



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio
Prudente

Área de Oncologia

Maria Letícia Rodrigues Carvalho

**Impacto do Complexo Repressor Polycomb 2 (PRC2) na
modulação in vitro de células T CD8⁺ humanas**

Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Orientador: Dr. Tiago da Silva Medina

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Maria.

Impacto do Complexo Repressor Polycomb 2 (PRC2) na modulação in vitro de células T CD8+ humanas. / Maria Carvalho. São Paulo, 2023.

62f.

**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

Maria Letícia Rodrigues Carvalho

Impacto do Complexo Repressor Polycomb 2 (PRC2) na modulação in vitro de células T CD8⁺ humanas

Aprovado em: 03/03/2023

Banca examinadora

Orientador: Dr. Tiago da Silva Medina

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dra. Denise Moraes da Fonseca

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Membro da banca: Dr. Tiago Góss dos Santos

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr. Ricardo Weinlich

Instituição: Hospital Israelita Albert Einstein

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa - 2021/00643-5

AGRADECIMENTOS

Dou início aos agradecimentos por meus pais, que sempre acreditaram que a única maneira de engrandecimento pessoal e profissional seria por meio da educação. Obrigada, Seu Maurício e Dona Francisca por sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial. O preço da distância e da saudade entre CE – SP é caro, mas no final valeu a pena.

Dentro da Universidade, me apaixonei por Imunologia através da minha antiga e maravilhosa professora Juliana Ueda; obrigada, Ju, por me abrir as portas para esse universo, além disso, por ter me dado a oportunidade de conhecer meu atual orientador Tiago Medina, a quem agradeço imensamente a oportunidade de ter me aceitado em seu grupo. Obrigada, Tiago, por todos os ensinamentos, todo apoio e credibilidade que tem me dado desde o início.

Agradeço grandemente os meus amigos do laboratório por compartilharem todas as frustrações e vitórias do dia-a-dia, obrigada pelas trocas, risadas, almoços, cafés, cervejas, forrós em todo esse período. Amandinha, Gabi, Pedro, Glauco, Alexandre, Emmanuel, vocês são pessoas maravilhosas e foram essenciais para que esse projeto acontecesse. Agradeço as lindas e proativas técnicas desse grupo, Ari e Mari, por todo auxílio que me deram. Em especial, Mari, obrigada por ter feito a revisão do meu trabalho, você é demais.

Agradeço a todo o grupo do Dr. Martín Bonamino, que fez parte e engrandeceu esse trabalho. Agradeço a toda equipe e suporte do A.C Camargo, ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil. Por fim, agradeço aos membros da banca por aceitarem o convite e dedicarem seu tempo a este momento.

RESUMO

CARVALHO, M. L. R.; RONDINELLI, A.; HAJDU, K. L.; PEREIRA, P.H.B.; CHAVES, A.S.; PICCIN, M.P.C.; GUSMÃO, A. F.; VITIELLO, G.F.; KINKER, G.S.; LIMA, V.C.C.; BONAMINO, M. H.; MEDINA, T.S. **Impacto do Complexo Repressor Polycomb 2 (PRC2) na modulação *in vitro* de células T CD8⁺ humanas.** Dissertação. São Paulo; Fundação Antonio Prudente, 2023.

INTRODUÇÃO: Células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs) têm como principal atributo a capacidade de reconhecer e eliminar células-alvo que apresentem epítomos não próprios. Na resposta anti-tumoral, a estimulação persistente ao antígeno pode levar à indução da exaustão de tais células, que passam a apresentar um aumento na expressão de marcadores inibitórios, tornando-as disfuncionais. Nesse contexto, lançamos a hipótese de que mecanismos epigenéticos podem agir como indutores de programas intracelulares envolvidos na supressão de CTLs e que a manipulação farmacológica do epigenoma pode contribuir para a potencialização da resposta citotóxica ao aumentar a capacidade antitumoral dessas células. **METODOLOGIA:** Foi avaliada inicialmente a atividade modulatória de inibidores de diferentes subunidades do complexo repressor polycomb 2 (PRC2) sobre a função efetora de linfócitos T CD8⁺ humanos isolados a partir de PBMCs de doadores saudáveis. Além disso, desenvolvemos um sistema de células CAR-T anti-CD19 utilizando metodologias não-virais de inserção gênica como o sistema transposon-transposase Sleeping Beauty (SB), que representa uma alternativa mais acessível comparada à abordagem tradicional e possibilita a entrega do transgene por eletroporação, agilizando o processo de geração das células CAR-T. **RESULTADOS:** A inibição das subunidades EED e EZH2 através das sondas epigenéticas A395 e GSK343, respectivamente, aumentou e sustentou ao longo de uma cinética temporal a expressão de marcadores de ativação (CD25 e CD69), mediadores inflamatórios (IFN- γ e TNF- α) e granzima B (GzmB), principal mediador citotóxico produzido por linfócitos T CD8⁺, sem que houvesse perda de viabilidade celular. Ademais, a inibição do complexo PRC2 impactou discretamente a proliferação de células T CD8⁺, enquanto diminuiu a frequência de marcadores inibitórios como PD1. Utilizando-se dados públicos de expressão gênica de células T CD8⁺ de camundongos estimuladas *in vitro* por 72h com anti-CD3/CD28, a deleção condicional de EZH2 promoveu o aumento da expressão gênica de citocinas, quimiocinas e de seus receptores, além da maquinaria de citotoxicidade, o que favoreceu o enriquecimento de vias relacionadas à citotoxicidade celular e à capacidade efetora. Para validarmos o potencial antitumoral citotóxico de linfócitos T CD8⁺ após a repressão do PRC2, tratamos células CAR-T anti-CD19 com os inibidores GSK343 e A395, os quais também favoreceram o aumento da expressão de mediadores antitumorais e reduziram a expressão de PD1. Além disso, células CAR-T anti-CD19 tratadas com inibidores de PRC2 eliminaram as células de linhagem tumoral de Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) CD19⁺ Nalm-6 mais eficientemente em comparação com células CAR-T anti-CD19 tratadas com os controles negativos. **CONCLUSÃO:** A inibição do complexo PRC2 potencializou a produção de mediadores inflamatórios e citotóxicos pelas células T CD8 ou células CAR-T. Portanto, nossos resultados sugerem que a modulação epigenética por meio da inibição deste complexo pode ser uma abordagem terapêutica promissora no tratamento oncológico.

Palavras-chave: Linfócitos T, Modulação Epigenética, Células CAR-T, Resposta Antitumoral.

ABSTRACT

CARVALHO, M. L. R.; RONDINELLI, A.; HAJDU, K. L.; PEREIRA, P.H.B.; CHAVES, A.S.; PICCIN, M.P.C.; GUSMÃO, A. F.; VITIELLO, G.F.; KINKER, G.S.; LIMA, V.C.C.; BONAMINO, M. H.; MEDINA, T.S. **Impact of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) on the *in vitro* modulation of human CD8+ T cells** Dissertação. São Paulo; Fundação Antonio Prudente, 2023.

INTRODUCTION: Cytotoxic CD8+ T lymphocytes (CTLs) are the main cells responsible for the recognition and elimination of tumor cells. During antitumor responses, chronic antigen stimulation induces CTL exhaustion, which is characterized by the progressive accumulation of inhibitory markers and suboptimal functional properties. Here, we hypothesized that epigenetic mechanisms govern CTL functions, and that pharmacological approaches capable of modulating the CTL epigenome can improve their cytotoxic activity, leading to an improved antitumor response. **METHODS:** We evaluated the modulatory effect of inhibitors that target different subunits of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) on the function of human CD8+ T lymphocytes from healthy PBMCs. In addition, we have developed anti-CD19 CAR-T cells using the Sleeping Beauty (SB) transposon-transposase system, a non-viral gene insertion method. **RESULTS:** The inhibition of the EED and EZH2 subunits using the epigenetic probes A395 and GSK343 increased and sustained across time the CTL expression of activation markers (i.e., CD25 and CD69), inflammatory mediators (i.e., IFN- γ and TNF- α) and the main cytotoxic granule granzyme B (GzmB), without affecting the CTL viability. In addition, the PRC2 inhibition showed a subtle impact on the CTL proliferation. Furthermore, the use of the epigenetic probes seemed to mitigate the CTL exhaustion process, as seen by the lower expression of PD1 upon PRC2 inhibition when compared with untreated cells. Taking advantage of publicly available transcriptome data from murine CD8+ T cells polyclonally stimulated with anti-CD3/CD28 for 72h, we found that the conditional deletion of EZH2 upregulated the gene expression of cytokines, chemokines/receptors, and the whole cytotoxic machinery, which favored the enrichment of pathways associated with cell cytotoxicity and effector-like cells. In line with this, the PRC2 inhibition of anti-CD19 CAR-T cells also potentiated the expression of antitumor (Gzmb) and inflammatory (IFN- γ and TNF- α) mediators when compared to the control groups. Moreover, inhibition of the PRC2 complex also seemed to have an impact on CAR-T cell exhaustion, as PD1 was dramatically reduced after the treatment. To validate the antitumor cytotoxic potential of CD8+ T lymphocytes after PRC2 repression, we co-cultured CAR-T cells with LLA-B CD19+ Nalm-6 tumor lineage cells and found that the PRC2 inhibition eliminated more efficiently the target cells compared to the control group. **CONCLUSION:** The PRC2 inhibition potentiated inflammatory and cytotoxic mediators of human lymphocytes and led to improved antitumor activity of CAR-T cells. Therefore, our results suggest that epigenetic modulation through the inhibition of this complex can be a promising therapeutic approach in cancer treatment.

