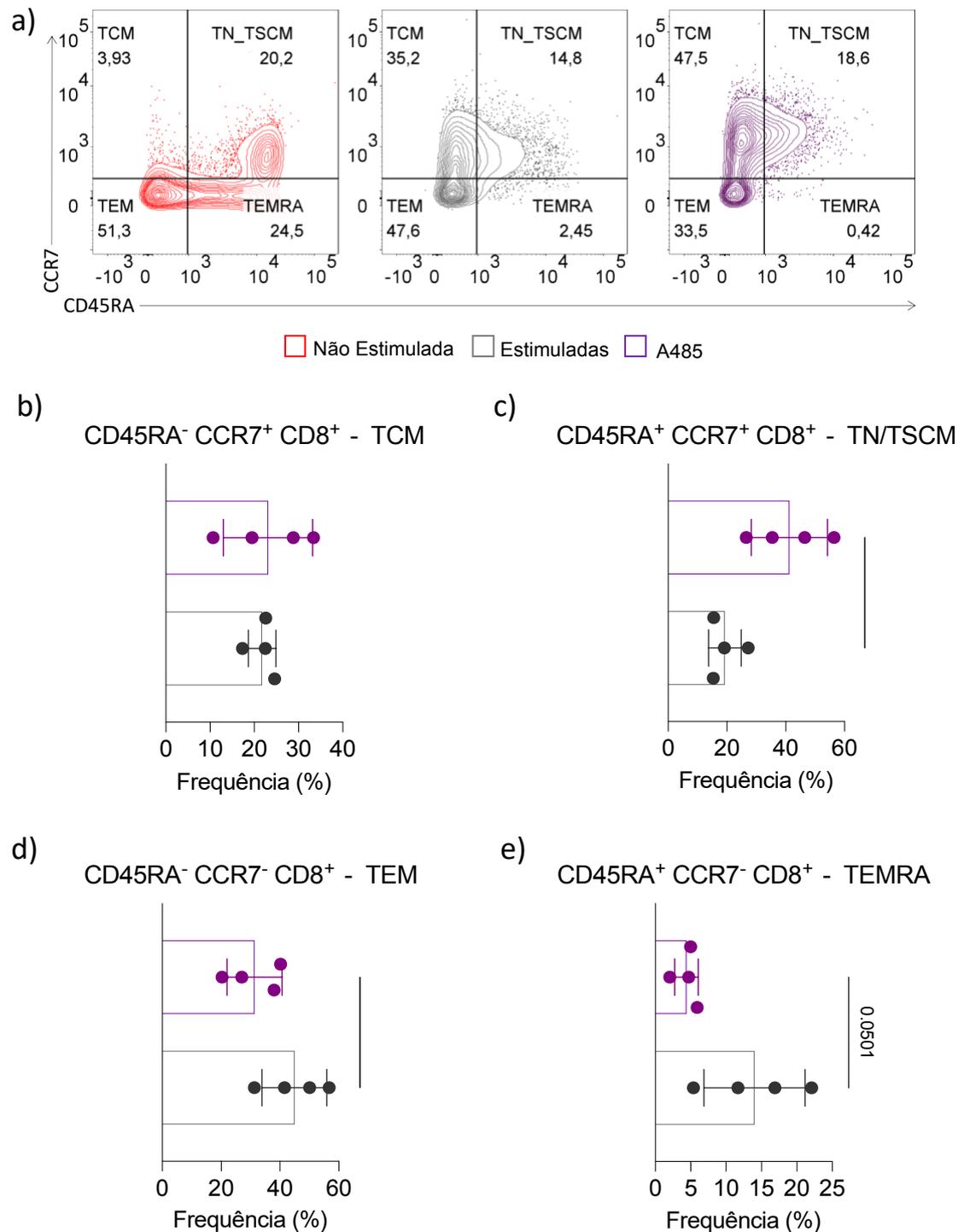
De modo a obtermos uma visão global dos efeitos dos diferentes inibidores epigenéticos testados sobre os linfócitos T CD8<sup>+</sup> humanos, realizamos uma análise de *t-Distributed Stochastic Neighbourhood Embedding* (tSNE), um método de redução de dimensionalidade não-linear e não-supervisionada que considera os múltiplos parâmetros analisados simultaneamente e cria uma distribuição bidimensional das células, que se agrupam por suas semelhanças fenotípicas. A partir desta análise, observamos que as células tratadas com o inibidor A485 localizam-se em região topográfica distinta e bem definida em relação às células estimuladas na ausência ou presença de quaisquer outros inibidores (Fig. 10). As células tratadas com outros inibidores, entretanto, ficaram dispostas em regiões topográficas similares daquela observada em células estimuladas na ausência de inibidores, reforçando, assim, que a MS023 e a L-moses não impactam de modo global a expressão de marcadores em células T CD8<sup>+</sup> efetoras. Em compensação, o inibidor A485 modulou a expressão global dos marcadores de ativação, funcionalidade e diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> humanas. Diante destes resultados, selecionamos tal inibidor para prosseguirmos e aprofundarmos nossas análises.



**Figura 10. Análise por redução de dimensionalidade, após o tratamento de células T CD8<sup>+</sup> efectoras com os inibidores epigenéticos. A)** Localização topográfica das células T CD8<sup>+</sup> efectoras após o tratamento com os inibidores MS023, representado na cor verde, o inibidor L-MOSES, representado pela cor laranja, e o inibidor A485, representado pela cor roxa. As células T não estimuladas, representadas na cor vermelha, e as células T estimuladas na ausência de inibidor epigenético, representadas pela cor cinza, foram utilizadas como grupos controles do experimento. **B)** Heatmap apresentando a região de maior intensidade de cada marcador avaliado, e mostrando a co-localização com os tratamentos utilizados.

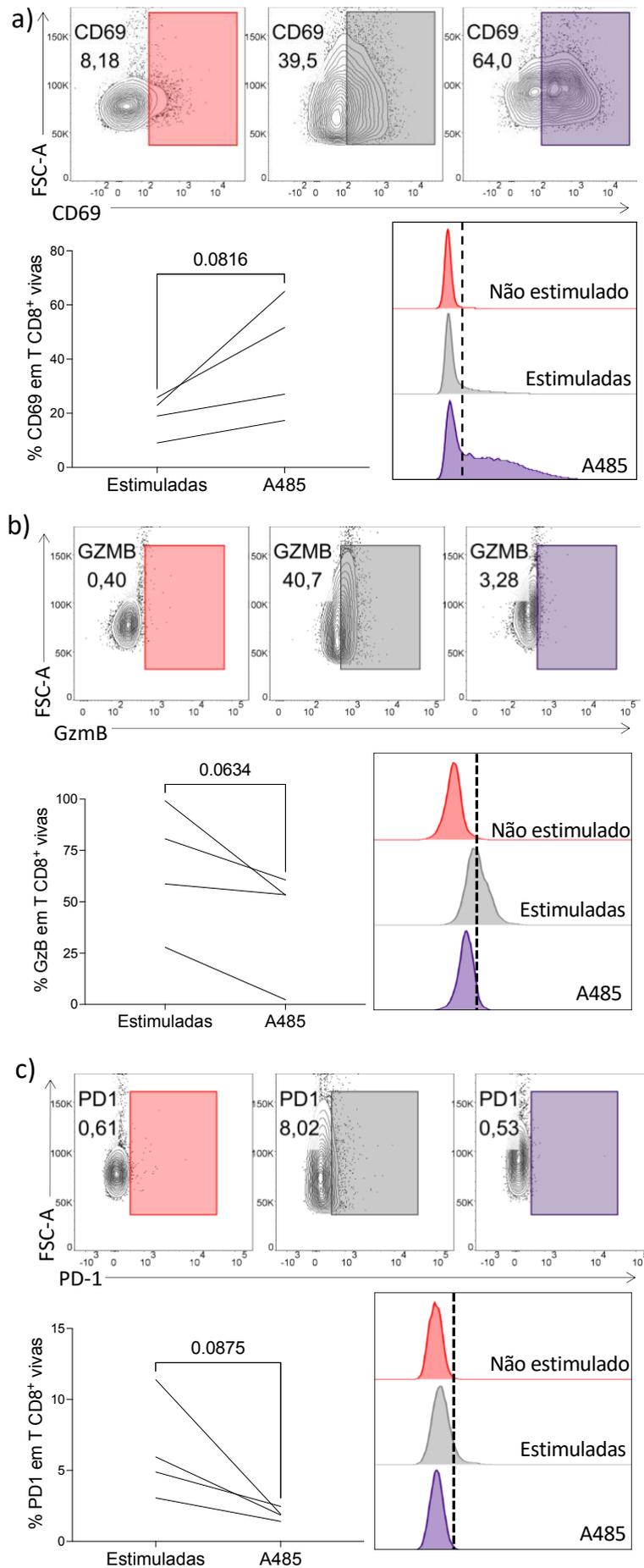
### 5.3 A inibição Seletiva de CBP/p300 por Meio do Tratamento das Células T CD8<sup>+</sup> com A485 Mantém as Células em Estágios mais Precoces de Diferenciação após 8 dias de Estímulo

A fim de analisarmos se o efeito modulatório do inibidor A485 é mantido após estímulo mais prolongado das células, realizamos experimentos nos quais células T CD8<sup>+</sup> totais foram estimuladas por oito dias na presença ou não do inibidor A485. Como resultado, observamos que o perfil fenotípico das células T CD8<sup>+</sup> tratadas com o inibidor A485 foi semelhante ao observado com 4 dias de cultura, com enriquecimento de um perfil TN/TSCM em comparação com as células T CD8<sup>+</sup> estimuladas ou com as não tratadas, que possuem frequência elevada de células com os perfis TEM e TEMRA, respectivamente (Fig. 11).



**Figura 11. O inibidor epigenético A485 modula o fenótipo de diferenciação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> humanos, induzindo um perfil Naive/Stem-cell memory. A)** Dot plots representativos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados ou não na presença ou não do inibidor A485 após 8 dias de cultura. À esquerda, em laranja, células não estimuladas. Ao meio, em cinza, células estimuladas e, à direita, em roxo, células estimuladas e tratadas com a sonda A485. **B-E)** Análise quantitativa da frequência de células de memória central - CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (b), células naïves/TSCM - CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (c), células efetoras de memória - CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> (d) ou células terminalmente diferenciadas - CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> (e) após 8 dias de cultura. Os gráficos de barras representam média  $\pm$  desvio padrão de quatro amostras de sangue de indivíduos saudáveis.