Keywords: T Lymphocytes, Epigenetic Modulation, CAR-T Cells, Antitumor Response

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação de células T CD8 ⁺ naives por células apresentadoras de antígeno (APCs).....	3
Figura 2. Checkpoints imunológicos.....	5
Figura 3. Gerações das células CAR-T.	10
Figura 4 Esquema de plaqueamento e estimulação das células TCD8 Naïves purificadas.	14
Figura 6. Esquema da geração de células CAR-T.....	18
Figura 7 Controles de Marcação celular por citometria de fluxo.....	19
Figura 8 Estratégia de Gates para a identificação de células T CD8 humanas..	21
Figura 9 Viabilidade celular.....	21
Figura 10 Análise da frequência de células T CD8 ⁺ co-expressando marcadores de ativação (CD25 e CD69) e o marcador citotóxico Granzima B por citometria de fluxo.	23
Figura 11 . Análise de da expressão e secreção de IFN- γ e TNF α por citometria de fluxo e CBA.....	24
Figura 12 Análise da frequência de células T CD8 ⁺ co-expressando os marcadores de ativação CD25 e CD69 e o mediador citotóxico Granzima B por citometria de fluxo..	25
Figura 13 . Regulação mediada por PRC2 da expressão e secreção de IFN- γ e TNF α por células T CD8.....	27
Figura 14 . Análise da distribuição topológica de células T CD8 tratadas com inibidores do PRC2 ou com os seus respectivos controles negativos.....	28
Figura 15 . Efeito da inibição do complexo PRC2 sobre a capacidade proliferativa de células T CD8 ⁺ humanas efectoras.....	29
Figura 16 . A inibição do PRC2 não acelera o perfil de expressão de receptores inibitórios em linfócitos T CD8 efetores frente a estímulo policlonal mais crônico.....	30
Figura 17 Análise dos dados de RNA-seq de Weng NP et al., 2018 de células T CD8 murinas WT e ezh2 KO.....	31

Figura 18 . Estratégia de Gates.....	32
Figura 19 . Caracterização fenotípica de células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EED nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação.	33
Figura 20 . Análise da expressão de receptores inibitórios em células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EED do complexo PRC2.....	34
Figura 21 . Caracterização fenotípica de células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EZH2 nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação celular.	35
Figura 22 . Análise da expressão de receptores inibitórios em células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EZH2 do complexo PRC2.....	36
Figura 23 . Ensaio de morte celular com células de linhagem celular de LLA-B Nalm-6 CD19+.	37
Figura 24. Efeitos da inibição do complexo PRC2 em células T.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista de anticorpos utilizados. Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos com células T CD8 naïves e células CAR-T. 15

Lista de abreviaturas/Siglas/Símbolos

- APC – Célula apresentadora de antígenos (*Antigen Presenting Cell*)
- CAR – Receptor quimérico de antígenos (*Chimeric Antigen Receptor*)
- CD3z – Cadeia zeta do complexo CD3
- CRS – Síndrome de liberação de citocinas (*Cytokine Release Syndrome*)
- CTL – Linfócito T citotóxico (*Cytotoxic T cell*)
- FMO – Fluorescência menos um (*Fluorescence Minus One*)
- H3K27me3 – Trimetilação da lisina 27 (K27) da histona H3
- HLA – Antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen*)
- IFN γ – Interferon-gama
- IL - Interleucina
- INCA – Instituto Nacional de Câncer
- ITR – Sequências terminais invertidas (*Inverted Terminal Repeats*)
- LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda
- MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)
- PBMC – Células mononucleadas do sangue periférico
- PBS – Tampão fosfato salino
- PcG – Polycomb
- PRC1 – Complexo repressor polycomb 2 (*Polycomb repressive complex 1*)
- PRC2 – Complexo repressor polycomb 2 (*Polycomb repressive complex 2*)
- SB – *Sleeping Beauty*
- ScFv – Fragmento variável de cadeia única (*single-chain variable fragment*)
- SFB – Soro Fetal Bovino
- TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Tcm – Célula T de memória central

TCR – Receptor de células T

Teff – Célula T efetora de vida curta

Tem – Célula T de memória efetora

Tex – Célula T exausta

Th – Célula T *helper* (auxiliadora)

TIL – Linfócito infiltrante do tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocyte*)

TME – Microambiente tumoral (*Tumor microenvironment*)

TNF α – Fator de necrose tumoral α (*Tumor necrosis factor- α*)

Tpex – Célula T progenitora exausta

Treg – Célula T regulatória

Tscm – Célula T de memória '*stem*'

19BBz – CAR anti-CD19 com domínio coestimulatório 4-1BB e cauda CD3z

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Visão geral da imunidade antitumoral e o infiltrado inflamatório.....	1
1.2 O papel dos linfócitos T CD8+ citotóxicos no microambiente tumoral	1
1.3 Modificações epigenéticas associadas à identidade e à plasticidade celular	5
1.4 Complexo Repressor Polycomb 2 (PRC2) e seus desdobramentos na regulação da resposta imune.....	6
1.5 O papel da histona metiltransferase EZH2 em células T CD8+ humanas.....	7
1.6 O uso de inibidores químicos como agentes capazes de modular a ação de proteínas metiltransferases.....	8
1.7 Terapia com células CAR-T	8
1.8 O uso de células CAR T para tratamento de leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B)	10
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo Geral.....	12
3.2 Objetivos específicos	12
3.2.1 <i>Objetivo específico 1</i>	
3.2.2 <i>Objetivo específico 2</i>	
3.2.3 <i>Objetivo específico 3</i>	
3.2.4 <i>Objetivo específico 4</i>	
4. DESENHO EXPERIMENTAL E METODOLOGIAS	12
4.1 Seleção e recrutamento de doadores	12
4.2 Obtenção das Células Mononucleares do sangue periférico e células T CD8+ naïves	12
4.3 Cultura de células T CD8+ naïves e tratamento com inibidores epigenéticos	13
.....	14

4.4	Análise de funcionalidade das células T CD8 ⁺ tratadas com os inibidores epigenéticos	14
4.5	Ensaio de proliferação e análise de receptores inibitórios em T CD8 ⁺ humanas tratadas com os inibidores epigenéticos.....	15
4.6	Quantificação de citocinas por CBA.....	16
4.7	Construção e cultura de células CAR-T	17
4.7.1.	Plasmídeos e clonagens	17
4.7.2.	Cultura de células CAR-T.....	17
4.7.3	Eletroporação e expansão dos linfócitos	18
4.7.4	Imunofenotipagem e análise da expressão de marcadores em células CAR-T por citometria de fluxo	19
4.8	Ensaio de Lise	19
4.9	Expressão diferencial de genes expressos em células T CD8 ⁺ efectoras de camundongos WT vs EZH2 ^{-/-}	20
4.10	Análise Estatística.....	20
5.	RESULTADOS	20
5.1	Aumento da frequência de células T CD8 ⁺ efectoras expressando mediadores inflamatórios e citotóxicos mediante inibição da subunidade EED do complexo PRC2	20
5.2	Aumento da frequência de células T CD8 ⁺ efectoras expressando mediadores inflamatórios e citotóxicos mediante inibição da subunidade EZH2 do complexo PRC2	25
5.3	Topologia das células T CD8 ⁺ humanas após a inibição do PRC2.....	27
5.4	A Inibição das subunidades EED e EZH2 do complexo repressor Polycomb 2 modula a proliferação de células T CD8 ⁺ humanas num período mais crônico de estimulação	28
	29
5.5	A Inibição das subunidades EED e EZH2 do complexo repressor Polycomb 2 não altera o perfil de expressão de marcadores associados à exaustão celular em células T CD8 ⁺ humanas após um período mais crônico de estimulação	29