Após oito dias de estímulo na presença do inibidor A485, observamos também uma tendência no aumento da frequência de células TCD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, de maneira semelhante ao observado com 4 dias de cultura (Fig. 12A). Por outro lado, diferentemente do observado em culturas mais curtas, houve uma tendência de diminuição na frequência de células CD8<sup>+</sup>Granzima B<sup>+</sup> após estímulo na presença do inibidor A485 por um tempo mais prolongado (Fig. 12B). Ademais, com o intuito de investigarmos se tal inibidor agiria também modulando a expressão de marcadores de exaustão celular após estímulo prolongado, avaliamos a expressão do marcador PD1 e observamos uma tendência de diminuição na frequência de células TCD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> em comparação com as células estimuladas na ausência do inibidor (Fig. 12C).



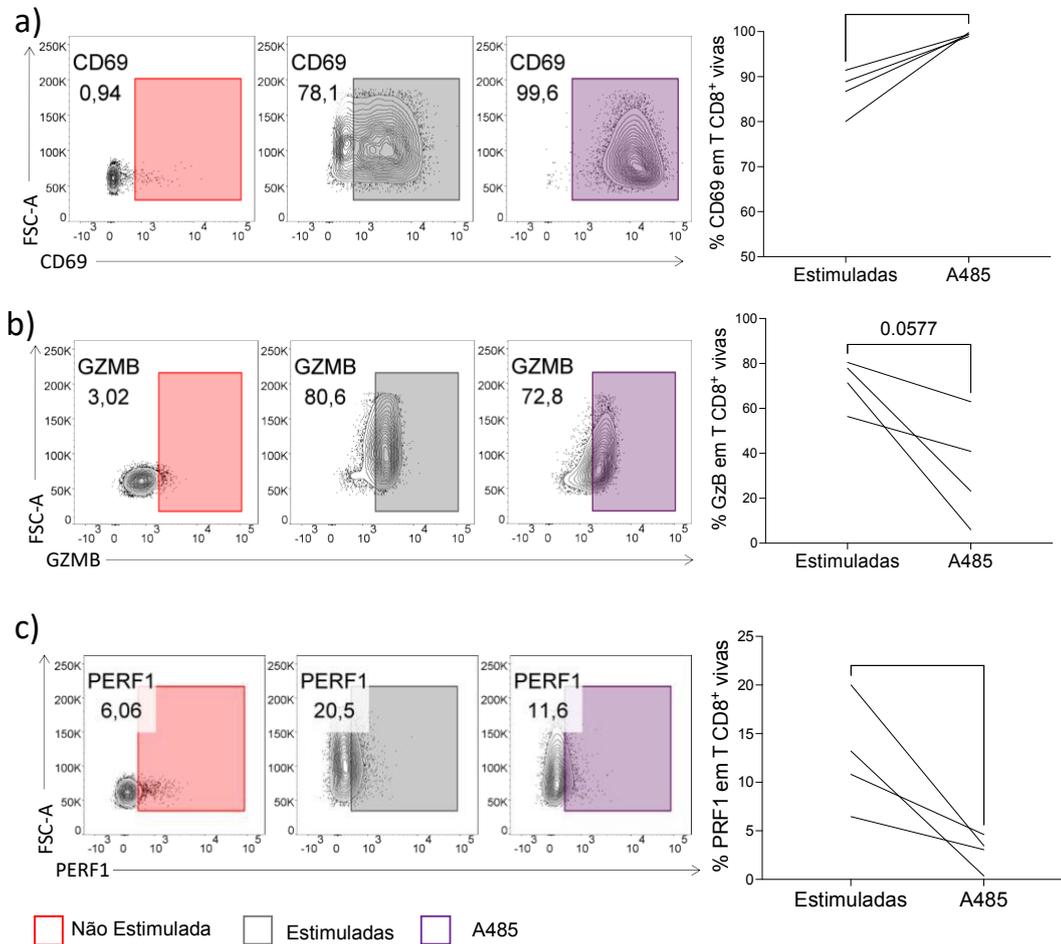
**Figura 12. O inibidor A485 é capaz de modular a expressão de marcadores funcionais em células T CD8 após 8 dias de cultura. A-C)** Dot plots representativos (acima), frequências (abaixo à esquerda) e intensidades de fluorescência (abaixo à direita) dos marcadores CD69 (a), Granzima B (b) e PD-1 (c) após 8 dias de estímulo ou não de células T CD8<sup>+</sup> totais na presença ou não do inibidor A485 (n=4).

#### **5.4 Células T CD8<sup>+</sup> Naïves Estimuladas na Presença do Inibidor A485 são Moduladas de Forma Semelhante ao Observado em Células T CD8<sup>+</sup> Totais**

A fim de nos aprofundarmos sobre o potencial modulador do inibidor A485 em relação às funções efetoras e à sustentação do perfil de *stemness* nas células T CD8<sup>+</sup>, realizamos ensaios utilizando-se como ponto de partida as células T CD8<sup>+</sup> naïves, as quais são as células precursoras de todos os outros subtipos e fonte para a montagem de novas respostas. Além disso, por estarem em um estágio inicial de diferenciação e não terem sofrido ativação, configuram uma população mais homogênea para as nossas análises. Para a realização destes ensaios, purificamos, por seleção negativa, células TCD8<sup>+</sup> naïves de doadores saudáveis, e as estimulamos ou não *in vitro*, na presença ou não do inibidor A485, da mesma forma descrita para as células TCD8<sup>+</sup> totais, e analisamos os efeitos de tal tratamento após 4 ou 8 dias de cultura. A partir destes ensaios, observamos que, de maneira análoga ao observado em células T CD8<sup>+</sup> totais, o inibidor A485 foi capaz de aumentar a ativação celular, evidenciado pelo aumento da frequência de células positivas para o marcador de ativação CD69 (Fig. 13A).

Além disso, para estudarmos os efeitos do inibidor sobre o perfil citotóxico das células pós-estimulação, analisamos a expressão de granzima B, como já realizado em células TCD8<sup>+</sup> totais, e incluímos em nossas análises de citometria de fluxo a expressão da perforina-1, proteína liberada pelas células T CD8<sup>+</sup> após ativação, capaz de causar poros na membrana da célula-alvo e, conseqüentemente, induzir a entrada de granzima B para a promoção da morte celular. Ao analisarmos estes dois marcadores de citotoxicidade após 4 dias de estímulo, podemos observar que, de modo semelhante ao observado em células TCD8<sup>+</sup> totais, a inibição de CBP/p300 por meio do tratamento com A485 resultou em diminuição na frequência de células TCD8<sup>+</sup>granzima B<sup>+</sup> e também de células das células TCD8<sup>+</sup>perforina-1<sup>+</sup> após estímulo de células *naïves* (Fig.13B, C), indicando, assim, ser um atenuador da citotoxicidade de células T CD8<sup>+</sup> ativadas. Em resumo, diante destes resultados,

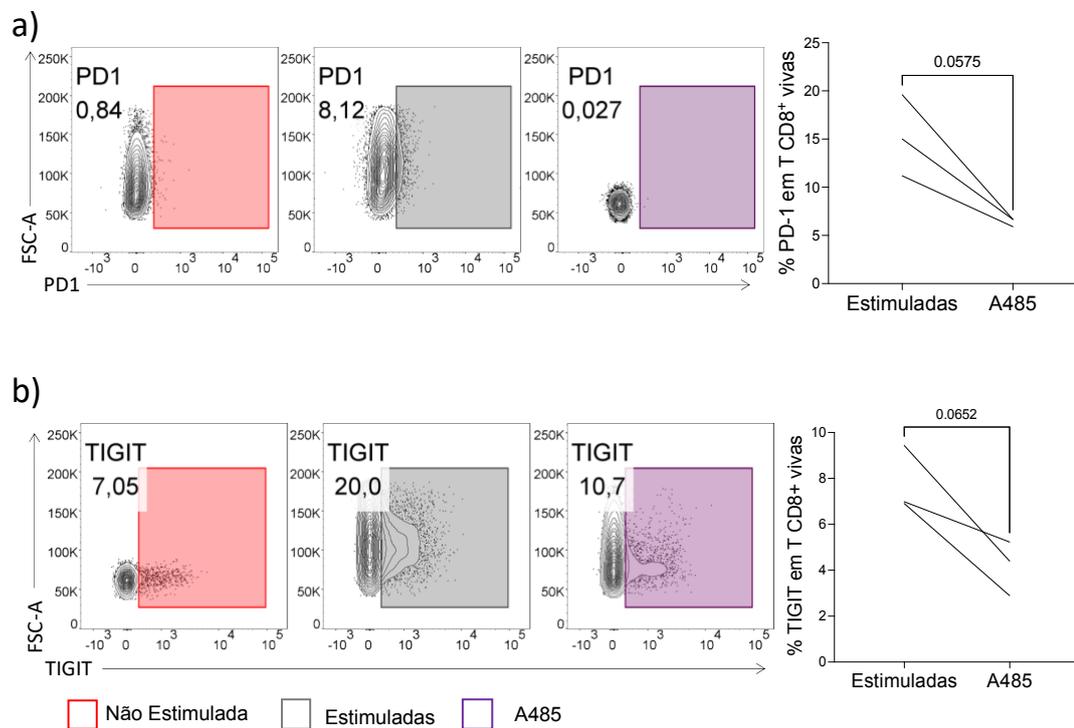
podemos concluir que o inibidor A485 possui efeito em células TCD8<sup>+</sup> naíves, podendo, portanto, ser utilizado como estratégia de modulação da montagem de novas respostas de células T CD8<sup>+</sup>.