5.6 Análise transcriptômica de linfócitos T CD8+ efetores de camundongos WT vs Ezh2 ^{-/-}	31
5.7 Caracterização fenotípica de células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EED do complexo PRC2	32
5.8 Análise da expressão de marcadores associados à exaustão celular em células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EED do complexo PRC2.....	33
5.9 Caracterização fenotípica de células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EZH2 do complexo PRC2	34
5.10 Análise da expressão de marcadores associados à exaustão celular em células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EZH2 do complexo PRC2	35
5.11 A inibição da subunidade EED do Complexo PRC2 em células CAR-T anti-CD19 aumenta sua capacidade antitumoral frente às células de linhagem de LLA-B	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Visão geral da imunidade antitumoral e o infiltrado inflamatório

O estabelecimento dos tumores é entendido como um processo evolutivo que envolve o acúmulo de mutações nas células cancerígenas¹. Entretanto, estudos recentes deixaram evidente a vasta complexidade do microambiente tumoral (TME)². Além das células tumorais, o TME é composto por diversas populações de células imunes e de células do estroma com propriedades que permanecem pouco esclarecidas. Com o advento e implementação clínica de diferentes modalidades de imunoterapias, avanços clínicos recentes deram ainda mais urgência à compreensão da relação entre o sistema imune e o câncer³

A vigilância imunológica é uma função fisiológica natural que permite o reconhecimento e a destruição de células mutadas com o intuito de evitar a formação de tumores; e para combatê-los após sua formação. O reconhecimento específico de antígenos com base em estranheza, tamanho, complexidade e degradabilidade deve ser equilibrado com mecanismos de indução de tolerância para limitar a expansão do tumor⁴. Além disso, as células tumorais apresentam diversos mecanismos de escape que limitam a resposta imune, incluindo regulação negativa da expressão do MHC, perda da expressão de antígenos alvo, falha na expressão de moléculas coestimuladoras para ativar as respostas celulares e aumento da expressão de moléculas inibitórias, além da produção direta de citocinas imunossupressoras⁵.

Um dos principais mecanismos envolvidos no combate às células tumorais é através da função de linfócitos T, tanto pela função primordial de citotoxicidade mediada por células T CD8+, quanto pela função auxiliadora de linfócitos T CD4+, sobretudo quando polarizados para o subtipo TH1. Ademais, as células assassinas naturais (NK) também desempenham um papel importante, reconhecendo e destruindo células tumorais sem necessidade direta de sensibilização ou restrição ao MHC. As células B também são um importante componente de defesa; promovendo proteção através da secreção de imunoglobulinas.

1.2 O papel dos linfócitos T CD8+ citotóxicos no microambiente tumoral

Os linfócitos T têm sido os principais alvos de imunoterapias contra o câncer, principalmente linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTLs), devido a seu alto potencial em eliminar células que sofreram mutação^{4,5}.

De modo geral, células T CD8+ reconhecem células alvo através da expressão de antígenos expressos em um conjunto particular de moléculas do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC)⁶. Em humanos, todas as células nucleadas expressam MHC de classe I, que são codificadas no cromossomo 6 no locus MHC; o MHC humano é referido como *Human Leucocyte Antigen* (HLA) e contém três loci (HLA-A, -B e -C)^{6,7}. As moléculas do MHC são capazes de apresentar uma vasta gama de peptídeos. Células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, como as células dendríticas (DCs), são essenciais para a indução de respostas de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs)⁸. Quando ativados, linfócitos T adquirem uma alta capacidade móvel e conseguem migrar através dos tecidos à procura de antígenos estranhos apresentados pelas moléculas de MHC-I⁹. Após reconhecer e interagir através do complexo peptídeo-MHC-I via receptor de célula T (TCR), estabelece-se a sinapse imunológica¹⁰. O contato entre a célula T CD8⁺ e a célula-alvo é habitualmente de curta duração, mas mesmo essas interações por um curto período de tempo são suficientes para iniciar a transdução de sinal em células imunes. Além disso, a interação entre moléculas coestimuladoras como B7-CD28 e a liberação de citocinas fornecem sinais importantes para a ativação de células T^{11,12} (**Fig. 1**). Posteriormente aos sinais de ativação, as células T desencadeiam cascatas de eventos relacionados à i) sobrevivência, por meio da produção de moléculas antiapoptóticas, ii) expansão clonal e iii) diferenciação em fenótipos relacionados a células T efetoras (T_{eff}), de memória (T_{mem}) ou exaustas (T_{ex}), de modo que as vias relacionadas à diferenciação desses perfis estão associadas a alterações transcricionais e

epigenéticas distintas que proporcionam às células diferentes capacidades funcionais e, portanto, potencial terapêutico.

Os CTLs são capazes de eliminar células-alvo através de diferentes vias, envolvendo contato direto entre células efetoras e células-alvo, ou indiretamente por meio da liberação de citocinas, como IFN- γ e TNF- α ¹³. A atividade citolítica requer contato direto célula-célula, resulta na apoptose de células-alvo e pode ser mediada por dois mecanismos diferentes¹⁴. No primeiro caso, o ligante Fas (FasL), que é expresso na superfície dos CTLs, liga-se ao receptor Fas (CD95) na célula-alvo¹⁵. Essa ligação desencadeia a morte da célula-alvo através da ativação da via extrínseca da apoptose, com consequente ativação da caspase 8 (iniciadora) e caspase 3 (efetora). No segundo caso, o CTL libera grânulos de perforina e granzimas no espaço intercelular. Na membrana da célula alvo, as perforinas oligomerizam-se e formam poros transmembrana, que permitem a entrada e a difusão de granzimas no citoplasma da célula alvo¹⁶. Granzimas são proteínas que atuam na ativação do processo apoptótico, pois podem ativar tanto caspases iniciadoras, como a caspase 10, quanto diretamente ativar a caspase 3. A absorção do material granular pela célula alvo causa a morte celular de forma dependente e independente de caspases¹⁷.

Outro aspecto importante da resposta dos linfócitos TCD8⁺ é a sua capacidade de produzir mediadores inflamatórios, como IFN- γ e TNF- α ¹⁸. A secreção de IFN- γ exerce

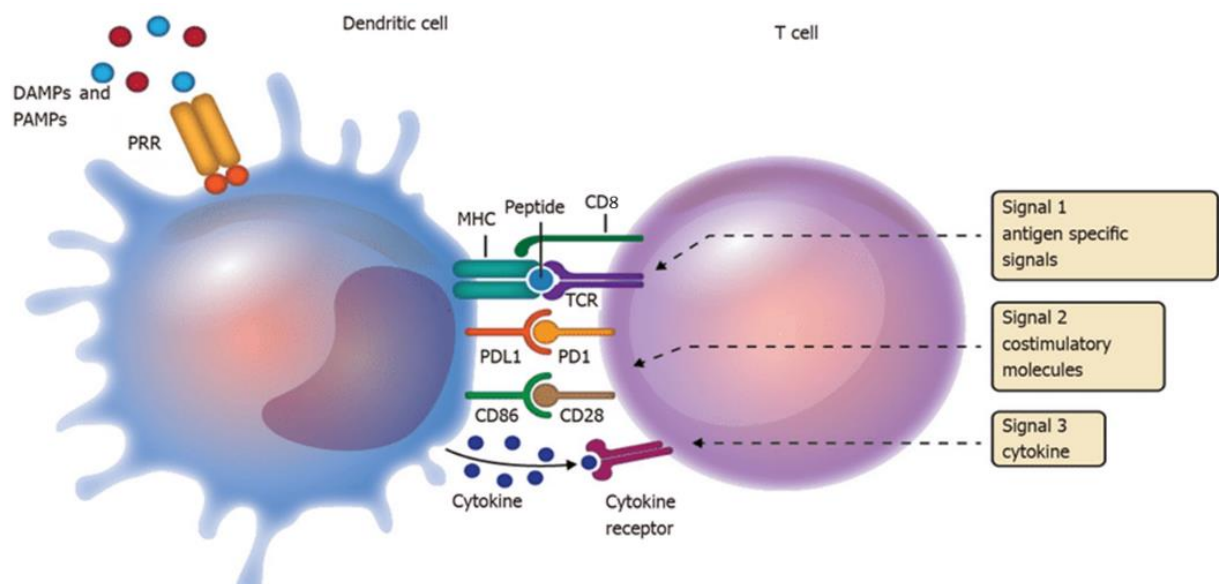


Figura 1 Ativação de células T CD8⁺ naivas por células apresentadoras de antígeno (APCs). O primeiro sinal se dá com a interação entre o TCR e o complexo peptídeo-MHC de Classe I. O segundo sinal ocorre através da interação entre as moléculas coestimuladoras, como o CD28 (presente nas células T) e o CD80 e CD86 (presentes nas APCs). E por fim, no terceiro sinal, há secreção de citocinas pelas APCs que podem potencializar a atividade citolítica das células TCD8⁺

Fonte: Adaptado de Kambayashi T. & Laufer T., 2014.

efeitos diretos sobre as células T, favorecendo a polarização de células T CD4⁺ virgens para o fenótipo Th1 secretor de citocinas pró-inflamatórias e facilitando a ativação, proliferação e secreção de mais IFN- γ por células T CD8⁺ citotóxicas, contribuindo para um melhor prognóstico em cânceres^{19, 20}. Além disso, essa citocina realiza um papel importante na coordenação das respostas imunes, induzindo a produção de IgG por plasmócitos derivados de linfócitos B, ampliando a apresentação do antígeno por DC, aumentando a capacidade fagocítica dos macrófagos, além de induzir a polarização para um fenótipo M1, o qual tem ação antitumoral no TME^{21- 23}. Nesse contexto, a indução e manutenção de células T CD8⁺ funcionais no TME são fundamentais para o controle da progressão maligna. Entretanto, nos casos em que há progressão do tumor, células tumorais desenvolvem diferentes mecanismos de escape, podendo inibir a resposta de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos²⁴.

A supressão da sinalização de células imunes no tumor é refletida por diferentes maneiras nas quais as células tumorais regulam negativamente a atividade de moléculas estimuladoras enquanto regulam positivamente a atividade de receptores inibitórios^{25, 26}. Diversos marcadores inibitórios foram identificados e estudados em tumores nas últimas décadas, incluindo, mas não se limitando a, PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, TIGIT e CD39. Essas moléculas são denominadas “*immune checkpoints*”²⁷⁻²⁹ (**Fig. 2**). Em resposta à exposição crônica aos antígenos presentes nas células tumorais, linfócitos T passam por um processo de exaustão celular, passando a apresentar capacidade efetora reduzida e expressão aumentada de receptores inibitórios³⁰⁻³³. Dessa forma, as células imunes presentes no infiltrado tumoral tornam-se, comumente, não responsivas ao tumor. Estabelece-se, assim, um microambiente que favorece o crescimento tumoral, impossibilitando a atuação de células imunes efectoras^{34,35}. Diante disso, estratégias capazes de torná-las responsivas ao tumor são

cruciais para o desenvolvimento de imunoterapias efetivas contra o câncer.

1.3 Modificações epigenéticas associadas à identidade e à plasticidade celular

Os estudos relacionados à regulação epigenética têm crescido abundantemente na última década. O termo “epigenética” foi originalmente proposto por Conrad Waddington para descrever mudanças hereditárias em um fenótipo celular que eram independentes de alterações na sequência do DNA. Apesar de décadas de debate e pesquisa, uma definição consensual de epigenética permanece controversa e ambígua³⁶.

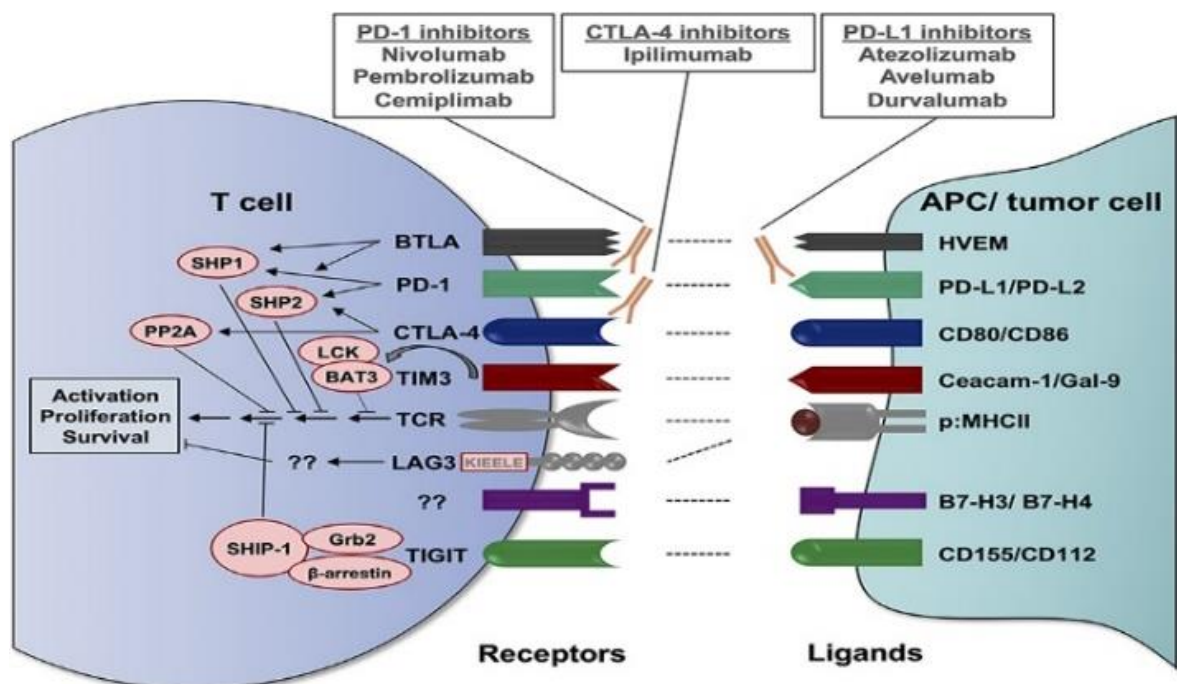


Figura 2. Checkpoints imunológicos. As moléculas de *immune checkpoints* são compostas pelos ligantes na célula tumoral/APC e os respectivos receptores na célula T. Os ligantes expressos na célula tumoral incluem PDL1, CD80/CD86, MHC II, CD155 e galectina-9 (GAL9), enquanto seus receptores correspondentes nas células T CD8⁺ incluem proteína de morte celular programada 1 (PD1), antígeno associado a linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA4), gene ativador de linfócitos 3 (LAG3), imunorreceptor de células T com imunoglobulina (Ig) e domínios ITIM (TIGIT), imunoglobulina de células T e mucina-3 (TIM3).

Fonte: Adaptada de Köhler N, Ruess DA Kesselring R, Zeiser R, 2021

A regulação epigenética da expressão gênica é um processo dinâmico e reversível que estabelece e mantém os fenótipos celulares normais, mas contribui para a doença quando desregulado. O estado epigenético de uma célula evolui de maneira ordenada durante a diferenciação celular e as mudanças epigenéticas medeiam a plasticidade celular que permite a reprogramação³⁷. As alterações epigenéticas envolvem modificações covalentes hierárquicas do DNA e das proteínas histonas que empacotam o DNA. As principais modificações das histonas incluem acetilação da lisina, mono, di ou trimetilação da lisina e metilação da

arginina. De modo geral, essas modificações estabelecem estados de cromatina que determinam o grau em que loci genômicos específicos são transcricionalmente ativos³⁸.

No presente trabalho, demos foco ao papel de um grupo de proteínas associadas a modificações na cromatina denominadas Polycomb (PcG), as quais controlam a manutenção de programas de transcrição durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta. Atualmente, as proteínas PcG são divididas em dos dois complexos multiproteicos distintos: complexo repressivo Polycomb 1 (PRC1) e PRC2³⁹. Os complexos têm atividades catalíticas distintas, mas ambos geralmente estão associados ao silenciamento da transcrição. Embora na última década tenha havido um progresso na compreensão dos mecanismos de PcG que atuam na manutenção da identidade celular, muitos estudos ainda se fazem necessários para elucidar como esse grupo de proteínas controla mecanismos associados à ativação, proliferação e diferenciação celular, principalmente em linfócitos T⁴⁰.