**Figura 13. Células T CD8 naíves estimuladas na presença de A485 aumentam a expressão de marcador de ativação e reduzem a expressão de grânulos citotóxicos. A)** À esquerda, dot plot representativo da expressão de CD69 por células T CD8 naíves estimuladas por 4 dias na presença de A485, representado pela cor roxa, comparado com células não estimuladas, representadas na cor vermelha, e com células estimuladas, não tratadas, representadas pela cor cinza. À direita, frequência de células T CD8 expressando CD69 em células naíves estimuladas na presença ou não de A485 **B-C)** Dot plot representativo (à esquerda) e frequência (à direita) de células T CD8<sup>+</sup> naíves estimuladas por 4 dias na presença ou não do inibidor A485 quanto a expressão de granzima B **(B)** e de perforina-1 **(C)**.

Além de analisarmos a modulação de marcadores de ativação e citotoxicidade, buscamos entender também se o tratamento mais longo com A485 era capaz de modular a expressão de marcadores de exaustão, como PD-1 e TIGIT, após estimulação policlonal de células T CD8<sup>+</sup> naíves. Para tanto, realizamos ensaios de citometria de fluxo após oito dias de estímulo *in vitro* e observamos uma

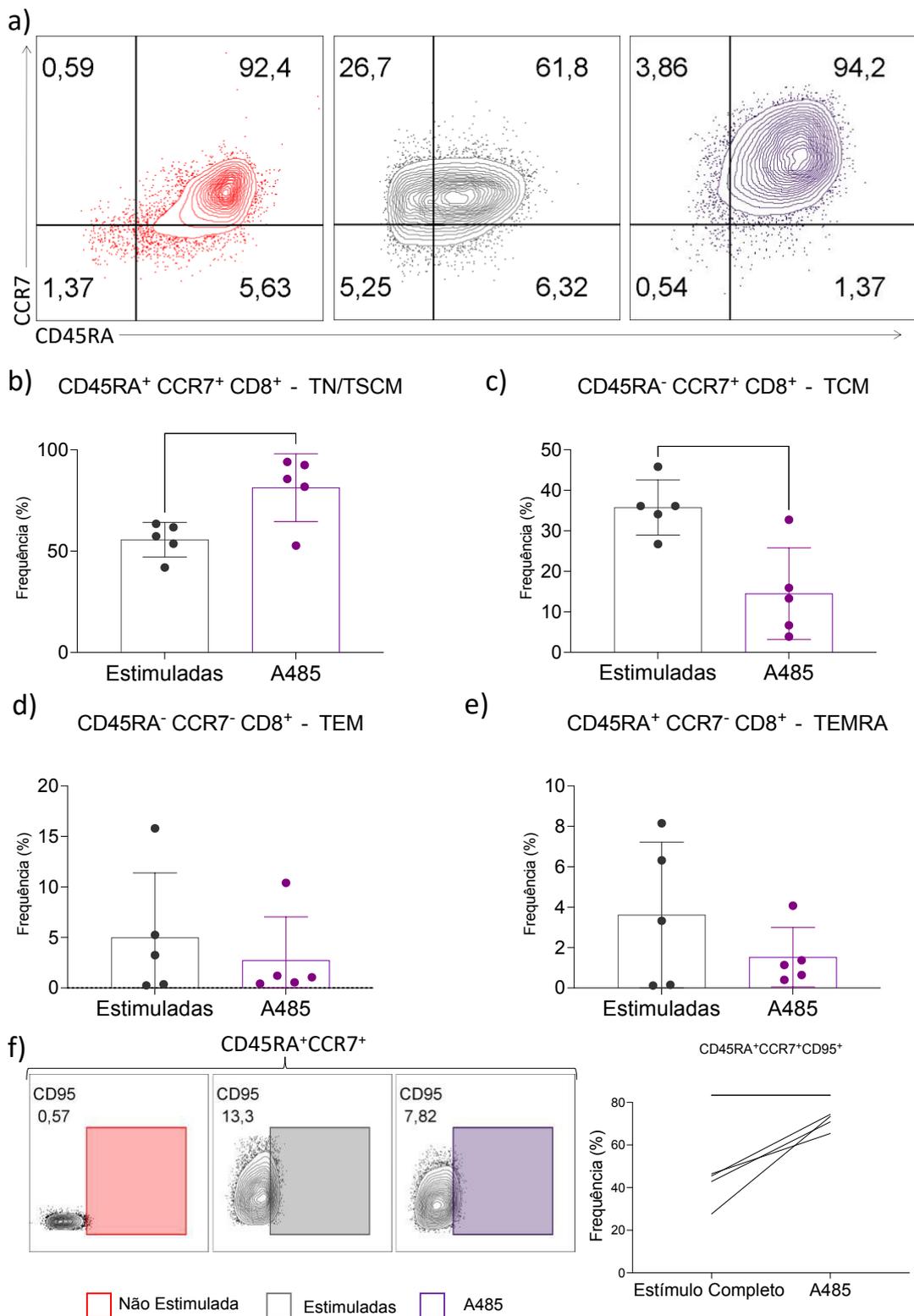
tendência de diminuição da frequência de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (Fig. 14A) e de T CD8<sup>+</sup>TIGIT<sup>+</sup> (Fig.14B).



**Figura 14. Células T CD8 naivas ativadas com estímulo policlonal por 8 dias na presença de A485 diminuem a frequência de TIGIT e PD-1. A)** Análise da frequência de células positivas para PD-1 em células T CD8<sup>+</sup> naivas estimuladas por 8 dias na presença do inibidor A485, representado pela cor roxa, em comparação com células não estimuladas, em vermelho, e com células estimuladas, porém não tratadas, em cinza. **B)** Sob o mesmo regime de estimulação celular descrita em **A)**, análise da frequência de células T CD8<sup>+</sup> expressando TIGIT após o tratamento ou não com o inibidor A485 (n=3).

Com o objetivo de investigarmos os fenótipos de diferenciação adquiridos pelas células T CD8<sup>+</sup> naivas após estímulo na presença ou não do inibidor A485, realizamos, após 4 dias de cultura, a análise dos marcadores CCR7 e CD45RA. Enquanto as T CD8<sup>+</sup> naivas estimuladas na ausência do inibidor A485 passa a se diferenciar em células de memória central e, em menor quantidade, em células de memória efetora e TEMRA, as T CD8<sup>+</sup> naivas estimuladas na presença do inibidor A485 retêm de modo robusto o perfil de células de memória *stem-like*, expressando os marcadores CCR7 e CD45RA de modo semelhante às células naivas (Fig. 15A). Note que a heterogeneidade da população de células T CD8<sup>+</sup> expostas ao A485 é bastante superior às células T CD8<sup>+</sup> naivas (Fig. 15A), o que sugere que a estimulação das células T CD8<sup>+</sup> expostas ao A485 foi feita adequadamente. Quando analisamos

a frequência de todas as subpopulações de memória, notamos que as células T CD8<sup>+</sup> naives estimuladas na presença do inibidor A485 privilegiam a diferenciação para um perfil de memória *stem-like* (Fig. 15B) em detrimento de um perfil de memória central, visto em maior frequência nas células T CD8<sup>+</sup> naives estimuladas na ausência do inibidor A485 (Fig. 15C), sem promover qualquer alteração nos perfis de TEM (Fig. 15D) e TEMRA (Fig. 15E), quando estimuladas *in vitro* durante 4 dias. Para confirmar que o perfil de das células T CD8<sup>+</sup> expostas ao A485 é o de memória *stem-like*, nós analisamos a expressão do marcador de ativação CD95 dentro das populações celulares. Como esperado, as células T CD8<sup>+</sup> naives estimuladas na presença do inibidor A485 expressaram significativamente mais CD95 do que os grupos controles (Fig. 15F). Esses dados sugerem que o tratamento com A485 estabiliza a diferenciação de células T, pelo menos ao longo de um estímulo agudo, no perfil de memória *stem-like*, que tem sido associado com respostas robustas de células CAR-T em tumores sólidos.

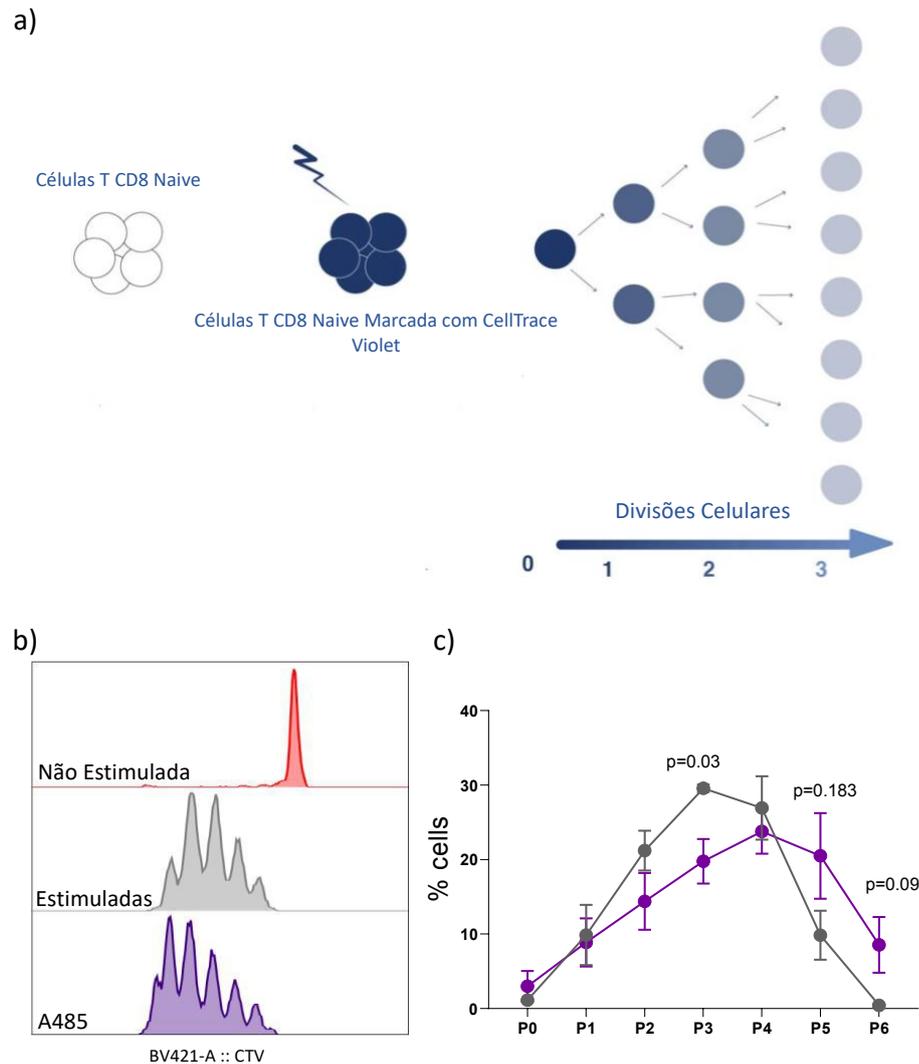


**Figura 15. Células T CD8 naivas ativadas com estímulo policlonal por 4 dias na presença de A485 retêm o fenótipo de memória stem-like. A)** Dot plot representativo da expressão de CCR7 e/ou CD45RA por células T CD8 naivas estimuladas ou não por 4 dias na presença ou não de A485. **b-e)** Frequência de células TN/TSCM (**B**), TCM (**C**), TEM (**D**) e TEMRA (**E**) após estímulo de células T CD8 naivas por 4 dias na presença ou não de A485. **f)** Dot plot representativo e

frequência de células T CD8<sup>+</sup> expressando CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, normalizadas pela frequência de células do controle não tratado.