1.4 Complexo Repressor Polycomb 2 (PRC2) e seus desdobramentos na regulação da resposta imune

O complexo PRC2 está envolvido em diversos processos biológicos, desde a proliferação, diferenciação e manutenção da identidade celular, até a regulação da função de células imunes. Sua atividade é dependente de diversas subunidades, das quais EED e EZH1/2 se sobressaem, já que atuam como elementos centrais do complexo⁴¹. Por meio da sua atividade de histona metiltransferase, o PRC2 é responsável por reprimir a expressão gênica via trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3), uma marca repressora bastante abundante ao longo da cromatina. O silenciamento gênico mediado por PRC2 é, portanto, dependente da regulação da estrutura da cromatina, sobretudo através de modificações pós-traducionais das histonas⁴².

Sobre os efeitos no compartimento imune, evidências demonstram que a deficiência de PRC2 dificulta a expansão clonal e prejudica a diferenciação de células T CD8⁺ em subpopulações de células efetoras terminalmente diferenciadas, sugerindo que PRC2 promove a diferenciação terminal de células T CD8⁺ e está diretamente envolvido na perda da multipotência linfocitária⁴³. Sobre a função e diferenciação de células T CD4⁺, o componente EZH2 do PRC2 pode atuar na indução e manutenção de células T reguladoras³⁹, sugerindo que a repressão da cromatina mediada por PRC2 privilegia programas anti-inflamatórios ou terminais que limitam os mecanismos efetores das células T.

Atualmente, diversos estudos se concentram na atuação do complexo repressivo PRC2 em células tumorais, uma vez que proteínas Polycomb aberrantemente expressas desempenham um papel crucial no câncer, alterando um amplo espectro de processos biológicos, como o equilíbrio proliferação-diferenciação, metabolismo e resposta imune, todos essenciais na progressão do tumor⁴¹. Embora a participação de PRC2 no controle da biologia de células tumorais seja bem conhecido, os efeitos de tal complexo sobre a resposta imune antitumoral ainda permanecem pouco elucidados.

1.5 O papel da histona metiltransferase EZH2 em células T CD8⁺ humanas

Diversos estudos focaram extensivamente nas funções de EZH2 em células cancerígenas, mostrando que a expressão anormal de EZH2 contribui para o aumento da agressividade e proliferação em vários tipos de tumores⁴². Entretanto, os estudos sobre o papel de EZH2 no desenvolvimento e função do sistema imunológico ainda permanecem com numerosas questões não respondidas.

De maneira semelhante à sua atuação em outras células imunes, EZH2 regula a ativação, proliferação e diferenciação de células T CD8⁺ via modificação de metilação de histonas. Em relação à ativação, estudos em modelos murinos mostram que linfócitos T CD8⁺ naives que apresentam deficiência de EZH2 desde sua fase de desenvolvimento no timo exibem uma capacidade proliferativa reduzida e apoptose aumentada em resposta à estimulação ao antígeno. Além disso, EZH2 também regula a diferenciação de células T CD8⁺ virgens. Células T CD8⁺ naives deficientes em EZH2 mostraram formação prejudicada de células de memória após a estimulação do TCR⁴³.

Como já mencionado, as células T CD8⁺ também apresentam funções antitumorais por meio da secreção de citocinas, como TNF- α e IFN- γ . Evidências crescentes indicaram que EZH2 pode regular a produção de citocinas por células T CD8⁺. Células T CD8⁺ naives deficientes em EZH2 mostraram produção aumentada de IFN- γ , IL-2 e GZMB após estimulação *in vitro*. Portanto, EZH2 parece inibir a produção de citocinas, especialmente as pró-inflamatórias⁴⁴. Contudo, outros estudos observaram resultados opostos, relatando que o nocaute condicional de EZH2 em células T CD8⁺ efetoras prejudicou a produção de TNF- α , porém com frequências equivalentes de células IFN- γ ⁺ e IL-2⁺ em comparação com as células T normais em um modelo de infecção viral⁴⁵. Tendo em vista esses resultados contraditórios, o papel de EZH2 na funcionalidade das células T CD8⁺ ainda necessita ser mais explorado.

1.6 O uso de inibidores químicos como agentes capazes de modular a ação de proteínas metiltransferases

Um dos mecanismos principais de controle da expressão gênica é a metilação dos resíduos de lisina e arginina nas proteínas histonas, de modo que a regulação dos estados da cromatina e controle da transcrição de genes irá regular a diferenciação e função celular. A mono, di ou trimetilação das cadeias laterais de lisina em histonas podem estar relacionadas à ativação ou repressão da transcrição, dependendo do resíduo específico de lisina alterado e do grau de metilação⁴⁶.

Com o surgimento de novas tecnologias nas últimas décadas e avanços nos estudos na área de biologia química, o desenvolvimento de novas drogas cresceu consideravelmente. Nesse contexto, desenvolveram-se pequenas moléculas (sondas químicas) capazes de elucidar os papéis das proteínas-alvo em células e tecidos saudáveis e doentes. A elaboração dessas sondas químicas foi pautada em princípios bem estabelecidos na indústria farmacêutica para testar a ligação entre uma proteína específica e seu alvo. Uma sonda química eficiente deve compreender os seguintes requisitos: ser razoavelmente potente nas células, seletiva para a proteína-alvo escolhida e livre de ligações e funções fora do alvo⁴⁷.

Foi mostrado recentemente que inibidores epigenéticos modulam o fenótipo de linfócitos T CD4⁺ murinos e humanos, alguns favorecendo a resposta regulatória, com o aumento da capacidade funcional de células T reguladoras, e outros favorecendo a resposta pró-inflamatória, com indução aumentada de mediadores pró-inflamatórios, como IFN- γ e TNF- α ^{37,38}. Apesar disso, estudos que demonstram o papel de tais sondas em células T CD8⁺ ainda permanecem escassos. Diante desse cenário, utilizamos em nosso estudo inibidores químicos do PRC2 via modulação das subunidades EED (A395) e EZH2 (GSK343) capazes de regular a H3K27me3 em células T CD8⁺.

1.7 Terapia com células CAR-T

A terapia com células T com receptor de antígeno quimérico (CAR) vem revolucionando o tratamento contra o câncer. Apesar desse tratamento ter gerado respostas clínicas consideráveis em certos tipos de leucemia ou linfoma de células B, muitos desafios ainda limitam a eficácia terapêutica das células CAR-T em tumores sólidos e malignidades hematológicas⁴⁸.

Os CARs são receptores sintéticos delineados para redirecionar linfócitos, mais frequentemente células T, para reconhecer e eliminar células que expressam um antígeno alvo específico. A ligação do CAR aos antígenos-alvo expressos na superfície celular é independente da interação com a molécula de MHC, resultando em vigorosa ativação das células T e potentes respostas antitumorais⁴⁹.

A estrutura do CAR é composta por um domínio extracelular de reconhecimento ao antígeno, uma dobradiça, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular. O domínio extracelular é derivado de um anticorpo monoclonal e consiste em um fragmento variável de cadeia única (scFv), o qual é responsável por reconhecer especificamente antígenos tumorais. Geralmente, os antígenos tumorais são classificados em antígenos associados a tumores (TAAs) e antígenos específicos de tumores (TSAs), e em sua maior parte são TAAs. Uma vez que os TAAs são reconhecidos pelo scFv, as células CAR-T são ativadas e transmitem sinais de ativação para o domínio intracelular⁴⁹.

O construto CAR de primeira geração contém um domínio scFv de reconhecimento ao antígeno e um domínio de ativação CD3 ζ intracelular. Devido à ausência de sinais coestimulatórios, eles exibem capacidade proliferativa e efeitos antitumorais limitados. A construção CAR de segunda geração adiciona um domínio co-estimulatório, como o CD28, o 4-1BB, o OX40, ou o ICOS, com o objetivo de aumentar a capacidade proliferativa das células e liberar citocinas importantes para a resposta antitumoral. A construção CAR de terceira geração engloba duas moléculas coestimulatórias distintas, como por exemplo CD28 e 4-1BB. A construção CAR de quarta geração, também denominada TRUCK, é adicionalmente modificada para secretar citocinas ou expressar moléculas suicidas, como IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 e Caspase-9 (**Fig. 3**)⁵⁰.

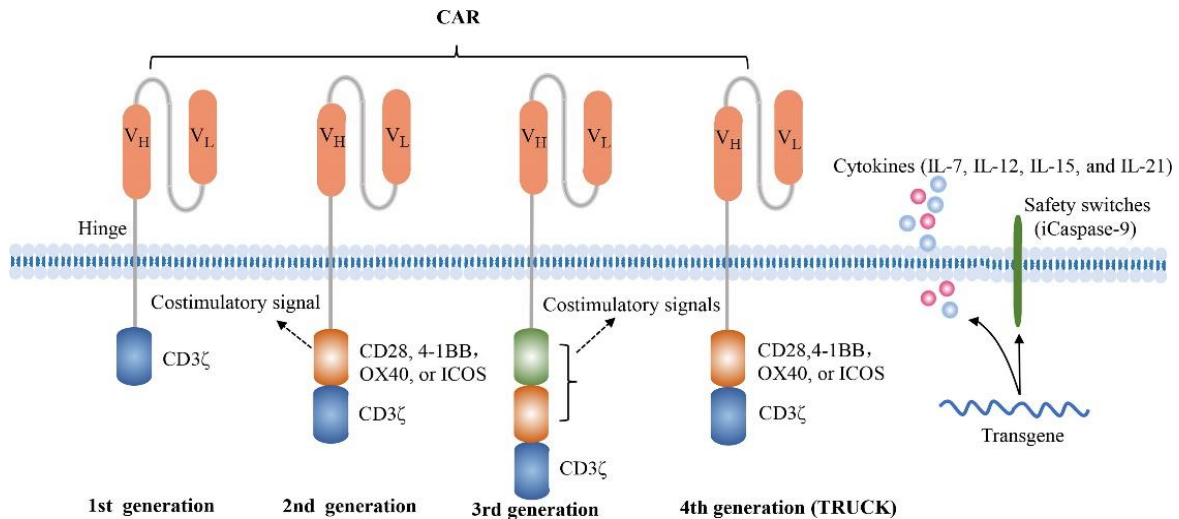


Figura 3. Gerações das células CAR-T. A primeira geração de CAR consiste apenas em um componente de sinal intracelular CD3 ζ . O CAR de segunda e terceira geração adiciona uma ou mais de uma molécula coestimuladora, respectivamente, como CD28 e 4-1BB. Na quarta geração de CAR, o reconhecimento de antígenos-alvo leva à indução da produção de citocinas.

Fonte: Adaptado de Rallis KS, Hillyar CRT, Sideris M, Davies JK, 2021.

1.8 O uso de células CAR T para tratamento de leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B)

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é causada pela transformação maligna de células progenitoras linfóides na medula óssea, sangue e locais extramedulares, podendo acometer linhagens linfocitárias do tipo B e T. A maioria dos casos de LLA é classificada como precursora do tipo de células B (85% dos casos), e acomete predominantemente crianças⁵⁴.

A quimioterapia de indução e consolidação sozinha ou em combinação com diferentes abordagens terapêuticas continua sendo o principal tratamento para LLA-B. Apesar da remissão completa ou parcial da doença ser alcançada em muitos casos, o risco de recaída ou leucemia refratária ainda permanece alto. Diante disso, alternativas de terapia mais eficazes e seguras ainda se fazem necessárias⁵⁴.

Na última década, células CAR-T têm sido amplamente estudadas e representam uma nova estratégia para o tratamento da LLA-B. De acordo com os ensaios clínicos de Fase I/II, os resultados dessa abordagem parecem muito promissores e podem ser usados como um tratamento eficaz e seguro para o tratamento da LLA⁵⁵.

Embora a taxa de resposta à terapia com células CAR T em malignidades de células B para doença recidivante ou refratária seja notavelmente eficaz em alguns ensaios clínicos, ainda muitos pacientes não respondem ou recaem após o tratamento inicial. Diversos desafios estão

envolvidos na terapia com células CAR-T, algumas das suas limitações estão associadas a toxicidades, eficácia limitada contra tumores sólidos, inibição e resistência, escape de antígeno, persistência limitada, infiltração tumoral pobre e o microambiente tumoral imunossupressor. Portanto, estratégias para reverter essas limitações se fazem necessárias⁵⁶.

Diante desse cenário, nosso trabalho buscou avaliar se os inibidores farmacológicos de diferentes subunidades do complexo PRC2 são capazes de potencializar a capacidade efetora de células T CD8⁺ humanas, além de modular o epigenoma de linfócitos CAR-T anti-CD19 gerados a partir do sistema transposon-transposase, com o objetivo de melhorar a resposta citotóxica dessas células e diminuir seu tempo de produção e o alto custo.

2. JUSTIFICATIVA

É sabido que modificações epigenéticas estão envolvidas no processo de reprogramação de células do sistema imune que atuam no microambiente tumoral. Tais modificações ocorrem através da indução de respostas inflamatórias induzidas cronicamente pelo grande potencial mutacional do tumor. Dessa forma, considerando que as alterações no epigenoma de células imunes são processos plásticos e reversíveis³⁸, hipotizamos que a regulação epigenética pode servir como um alvo promissor para potencializar e desencadear a ativação de genes que induzem respostas pró-inflamatórias e inibem genes anti-inflamatórios de modo transitório. Tal modelo nos permite estabelecer estratégias para otimizar a resposta de células T e favorecer a eliminação de células tumorais de modo mais eficiente. Neste trabalho, avaliamos como a modulação epigenética do complexo PRC2 atua como modulador da resposta funcional de linfócitos T CD8⁺ humanos. Também investigamos se a manipulação farmacológica do epigenoma de linfócitos T CD8⁺ contribui para a potencialização da resposta citotóxica dessas células. Com o objetivo de analisar se a modulação da resposta efetora de células T causada pela inibição do complexo PRC2 facilita o controle tumoral, geramos células CAR-T anti-CD19 utilizando uma metodologia não-viral de inserção gênica como o sistema transposon-transposase SleepingBeauty (SB), que representa uma alternativa mais acessível comparada com a abordagem tradicional e possibilita a entrega do transgene por eletroporação, agilizando o processo de geração das células CAR-T. Desse modo, a modulação epigenética e o aperfeiçoamento de imunoterapias celulares podem apresentar grande potencial terapêutico, permitindo aprimorar o sistema imune como ferramenta no combate ao câncer.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Modular o epigenoma de células T CD8⁺ humanas via inibidores do complexo PRC2 *in vitro* como estratégia para potencializar a sua resposta citotóxica antitumoral.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Objetivo específico 1. Avaliar se inibidores farmacológicos de PRC2 são capazes de modular a expressão de marcadores associados à atividade efetora e citotóxica de células T CD8⁺ humanas *in vitro*;

3.2.2 Objetivo específico 2. Avaliar se inibidores farmacológicos de PRC2 são capazes de modular a proliferação e expressão de *immune checkpoints* de células T CD8⁺ humanas *in vitro*;

3.2.3 Objetivo específico 3. Avaliar o papel dos inibidores epigenéticos frente aos fenótipos de exaustão e de memória de linfócitos CAR-T anti-CD19 gerados com os sistemas transposon-transposase Sleeping Beauty;

3.2.4 Objetivo específico 4. Avaliar se os inibidores farmacológicos do PRC2 são capazes de modular a resposta citolítica antitumoral de células CAR-T anti-CD19 *in vitro*.

4. DESENHO EXPERIMENTAL E METODOLOGIAS

4.1 Seleção e recrutamento de doadores

Este projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antônio Prudente (Registro: 2710/19). Para a padronização e experimentos, foram recrutados oito indivíduos de ambos os sexos, com faixa etária entre 20-30 anos, saudáveis e sem histórico de infecções ou outras doenças inflamatórias recentes ou quaisquer outras complicações que possam interferir em nossa análise. Após o recrutamento e consentimento no estudo, os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e foram anonimizados através de um código numérico (ID). Foram coletados aproximadamente 40 mL de sangue de cada doador em tubo contendo EDTA, e as amostras foram imediatamente processadas para a realização dos experimentos propostos neste projeto. Após a coleta, o sangue total foi imediatamente processado para a obtenção das células T CD8⁺ naïves, como descrito a seguir.