### **5.5 O Tratamento com o Inibidor A485 Aumenta a Capacidade Proliferativa de Células T CD8<sup>+</sup> Humanas**

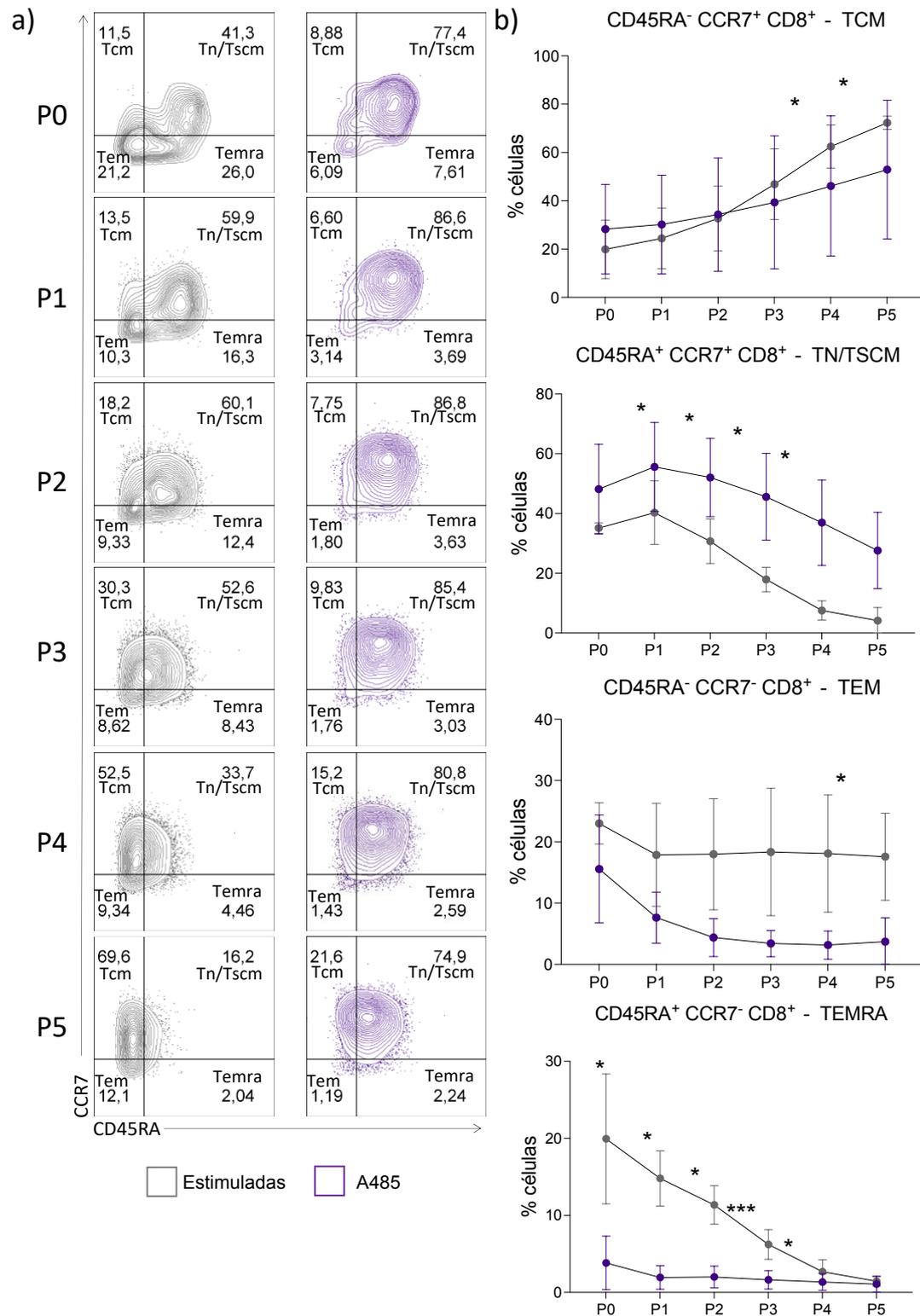
Como mencionado, o inibidor A485 age sobre o domínio p300/CBP, o qual está relacionado a diversos processos celulares (LASKO et al., 2017). Desta forma, buscamos avaliar se o tratamento com o inibidor A485 seria capaz de modular também a proliferação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> humanos. Para tanto, realizamos ensaios nos quais células T CD8<sup>+</sup> naïves, provenientes de indivíduos saudáveis, foram inicialmente marcadas com o corante *cell trace violet (CTV)*, ativadas por meio de estímulo policlonal e tratadas ou não com o inibidor A485, como previamente descrito. A marcação com CTV nos permite o rastreo do número de divisões sofridas pelas células a partir da diluição do corante a cada ciclo celular (Fig. 16A). Nesse sentido, o tratamento com o inibidor A485 resultou no aumento da proliferação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, com um aumento na frequência de células em cada pico de divisão em relação ao controle não tratado (Fig. 16A, B).



**Figura 16** O tratamento com o inibidor A485 é capaz de aumentar a capacidade proliferativa de células T CD8<sup>+</sup> efetoras. **A)** Imagem representativa do rastreamento de proliferação celular a partir do uso de Cell Trace Violet (CTV). Assim que as células T são coradas com CTV e estimuladas, o corante é diluído pela metade toda vez que uma célula-mãe origina duas células-filhas. **B)** Histograma mostrando o número de divisões celulares que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> sofreram após o estímulo policlonal na presença ou não de A485, representado por cada pico. **C)** Frequência de células T CD8<sup>+</sup> efetoras determinada em cada ciclo de proliferação, comparando-se as células tratadas com A485 (roxo) com as células não tratadas (cinza).

A partir do ensaio de proliferação, também realizamos a análise do perfil fenotípico das células dentro de cada pico registrado, a fim de observarmos em qual momento as células T CD8<sup>+</sup> efetoras tratadas com o inibidor A485 estão se diferenciando das não tratadas. A partir desta análise, podemos observar que, enquanto as células não tratadas vão se diferenciando e adquirindo diferentes fenótipos conforme se proliferam, as células T CD8<sup>+</sup> que foram tratadas com o

inibidor A485 permanecem em um perfil menos diferenciado, TSCM, mesmo após sofrerem ciclos de proliferação (Fig.17A, B). À medida que as células T CD8<sup>+</sup> sofrem divisões celulares após estimulação policlonal, as células tratadas com o inibidor A485 retêm o perfil de memória stem-like, sobretudo nas células com menor índice de proliferação. Há, porém, uma leve perda do fenótipo de memória stem-like e ganho do perfil de memória central apenas no grupo de células que passaram por vários ciclos de divisão (P5 e P6) após a inibição com A485 (Fig.17A, B). Por outro lado, nas células T CD8<sup>+</sup> estimuladas na ausência do inibidor A485, há uma frequência elevada do fenótipo TEMRA nas células que sofreram poucos ciclos de proliferação, enquanto os fenótipos TCM e TEM são mais frequentes nas células que se proliferaram mais (Fig.17A, B). Portanto, fica evidente que o inibidor A485 estabiliza as características de *stemness* durante a diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> ativadas, principalmente naquelas que passaram por menos ciclos de divisão celular. Mesmo naquelas com alta taxa proliferativa, a maioria das células mantém as o fenótipo TSCM, porém cerca de um terço das células adquire o fenótipo TCM (Fig.17A, B). Em contrapartida, na ausência do inibidor A485, as células T CD8<sup>+</sup> estimuladas adquirem, em geral, fenótipos mais bem diferenciados (Fig.17A, B).

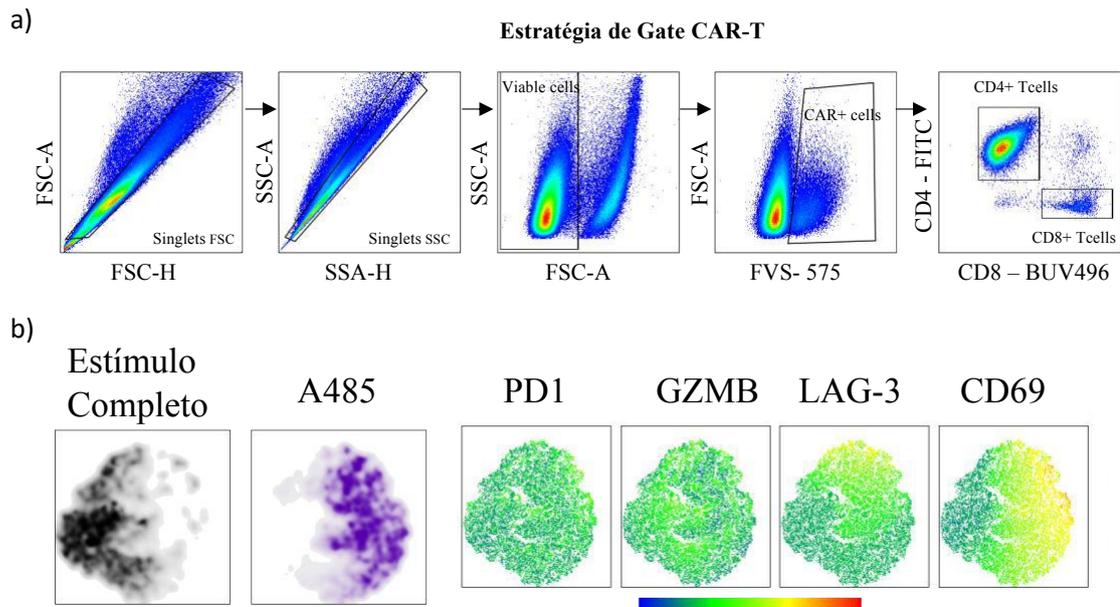


**Figura 17 O perfil fenotípico TSCM em células T CD8<sup>+</sup> ativadas com estímulo policlonal é mantido durante a proliferação linfocitária após o tratamento com o inibidor A485. A) Dot plots representativos avaliando a expressão dos marcadores CD45RA e CCR7 dentro de cada pico de proliferação de células T CD8<sup>+</sup> ativadas com estímulo policlonal na presença ou não de A485. B) Frequência de cada subpopulação de memória de células T CD8<sup>+</sup> determinada em cada ciclo de proliferação, comparando-se as células tratadas com A485 (roxo) com as células não tratadas (cinza).**

Em conjunto, nossos dados demonstram que o tratamento com A485 é capaz de modular a diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> humanas, polarizando-as para um perfil *stem-like*, aumentando a sua capacidade proliferativa e atenuando a expressão de marcadores de citotoxicidade e exaustão.

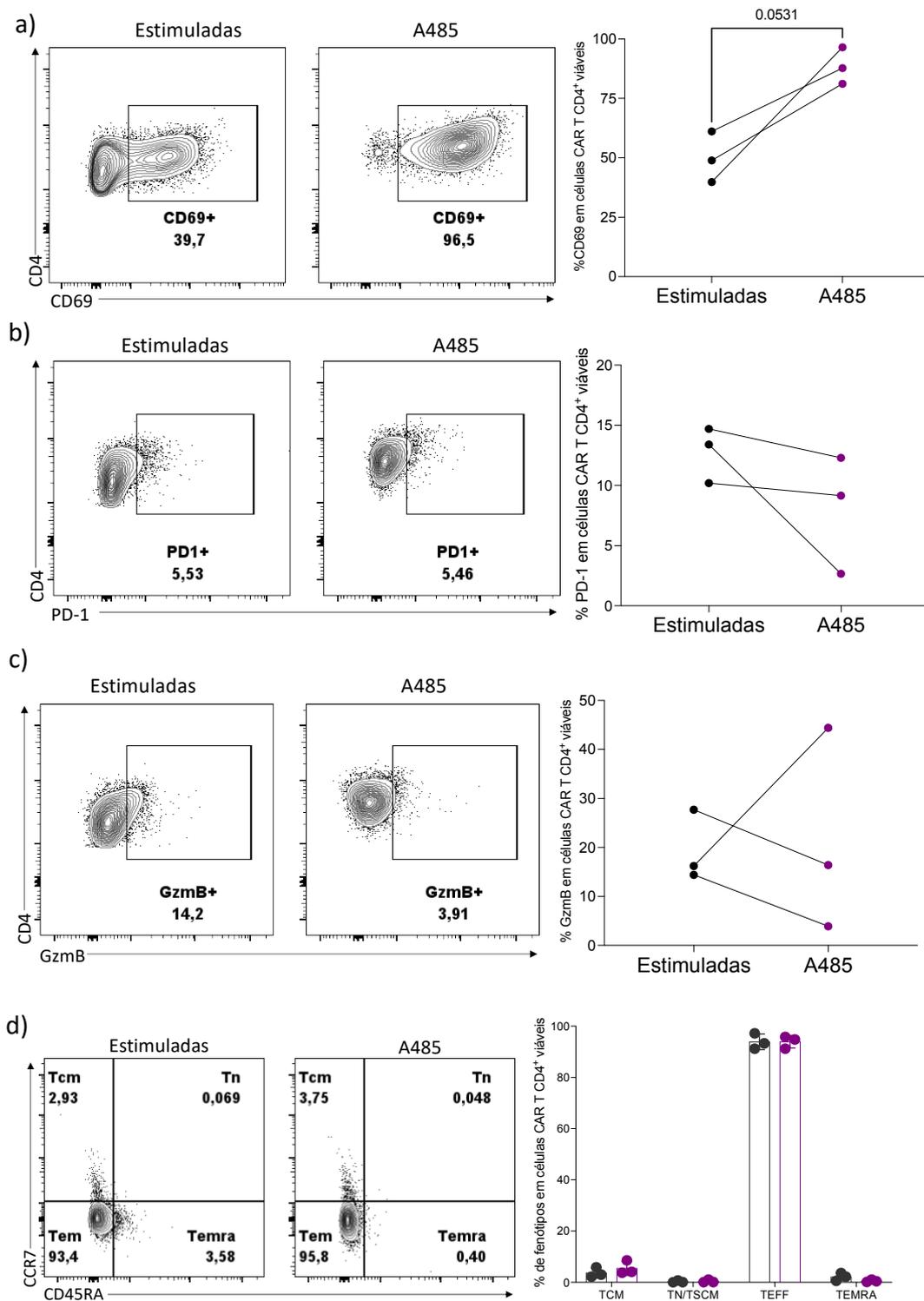
### **5.6 O Tratamento com o Inibidor A485 é Capaz de Modular Células CAR-T anti-CD19**

Para analisar a relevância clínica do inibidor A485, nós, em seguida, averiguamos o impacto da inibição de CBP/p300 sobre a função e diferenciação de células CAR-T isoladas de produtos de infusão de pacientes de linfoma não Hodgkin, que estão em tratamento no A.C.Camargo Cancer Center. Para isto, estimulamos as células CAR-T em cultura na presença do inibidor A485 durante 4 e 7 dias – o mesmo estímulo policlonal utilizado nos experimentos anteriores foi utilizado para re-estimar as células CAR-T. Posto que os produtos de infusão são compostos de células T CAR<sup>+</sup> e CAR<sup>-</sup>, nós nos certificamos que as análises subsequentes estariam sendo feitas dentro das populações de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 expressando CAR, como mostrado na Fig. 18A. Analisando-se especificamente dentro das *gates* de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 CAR<sup>+</sup>, observamos que o inibidor A485 aumenta a frequência de células expressando sobretudo o marcador de ativação CD69, sem promover a expressão acentuada de granzima B e de alguns receptores inibitórios relacionados à exaustão celular (Fig. 18B).



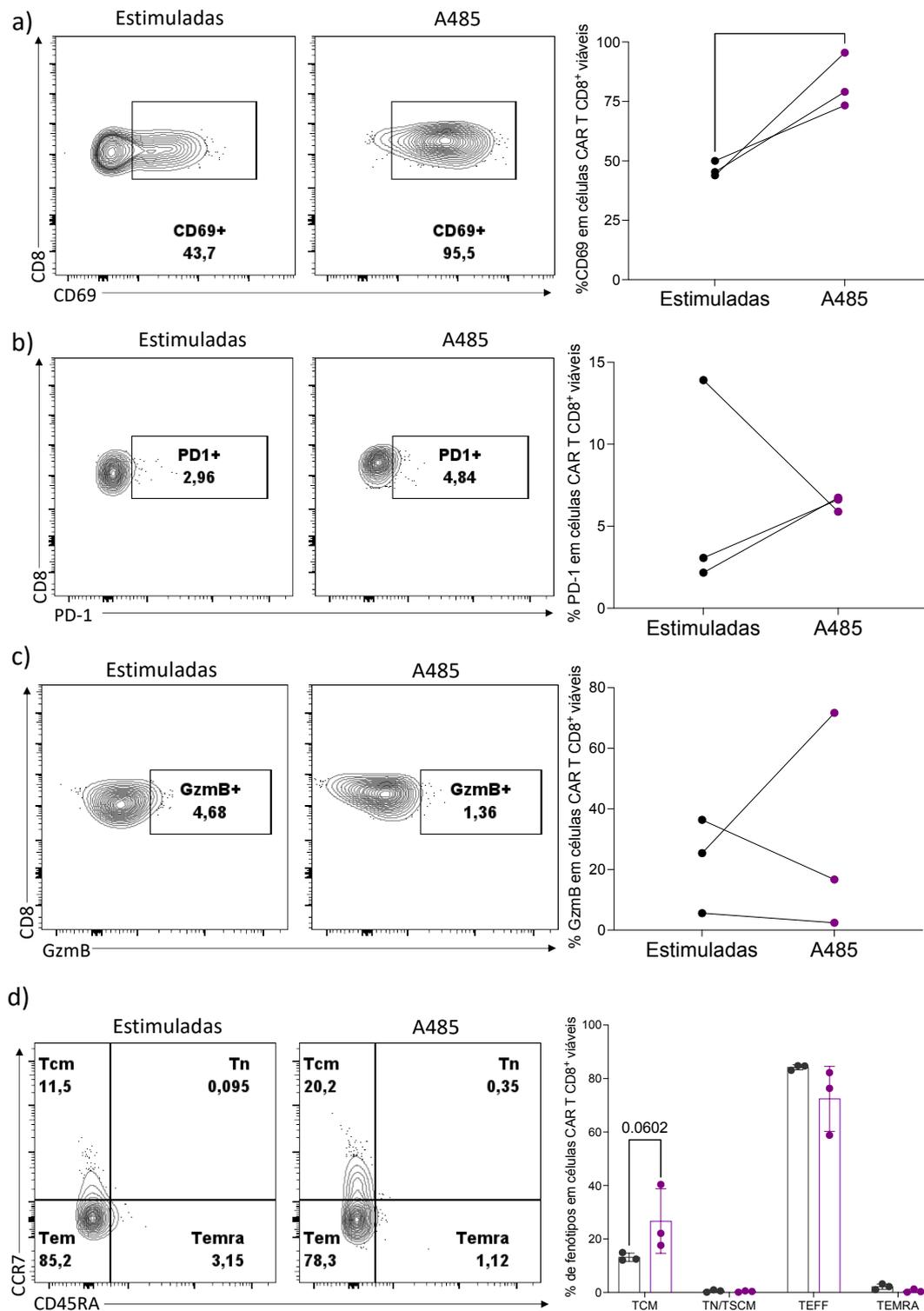
**Figura 18** O inibidor A485 aumenta a frequência de células CAR-T expressando o marcador de ativação CD69, sem promover aumento de marcadores de exaustão celular. **A)** Estratégia de *gating* utilizada para a identificação das populações de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> viáveis expressando CAR. **B)** tSNE plot mostrando a expressão de marcadores de ativação e de exaustão em células CAR-T CD3 totais, estimuladas na presença ou não de A485.