4.2 Obtenção das Células Mononucleares do sangue periférico e células T CD8⁺ naïves

O isolamento das células mononucleares foi feito através de separação por densidade em gradiente de centrifugação em Ficoll-Paque (Cytiva). Em seguida, as células T CD8⁺ naïve

foram isoladas utilizando o Kit de seleção negativa EasySep™ Human Naïve CD8 T Cell Isolation Kit II (StemCell Technologies®), seguindo as especificações do fabricante. A fim de determinar a viabilidade celular após o isolamento, uma alíquota da suspensão das células foi retirada e corada com solução de azul de trypan (0.04%) e contada em câmara de Neubauer. Tanto as PBMCs quanto as células T CD8⁺ naïve apresentaram viabilidade celular acima de 95%. Outra alíquota foi removida para a análise da pureza celular após o isolamento das células T CD8 naïves. Obtivemos pureza acima de 96%.

4.3 Cultura de células T CD8⁺ naïves e tratamento com inibidores epigenéticos

Após o isolamento, foram plaqueadas cento e cinquenta mil células T CD8⁺ naïves por poço, as quais foram cultivadas em meio RPMI (ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina + estreptomicina (Sigma-Aldrich) em placas de 96 poços de fundo em U, em um volume final de 250 µL.

Em seguida, foi adicionado o estímulo celular contendo Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies) na proporção de 2:1 (célula:bead), IL-2 [10ng/mL] (BioLegend) e IFN-γ [20ng/mL] (BioLegend) recombinantes. Na sequência, foram adicionados os inibidores químicos ou os seus respectivos controles negativos, na mesma concentração. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C em uma cinética temporal de 3, 4 e 5 dias.

As condições testadas para cada doador saudável foram as seguintes: (i) células T CD8⁺ naïves não estimuladas (tratadas apenas com IL-2 recombinante); (ii) células T CD8⁺ estimuladas com anti-CD3 + anti-CD28 na presença do veículo (DMSO); (iii) células T CD8⁺ estimuladas com anti-CD3 + anti-CD28 e mantidas na presença das sondas químicas GSK343 [3µM] ou A395 [1µM]; e (iv) células T CD8⁺ estimuladas com anti-CD3 + anti-CD28 e mantidas na presença da sonda controle A395N [1µM]. As condições de tratamento analisadas encontram-se esquematizadas na **Figura 4**. As concentrações indicadas foram utilizadas na faixa do IC₅₀-IC₉₀ fornecidas pelo fabricante (SGC – Structural Genomics Consortium).

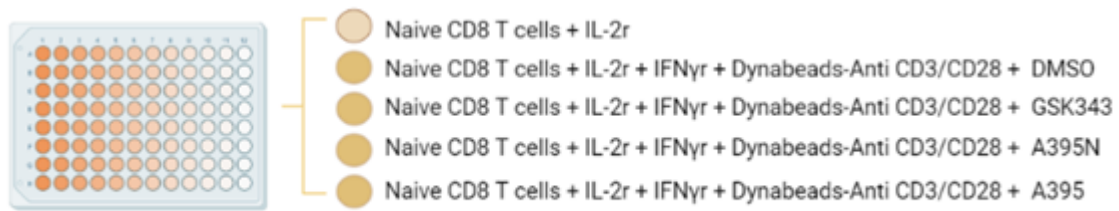


Figura 4 Esquema de plaqueamento e estimulação das células TCD8 Naíves purificadas. Células T CD8 naïves foram isoladas e plaqueadas com seus respectivos estímulos de sobrevivência, ativação e tratamento epigenético mostrados acima (à direita).

4.4 Análise de funcionalidade das células T CD8⁺ tratadas com os inibidores epigenéticos

Após o período de incubação na presença dos seus respectivos estímulos, analisamos o perfil das células T CD8⁺ humanas através de citometria de fluxo. Para realizar a análise da frequência de mediadores inflamatórios, adicionamos brefeldina (inibidor do transporte de proteínas) (BD GolgiStopTM) às culturas de células T CD8⁺ durante as últimas 4 horas de incubação anteriores à coleta para a marcação e análise. Após este intervalo, retiramos as beads anti-CD3/CD28 para não haver nenhuma interferência na marcação e na leitura das amostras, as células foram lavadas com PBS e em seguida demos início à marcação de viabilidade celular utilizando o marcador *Fixable Viability Stain 575V* (BD Horizon), o qual foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem das células com PBS, seguimos para a marcação de antígenos de superfície utilizando o seguinte painel de anticorpos conjugados a fluoróforos: anti-CD8 (BB515); anti-CD69 (APC-R700) e anti-CD25 (PeCy-7), os quais foram incubados por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando tampão BD Cytotfix/Cytoperm e BD Perm/Wash de acordo com as instruções do fabricante (BD Pharmingen). Para a marcação de proteínas intracelulares, utilizamos o seguinte painel: anti-Granzima B (PE); anti-TNF- α (BV421) e anti-IFN- γ (APC). A marcação intracelular foi realizada por 30 minutos a 4°C. A leitura foi realizada em um citômetro de fluxo modelo FACSymphony A5 (BD Biosciences), e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo v10 (BD Biosciences). Foram utilizados controles FMO para as respectivas análises. Os anticorpos utilizados, bem como os clones e marcas correspondentes, encontram-se discriminados na **Tabela 1**.

Tabela 1 Lista de anticorpos utilizados. Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos com células T CD8 naïves e células CAR-T.

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marca	Catálogo
Anti-humano CD8	RPA-T8	PE	BD	564526
Anti-humano CD4	BC96	BV605	Biolegend	302612
Anti-humano CD69	FN50	APC-R700	BD	565154
Anti-humano GzmB	GB11	BV510	BD	561142
Anti-humano LAG3	T47-530	APC-R700	BD	565774
Anti-humano PD1	EH12.1	BV605	BD	563245
Anti-humano CD39	A1	PE-Cy7	Biolegend	328212
Anti-humano CD69	FN50	APC-R700	BD	565154
Anti-humano IFNg	B27	APC	BD	506510
Anti-humano TNFa	Mab11	BV421	BD	562783
Anti-humano GzmB	GB11	PE	BD	561142
Anti-humano PD1	EH12.1	BV605	BD	563245
Anti-humano CD39	A1	PE-Cy7	Biolegend	328212
Anti-humano CD73	AD2	BV510	BD	563198
Anti-humano LAG3	T47-530	APC-R700	BD	565774

4.5 Ensaio de proliferação e análise de receptores inibitórios em T CD8⁺ humanas tratadas com os inibidores epigenéticos

A fim de avaliar a capacidade proliferativa das células T CD8⁺ estimuladas na presença dos inibidores epigenéticos, as células foram coradas com CellTrace Violet (CTV) (ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas alterações descritas a seguir. Cento e cinquenta mil células foram lavadas com PBS, ressuspensas em solução CTV em PBS (2.5 µM CTV - 1 mL volume final) e incubadas durante 20 min a 37 °C. Após incubação, um volume de 4 mL de meio RPMI contendo 10% de SFB foi então adicionado, e as células foram incubadas por 5 minutos a 37 °C para permitir que o CTV livre se ligue às proteínas séricas e melhore a eliminação do CTV não incorporado após posterior lavagem. As células marcadas com CTV foram, então, plaqueadas e, depois de 7 dias de cultura, coletadas e lavadas com tampão de lavagem FACS (PBS contendo 0,2% BSA). A proliferação de células T CD8⁺ foi avaliada conforme análise da diluição de CTV por citometria de fluxo. A diluição de CTV se encontra detalhada na **Figura 5**. Concomitantemente, as mesmas células foram utilizadas para marcação extracelular, utilizando o seguinte painel: anti-CD8 (BB515); anti-PD1 (BV605); anti-LAG3 (APC-R700); anti-CD39 (Pe-Cy7); e anti-CD73 (BV510). A fim de discriminar as populações positivas, foram utilizados controles FMO. Os anticorpos utilizados, bem como os clones e marcas correspondentes, encontram-se descritos na **Tabela 1**.