Ao analisarmos a presença desses marcadores em células CAR-T CD4<sup>+</sup>, pudemos observar uma modulação no perfil de ativação dessas células após o tratamento com o inibidor A485, assim como visto anteriormente, pelo aumento robusto da frequência de células expressando CD69 (Fig. 19A). Por outro lado, o tratamento modulou negativamente a frequência de células expressando granzima B em comparação com o controle (Fig. 19B). O inibidor A485 não impactou a frequência de células expressando PD-1 (Fig. 19C) e nem o perfil de memória adquirido por CAR-T CD4<sup>+</sup> após a re-estimulação policlonal (Fig. 19D).



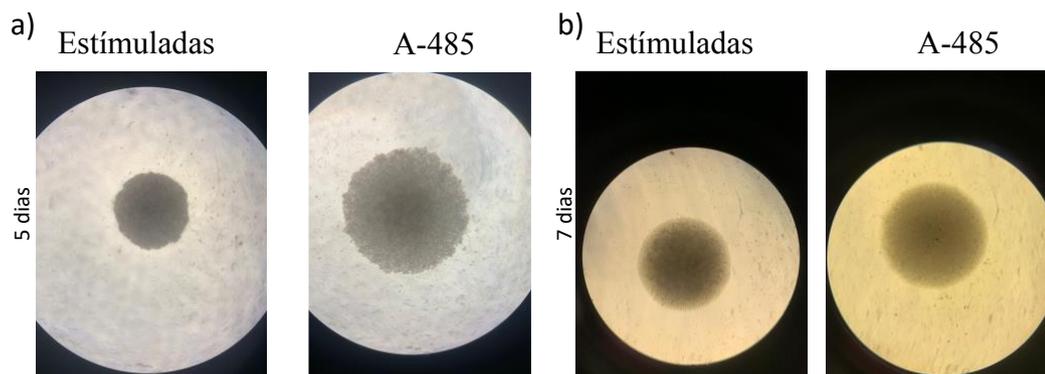
**Figura 19** Após re-estímulo policlonal, o inibidor A485 aumenta a frequência de células CAR-T CD4<sup>+</sup> expressando CD69, sem impactar o seu perfil fenotípico e de exaustão. **A-C)** Análise da frequência de células CAR-T CD4<sup>+</sup> expressando CD69 **(A)**, granzima B **(B)** ou PD-1 **(C)** após re-estímulo policlonal na presença do inibidor A485, em comparação com células estimuladas, porém não tratadas. **D)** Análise do perfil fenotípico das células CAR-T CD4<sup>+</sup> utilizando os marcadores CD45RA e CCR7 após re-estímulo policlonal na presença ou não do inibidor A485.

Quando partimos para a análise de células CAR-T CD8<sup>+</sup> re-estimuladas, o inibidor A485 aumenta a frequência de células CD69<sup>+</sup> e reduz a frequência de células granzima B<sup>+</sup>, sem alterar a frequência células expressando PD1, em comparação com as células CAR-T CD8<sup>+</sup> estimuladas na ausência do inibidor (Fig. 20A - C). No entanto, ao analisarmos o perfil fenotípico dessas células, utilizando os marcadores CD45RA e CCR7, observamos que o inibidor A485 aumenta a frequência de células CAR-T CD8<sup>+</sup> do perfil TCM, enquanto as células re-estimuladas na ausência do inibidor A485 adquirem um fenótipo mais diferenciado, acumulando-se sobretudo como células do perfil de memória efetora (Fig. 20D).



**Figura 20** Após re-estímulo policlonal, o inibidor A485 aumenta a frequência de células CAR-T CD8<sup>+</sup> expressando CD69 e de células com o perfil de memória central, sem impactar o seu perfil de exaustão. **A-C)** Análise da frequência de células CAR-T CD8<sup>+</sup> expressando CD69 (A), granzima B (B) ou PD-1 (C) após re-estímulo policlonal na presença ou não do inibidor A485. **D)** Análise do perfil fenotípico das células CAR-T CD8<sup>+</sup> utilizando os marcadores CD45RA e CCR7 após re-estímulo policlonal na presença ou não do inibidor A485.

Em uma análise visual, através do microscópio pudemos observar uma diferença na quantidade de células após o tratamento com o inibidor A485 em células CAR T. As células CAR T que foram tratadas com o inibidor A485, com 5 dias de cultura apresentaram um aumento visual na quantidade de células em comparação ao controle, e esse aumento se manteve com 7 dias de cultura, como observado nas Fig. 21A-B.

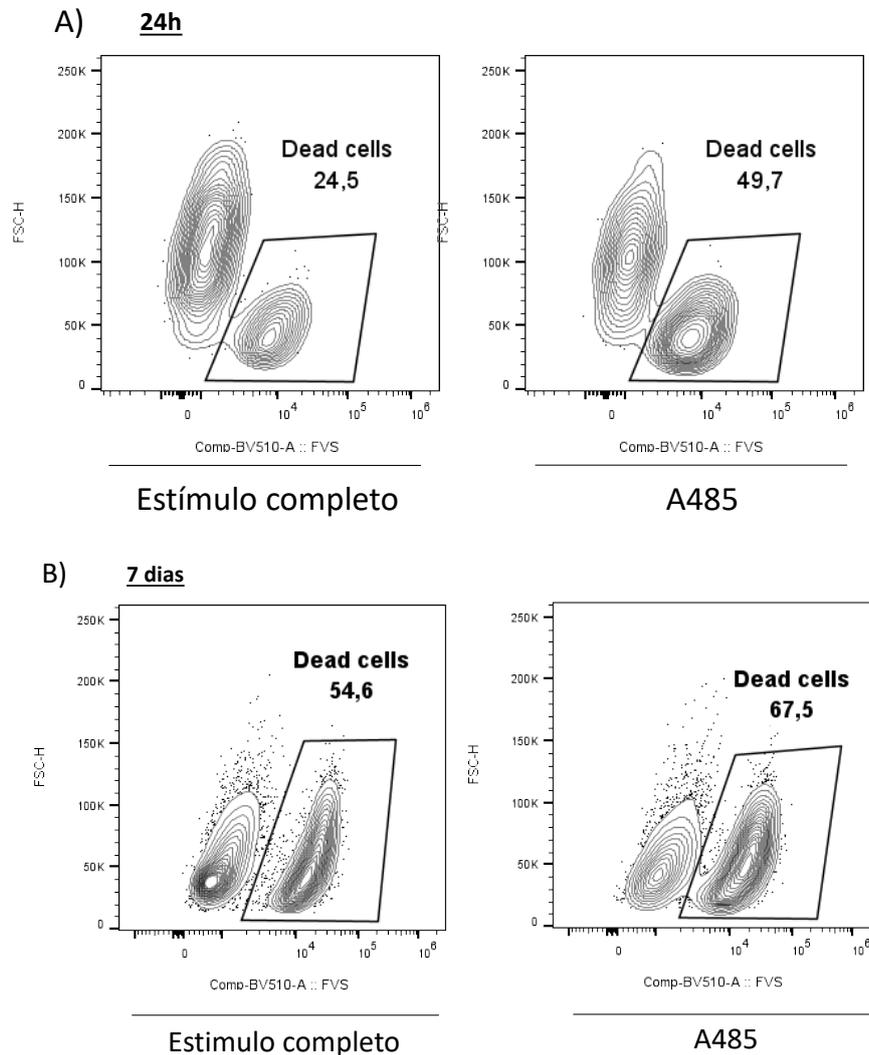


**Figura 21** Análise visual da proliferação em células CAR T tratadas com o inibidor A485. A) Fotografia do poço não tratado e do poço tratado com o inibidor após 5 dias de cultura, vista pelo microscópio. B) Fotografia após 7 dias dos poços não tratado e tratado com o inibidor A485. Imagens obtidas em objetiva 10x.

### 5.7 O Inibidor A485 é Capaz de Potencializar a Atividade Antitumoral das Células CAR-T anti-CD19

Como prova de conceito, analisamos a capacidade antitumoral das células CAR-T após a inibição da acetiltransferase CBP/p300 por meio do tratamento com A485. Para tanto, isolamos as células CAR-T anti-CD19 provenientes de produtos de infusão de pacientes com neoplasias hematológicas tratados no A.C. Camargo Cancer Center, re-estimulamo-nas *in vitro* com dynabeads anti-CD3/CD28 na presença ou não do inibidor A485 por 7 dias e cultivamo-nas com a Daudi, uma linhagem de linfoblastos de células B CD19<sup>+</sup> isolada de pacientes com linfoma de Burkitt. Num ensaio de curta duração (24h), utilizando-se uma proporção maior de células CAR-T (1 CAR-T: 1 célula tumoral), o tratamento com o inibidor A485 duplica a capacidade antitumoral das células CAR-T anti-CD19 em relação ao grupo de células CAR-T não tratadas (n=2) (Fig. 22A). Num ensaio de maior duração (7 dias), utilizando-se desta vez uma proporção menor de células CAR-T (0,2 CAR-T: 1 célula tumoral), o tratamento com o inibidor A485 mais que

quadruplica a capacidade antitumoral das células CAR-T anti-CD19 em relação ao grupo de células CAR-T não tratadas (n=2) (Fig. 22B).



**Figura 22. O inibidor A485 potencializa substancialmente a capacidade antitumoral de células CAR-T anti-CD19 em ensaio de co-cultura com linhagem de linfoblastos de células B CD19<sup>+</sup>. A)** Dot plot mostrando a frequência de células tumorais mortas após 24h do ensaio de co-cultura contendo células CAR-T anti-CD19 tratadas ou não com A485 e células da linhagem tumoral Daudi CD19<sup>+</sup>, na proporção de 1 CAR-T : 1 célula Daudi, uma linhagem celular derivada de pacientes diagnosticados com linfoma de Burkitt. **B)** Dot plot representativo da frequência de células tumorais mortas 7 dias após ensaio de co-cultura contendo células CAR T anti-CD19 tratadas ou não com A485 e células Daudi CD19<sup>+</sup>, em proporção de 0,2 CAR-T : 1 célula Daudi. Após marcação com corante de viabilidade, as células tumorais foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSymphony A5, e as frequências de células tumorais vivas e mortas foram calculadas em FlowJo v10.

## 6. DISCUSSÃO

As células T CD8<sup>+</sup> desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostasia corporal, sendo as principais células responsáveis por destruir as

células tumorais (VATAKIS et al., 2011). Após serem ativadas, as células T CD8 passam por mudanças epigenéticas, tornando-se efetivas na eliminação de antígenos estranhos (SPEISER; HO; VERDEIL, 2016). Porém, em algumas situações como o câncer, a constante apresentação de antígenos para as células T CD8<sup>+</sup>, característica de uma infecção crônica, pode levar essas células a um estado “disfuncional” ou “exausto”, caracterizado pela perda de sua capacidade responsiva a células infectadas ou tumorais e acúmulo da expressão de receptores inibitórios na sua superfície (DOLINA et al., 2021). É consenso que a mudança de estado celular, desde a diferenciação de células T naïves para um perfil efetor de memória ou de exaustão, envolve alterações epigenéticas globais, caracterizadas por mudanças a nível de histonas e de DNA que promovem o remodelamento da cromatina celular, culminando com o comprometimento epigenético intrínseco ao perfil fenotípico adquirido pelos linfócitos (SALUMETS et al., 2022). Sendo assim, o uso de inibidores epigenéticos como estratégia para a reversão do estado celular em que se encontram as células T CD8 no microambiente tumoral é promissor.

A epigenética se refere a mudanças químicas que ocorrem no DNA e nas histonas, sem interferir na sequência genética. Inibidores epigenéticos podem agir em histona metiltransferases ou acetiltransferases, assim facilitando ou não a transcrição gênica em determinada região do DNA (MENDENHALL et al., 2013). Trabalhos utilizando a epigenética para modular a funcionalidade de células tem ganhado um grande espaço na comunidade científica. Entretanto, o impacto de inibidores epigenéticos em células imunes permanece pouco estudado. Um trabalho pioneiro, realizado com a participação do grupo, avaliou o impacto de inibidores epigenéticos sobre a função de linfócitos T CD4 e constatou que alguns inibidores foram capazes de modular o perfil dessas células, polarizando-as para um perfil de resposta Th1, favorável ao controle tumoral (SCHEER et al., 2019).

A inibição do complexo CBP/p300 utilizando o inibidor A485 já foi descrito em diferentes linhagens tumorais, como na linhagem de linfoma do manto celular (LCM), em que o tratamento combinado entre o inibidor A485 e idelalisib, cujo alvo é a proteína PI3K, diminuiu consideravelmente a viabilidade de algumas linhagens de LCM (ZHOU et al., 2022). O CBP/p300 também já se mostrou como uma região

super regulada em câncer de pulmão, colorretal e hepatocelular, indicando um papel importante deste complexo na tumorigênese. Este mesmo trabalho mostrou que o tratamento com o inibidor A485 resultou em redução da proliferação de mais de 124 tipos linhagem celulares, de diferentes tipos de câncer (ZHANG et al., 2020). No entanto, o estudo da ação deste inibidor em células imunes, como linfócitos T CD8<sup>+</sup>, permanece pouco explorado.

Portanto, neste trabalho apresentamos uma visão diferente da utilização de inibidores epigenéticos, utilizando-os em linfócitos T CD8<sup>+</sup> humanos. Nos dados apresentados, pudemos observar que alguns inibidores foram capazes de modular eficientemente a função, a diferenciação e a atividade antitumoral de células T CD8<sup>+</sup> humanas, como visto após a inibição da acetiltransferase CBP/p300, tendo como principal função a adição de um grupo acetil à lisina 27 da histona H3. O processo de acetilação da lisina 27 histona H3 torna o DNA mais acessível, facilitando a transcrição de genes específicos (MOUSTAKIM et al., 2017). A inibição de H3K27ac foi capaz de modular em linfócitos T a expressão do marcador CD69, uma molécula que denota ativação inicial linfocitária e que é responsável por reter os linfócitos em órgãos linfoides secundários (ABBAS et al., 2019). O aumento da expressão de CD69 também foi observado quando inibimos a marca H3K27ac por períodos mais longos (8 dias) ou quando células T naïves são expostas ao estímulo policlonal na presença do inibidor da acetiltransferase CBP/p300. Por outro lado, a expressão de mediadores citotóxicos e inflamatórios em linfócitos T totais não foi afetada pela inibição da acetiltransferase CBP/p300. No entanto, quando partimos de células naive, a frequência de células T CD8<sup>+</sup> co-expressando as moléculas citotóxicas granzima B e perforina-1 foi reduzida após a inibição da acetiltransferase CBP/p300. Além disso, a inibição da acetiltransferase CBP/p300 também foi capaz de reduzir a frequência de células T CD8<sup>+</sup> expressando receptores inibitórios, como PD1 e TIGIT. Já a inibição de arginina metiltransferases por meio do tratamento com MS023, capaz de catalisar a dimetilação de resíduos de arginina na histona H4, se mostrou capaz de modular a frequência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras da molécula citotóxica granzima B, podendo indicar uma modulação do perfil citotóxico dessas células. Já o L-MOSES, um inibidor seletivo do bromodomínio PCAF, não mostrou capacidade

modulatória sobre a expressão de marcadores funcionais expressos em linfócitos T, assim como os inibidores GSKLSD1 e A366.

Após a ativação, os linfócitos T passam por processos de diferenciação e podem adquirir diversos fenótipos de memória, desde células que preservam o estado de *stemness*, como visto em células T de memória *stem-like* e – em menor proporção – em células T de memória central, até células com fenótipo efetor mais pronunciado, como as células T de memória efetora ou as células T de memória terminalmente exaustas (HENNING; ROYCHOUDHURI; RESTIFO, 2018). Buscando uma avaliação mais aprofundada sobre o efeito modulatório de inibidores epigenéticos em células T CD8<sup>+</sup>, analisamos o perfil fenotípico de diferenciação dessas células após estímulo policlonal. É possível definir os diferentes subtipos de células T CD8<sup>+</sup> de memória por meio da expressão dos marcadores CD45RA e CCR7, que permitem classificá-las em TN/TSCM, TCM, TEM e TEMRA. A co-expressão desses marcadores é característica de células T naïves ou de memória *stem-like*, pois denotam um estado celular menos diferenciado (DORFMAN; GERMAIN). Para distinguirmos as células T naïves das células T de memória *stem-like*, analisamos a expressão de marcadores de ativação, como CD69 e CD95, que são abundantemente expressos em células T de memória *stem-like*, mas não em células T naïves. Nesse sentido, as células T que sofreram ativação e expansão clonal após a inibição da acetiltransferase CBP/p300 co-expressaram CD45RA e CCR7, além de expressarem os marcadores de ativação CD69 e CD95, o que indica que a inibição da acetiltransferase CBP/p300 induz um perfil de memória *stem-like* robusto, associado com a preservação das características de *stemness* durante o processo de diferenciação de células T. A rigor, o perfil de células T de memória *stem-like* é caracterizado pela manutenção do fenótipo semelhante a células-tronco, cujas principais funções estão atreladas à capacidade de se renovar e de se diferenciar em outras subpopulações de células T de memória, além da alta capacidade proliferativa e de persistência. Esse perfil é imprescindível para a sustentação da resposta antitumoral dentro do microambiente tumoral, pois as células T de memória *stem-like* resistem por mais tempo ao ambiente supressor induzido pelas células tumorais (WANG; CHENG; ZHENG, 2022). Sendo assim a indução de células

T CD8<sup>+</sup> para um perfil de memória stem-like se tornou promissor, levantando uma possível imunoterapia. O perfil de células T CD8<sup>+</sup> de memória *stem-like* se manteve ao avaliarmos com 8 dias de tratamento ou quando utilizamos as células T CD8<sup>+</sup> naíves como ponto de partida.

Estudos realizados recentemente revelam que células T com o perfil TSCM são essenciais para o sucesso das imunoterapias. Por exemplo, pacientes respondedores à imunoterapia com células T alogênicas apresentavam um infiltrado tumoral contendo abundantemente células T CD8<sup>+</sup> com características de *stem-like*, com maior capacidade proliferativa, maior persistência e com maior capacidade de diferenciação em outros subtipos. Já os pacientes não respondedores apresentavam células com perfil mais terminalmente exausto, com baixa capacidade proliferativa e baixa persistência (KRISHNA et al., 2020).

Em virtude da relevância clínica atribuída a células T com perfil menos diferenciado, seguimos para ensaios visando uma aplicação clínica. Para isto, utilizamos células CAR-T isoladas de produtos de infusão de pacientes com leucemia linfoblástica aguda e linfoma não Hodgkin, tratados atualmente na nossa instituição. A imunoterapia com células CAR-T é um tratamento que utiliza as células T do próprio paciente, porém estas são modificadas para reconhecerem antígenos específicos por meio de um receptor quimérico, sem precisar da apresentação de antígenos restritos a moléculas de MHC expressas em células apresentadoras de antígenos (STERNER; STERNER, 2021). O tratamento utilizando células CAR-T vem ganhando grande espaço no campo das imunoterapias, em virtude da sua eficácia no tratamento de neoplasias hematológicas. No entanto, a imunoterapia com células CAR-T ainda apresenta diversas dificuldades, sendo as principais, i) o microambiente tumoral supressor, que eficientemente promove a exaustão das células CAR-T, ii) a migração ineficaz das células CAR-T para o sítio tumoral e iii) dificuldade de identificação de antígenos-alvo expressos exclusivamente pelas células tumorais (DAGAR et al., 2023b).

Atualmente, sabe-se que células CAR-T que apresentam um perfil menos diferenciado são importantes para manter o controle da proliferação de células tumorais a longo prazo (MEYRAN et al., 2023). Outra característica relativa a células

CAR-T com perfil menos diferenciado é a redução da produção e liberação de moléculas como granzima B e perforina-1 (ARCANGELI et al., 2022). Apesar da redução da produção de moléculas relacionadas a citotoxicidade celular, os nossos dados preliminares apontam para um maior controle tumoral in vitro em um período agudo (24h) e um período mais longo (7 dias). Além disso, as células TSCM também têm como característica uma alta capacidade proliferativa, o que foi observado após a inibição da acetiltransferase CBP/p300 em células CAR-T anti-CD19 e células T de doadores saudáveis ativadas com estímulo policlonal; o perfil TSCM foi fortemente induzido durante as divisões celulares, enquanto as células T estimuladas e não tratadas foram gradualmente perdendo esse perfil e adquirindo um perfil mais diferenciado. A preservação do estado de *stemness* e a alta capacidade proliferativa induzida em células T após a inibição da acetiltransferase CBP/p300 podem trazer vantagens e melhorias para o tratamento de pacientes oncológicos com células CAR-T.

O direcionamento de células CAR-T utilizando TGF- $\beta$  também se mostrou eficaz na indução do perfil de *stemness* e na indução de moléculas de residência tecidual, o que se mostrou eficaz contra tumores sólidos e contra neoplasias hematológicas (JUNG et al., 2023). Tendo em vista os resultados apresentados neste trabalho, o tratamento com o inibidor A485, que induz um perfil TSCM, pode ser uma estratégia promissora capaz de aprimorar a funcionalidade de células CAR-T.

## **7. CONCLUSÃO**

A inibição da acetiltransferase CBP/p300 é um potente modulador das funções efetoras de células T convencionais e de células CAR-T, ao promover o aumento da capacidade proliferativa, a preservação das características de células-tronco durante a diferenciação celular e o aumento da capacidade antitumoral dessas células. Portanto, a inibição da acetiltransferase CBP/p300 desponta como estratégia promissora capaz de potencializar a atividade antitumoral de células CAR-T.

## REFERÊNCIAS

- ALSAQER, S. F. et al. **Inhibition of LSD1 epigenetically attenuates oral cancer growth and metastasis.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)>.
- APPAY, V.; SAUCE, D. **Naive T cells: The crux of cellular immune aging?** *Experimental Gerontology*. 2014.
- ARCANGELI, S. et al. CAR T cell manufacturing from naive/stem memory T lymphocytes enhances antitumor responses while curtailing cytokine release syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, v. 132, n. 12, 15 jun. 2022.
- BEIDER, K. et al. Molecular and Functional Signatures Associated with CAR T Cell Exhaustion and Impaired Clinical Response in Patients with B Cell Malignancies. *Cells*, v. 11, n. 7, 1 abr. 2022.
- BIJLSMA, M. F. et al. Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cellular Signalling*, v. 19, n. 12, p. 2596–2604, dez. 2007.
- Book Review CANCER CELL CULTURE-METHODS AND PROTOCOLS Edited by Simon. [s.d.].
- DAGAR, G. et al. **Harnessing the potential of CAR-T cell therapy: progress, challenges, and future directions in hematological and solid tumor treatments.** *Journal of Translational Medicine*. 1 dez. 2023a.
- DAGAR, G. et al. **Harnessing the potential of CAR-T cell therapy: progress, challenges, and future directions in hematological and solid tumor treatments.** *Journal of Translational Medicine*. 1 dez. 2023b.
- DHANAK, D.; JACKSON, P. **Development and classes of epigenetic drugs for cancer.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 5 dez. 2014.
- DOLINA, J. S. et al. **CD8<sup>+</sup> T Cell Exhaustion in Cancer.** *Frontiers in Immunology*. 20 jul. 2021.
- DORFMAN, J. R.; GERMAIN, R. N. **MHC-dependent survival of naïve T cells? A complicated answer to a simple question.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/micinf](http://www.elsevier.com/locate/micinf)>.
- EDIÇÃO, N. et al. **Imunologia Celular e Molecular.** [s.l: s.n.].
- ERAM, M. S. et al. A Potent, Selective, and Cell-Active Inhibitor of Human Type i Protein Arginine Methyltransferases. *ACS Chemical Biology*, v. 11, n. 3, p. 772–781, 18 mar. 2016.
- ESHAR, Z. et al. **Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the  $\gamma$  or C subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* [s.l: s.n.].
- HENNING, A. N.; ROYCHOUDHURI, R.; RESTIFO, N. P. **Epigenetic control of CD8<sup>+</sup> T'cell differentiation.** *Nature Reviews Immunology*. 1 maio 2018.
- HOGG, S. J. et al. **Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity.** *Nature Reviews Drug Discovery*. 1 nov. 2020.
- JOHANSSON, S.; PRICE, J.; MODO, M. Effect of Inflammatory Cytokines on Major Histocompatibility Complex Expression and Differentiation of Human Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells*, v. 26, n. 9, p. 2444–2454, 1 set. 2008.

- KHANBAN, H.; FATTAHI, E.; TALKHABI, M. IN VIVO ADMINISTRATION OF G9A INHIBITOR A366 DECREASES OSTEOGENIC POTENTIAL OF BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS. **EXCLI Journal**, v. 18, p. 300–309, 2019.
- KNÖRCK, A. et al. Cytotoxic Efficiency of Human CD8<sup>+</sup> T Cell Memory Subtypes. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 13 abr. 2022.
- KRISHNA, S. et al. Stem-like CD8 T cells mediate response of adoptive cell immunotherapy against human cancer. **Science**, v. 370, n. 6522, p. 1328–1334, 11 dez. 2020.
- LASKO, L. M. et al. Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours. **Nature**, v. 550, n. 7674, p. 128–132, 5 out. 2017.
- MATOS, T. R. et al. Central memory T cells are the most effective precursors of resident memory T cells in human skin. **Science Immunology**, v. 7, n. 70, 1 abr. 2022.
- MAVI, A. K. et al. CAR T-cell therapy: Reprogramming patient's immune cell to treat cancer. **Cellular Signalling**, v. 105, 1 maio 2023.
- MENDENHALL, E. M. et al. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 1133–1136, dez. 2013.
- MEYRAN, D. et al. **T STEM-like CAR-T cells exhibit improved persistence and tumor control compared with conventional CAR-T cells in preclinical models.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.
- MINNIE, S. A.; HILL, G. R. Immunotherapy of multiple myeloma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 4, p. 1565–1575, 1 abr. 2020.
- MIZUKAMI, Y. et al. Abnormal tumor vasculatures and bone marrow-derived pro-angiogenic cells in cancer. **International Journal of Hematology**, v. 95, n. 2, p. 125–130, fev. 2012.
- MOUSTAKIM, M. et al. Discovery of a PCAF Bromodomain Chemical Probe. **Angewandte Chemie**, v. 129, n. 3, p. 845–849, 16 jan. 2017.
- NAGARSHETH, N.; WICHA, M. S.; ZOU, W. **Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy.** **Nature Reviews Immunology**. 1 set. 2017.
- NIELL, H. B.; MAUER, A. M.; RADEMACHER, D. **Cytotoxic effects of alpha-and gamma-interferon and tumor necrosis factor in human bladder tumor cell lines.** **Urol Res**. 1994.
- PHILIP, M. et al. Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 452–456, 25 maio 2017.
- SALUMETS, A. et al. Epigenetic quantification of immunosenescent CD8<sup>+</sup> TEMRA cells in human blood. **Aging Cell**, v. 21, n. 5, 1 maio 2022.
- SAMJI, T.; KHANNA, K. M. **Understanding memory CD8<sup>+</sup> T cells.** **Immunology Letters**. 1 maio 2017.
- SCHEER, S. et al. A chemical biology toolbox to study protein methyltransferases and epigenetic signaling. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.
- SPEISER, D. E.; HO, P. C.; VERDEIL, G. **Regulatory circuits of T cell function in cancer.** **Nature Reviews Immunology**. 1 out. 2016.

STERNER, R. C.; STERNER, R. M. **CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies.** *Blood Cancer Journal*. 1 abr. 2021.

STOWERS, S. J. et al. **The Role of Oncogenes in Chemical Carcinogenesis Environmental Health Perspectives.** [s.l: s.n.].

STRICKLAND, M. et al. Mitochondrial Dysfunction in CD4<sup>+</sup> T Effector Memory RA<sup>+</sup> Cells. *Biology*, v. 12, n. 4, 1 abr. 2023.

TAKADA, K.; JAMESON, S. C. Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 10, p. 2253–2269, 28 set. 2009.

TOMASIK, J.; JASIŃSKI, M.; BASAK, G. W. **Next generations of CAR-T cells - new therapeutic opportunities in hematology?** *Frontiers in Immunology*. 28 out. 2022.

VAHIDI, Y. et al. CD8-positive memory T cells in tumor-draining lymph nodes of patients with breast cancer. *BMC Cancer*, v. 20, n. 1, 30 mar. 2020.

VATAKIS, D. N. et al. Antitumor activity from antigen-specific CD8 T cells generated in vivo from genetically engineered human hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 51, 20 dez. 2011.

VOSKOBOINIK, I.; WHISSTOCK, J. C.; TRAPANI, J. A. **Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology.** *Nature Reviews Immunology*. 27 jun. 2015.

WANG, F.; CHENG, F.; ZHENG, F. **Stem cell like memory T cells: A new paradigm in cancer immunotherapy.** *Clinical Immunology*. 1 ago. 2022.

XU, C. et al. CD8<sup>+</sup> T cells mediate the antitumor activity of frankincense and myrrh in hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, v. 16, n. 1, 21 maio 2018.

XU, L. et al. **The roles of stem cell memory T cells in hematological malignancies.** *Journal of Hematology and Oncology*. 14 out. 2015.

ZHANG, B. et al. A novel histone acetyltransferase inhibitor A485 improves sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cells to TRAIL. *Biochemical Pharmacology*, v. 175, 1 maio 2020.

ZHANG, J.; ZHOU, X.; HAO, H. **Macrophage phenotype-switching in cancer.** *European Journal of Pharmacology*. 15 set. 2022.

ZHOU, X. RU et al. P300/CBP inhibition sensitizes mantle cell lymphoma to PI3K $\delta$  inhibitor idelalisib. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 43, n. 2, p. 457–469, 1 fev. 2022.