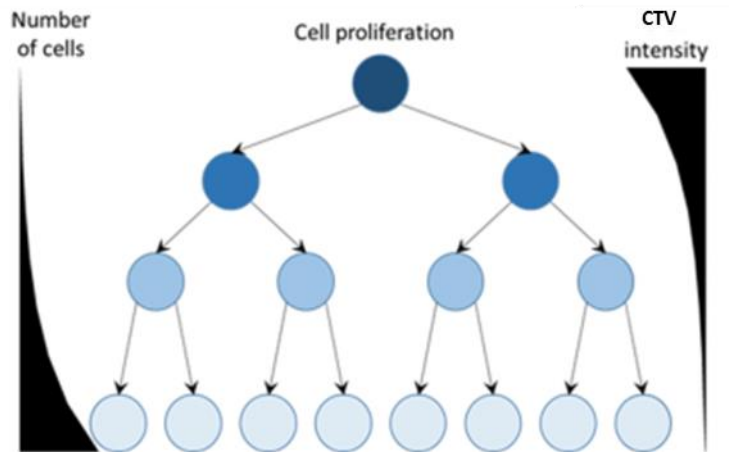


Figura 5 Esquema de proliferação celular a partir da diluição de CTV. Após a proliferação celular, o CTV difunde-se passivamente nas células e liga-se covalentemente a resíduos de aminas livres. À medida que as células se dividem, cada célula-filha contém metade do conteúdo CTV presente na célula-mãe.

Fonte: Adaptado de Pereira, T.F., Levin, G., DeOcesano-Pereira, C. et al. 2020.

4.6 Quantificação de citocinas por CBA

Para realizarmos a dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas de células T CD8⁺ estimuladas na presença das sondas químicas ou dos seus respectivos controles, foi realizado o ensaio Cytometric Beads Array (CBA, BD™). Com esse objetivo, congelamos (-80°C) os sobrenadantes das culturas celulares provenientes da cinética temporal de 3, 4 e 5 dias mencionadas anteriormente. Para tal, utilizamos o kit Human Th1/Th2 CytokineCytometricBeadArray (CBA) (BD™), que detecta as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α . Assim sendo, os sobrenadantes de cultura foram descongelados e os padrões de citocinas do kit foram incubados com as seis populações de microesferas de captura, cada uma conjugada a um anticorpo de captura específico para cada citocina e com anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após incubação de 3 horas, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 5 minutos a 400g. O sobrenadante foi descartado, e as amostras foram ressuspensas em 300uL da solução de lavagem para aquisição por citometria de fluxo, utilizando-se o FACSymphony A5 (BD biosciences). Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa de citocinas, uma curva padrão foi construída utilizando os dados dos padrões de citocinas em concentrações conhecidas (10 pg/mL – 2500 pg/mL). Os resultados foram gerados em forma de gráficos e tabelas através do software FCAP Array.

4.7 Construção e cultura de células CAR-T

A metodologia empregada nessa segunda etapa do projeto foi padronizada e realizada em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Martín Hernán Bonamino, do Instituto Nacional do Câncer (INCA).

4.7.1. Plasmídeos e clonagens

A molécula de CAR original 19BBz (IMAI et al., 2004) foi cedida pelo Dr. Dario Campana (St. Jude Children's Research Hospital, EUA). Composto por um domínio scFv derivado do anticorpo monoclonal FMC63 anti-CD19, este CAR também apresenta uma porção intracelular de coestímulo derivada da molécula 4-1BB e a cadeia CD3z, além de um domínio transmembrana. A fim de rastrear o CAR por citometria de fluxo, foi adicionado ao CAR original um tag de c-Myc, permitindo sua marcação através de um anticorpo anti-myc (APC).

Sistema Sleeping Beauty

O CAR 19BBz foi clonado no plasmídeo pT3-GFP, cedido pelo Dr. Richard Morgan (NIH-National Institutes of Health, EUA). O sistema Sleeping Beauty (SB) é composto pela enzima transposase, que reconhece as sequências terminais invertidas do transposon pT3-GFP. As enzimas de restrição utilizadas para a clonagem foram AgeI e NotI. O plasmídeo pCMV-SB100X que codifica a transposase foi cedido pelo Dr. Sang Won Han (Unifesp, São Paulo).

4.7.2. Cultura de células CAR-T

Linhagens celulares

A linhagem de LLA-B humana Nalm-6 foi cultivada em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina (Gibco) e 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich) em estufa a 37°C e atmosfera 5% de CO₂. A linhagem Nalm-6 foi modificada geneticamente para expressar a enzima luciferase (luc) associada à proteína GFP (do inglês *green fluorescent protein*) por vetores lentivirais e selecionada por cell sorting.

Células primárias

Para o cultivo de células primárias, foi coletado sangue de doadores saudáveis após estes assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Filtros de redução de leucócitos (RS-Haemonetics) da bolsa de sangue de doadores saudáveis também foram obtidos para os experimentos. Posteriormente, obtivemos células mononucleares do sangue periférico

pela injeção de 40-80 mL de tampão salina no filtro, isolando-as por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque-1077 (Sigma-Aldrich). Após a separação de PBMCs, as células T foram isoladas por separação magnética através de microesferas anti-CD3 (MiltenyiBiotec), através de seleção positiva.

4.7.3 Eletroporação e expansão dos linfócitos

Para a geração de células CAR-T, aproximadamente 30×10^6 células foram ressuspensas em tampão 1SM com os plasmídeos codificantes do transposon e da transposase. Para os experimentos utilizando o sistema SB, o protocolo que já está bem estabelecido pelo grupo do Prof. Dr. Martín Bonamino para o CAR pT3-19BBz, utiliza 20 μ g de transposon e 1 μ g de transposase SB100X.

As células foram ressuspensas no tampão com os plasmídeos eletroporados em um equipamento Nucleofector Iib utilizando o programa U-14. Posteriormente, as células foram cultivadas em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio RPMI 1640 completo sem antibiótico e suplementado com 20% SFB, 50 unidades/mL de IL-2 e IFN- γ [10ng/mL]. Nesta etapa, foram acrescentadas aos poços as sondas químicas A-395 e GSK343 ou os seus respectivos controles A395N e DMSO. As células foram ativadas com 25 μ L/poço de beads anti-CD3/CD28 (T CellTransAct, MiltenyiBiotec) 2 horas após a eletroporação e posteriormente cultivadas por 4, 5 e 7 dias (**Fig. 6**).

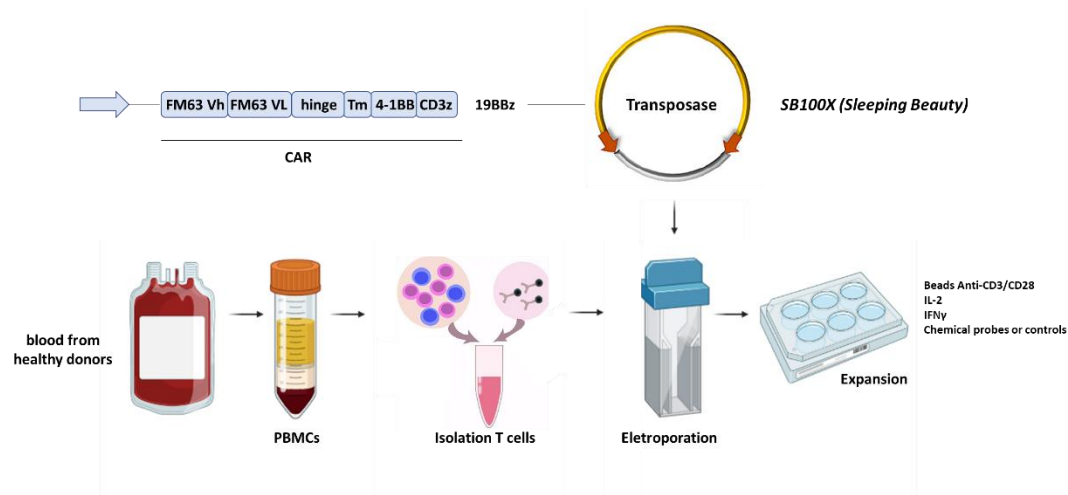


Figura 6. Esquema da geração de células CAR-T. PBMCs isolados de filtros de leucócitos das bolsas de sangue de doadores foram isolados e eletroporados com as construções contendo o CAR, além da transposase. As células foram cultivadas em meio RPMI completo na presença das beads anti-CD3/CD28, IL-2, IFN γ , sondas químicas e seus respectivos controles por até 12 dias. Imagem criada na plataforma BioRender. FMC63 Vh/VL – Cadeias leve e pesada da porção variável do anticorpo anti-CD19 FMC63; Tm - Domínio transmembrana.

4.7.4 Imunofenotipagem e análise da expressão de marcadores em células CAR-T por citometria de fluxo

Para caracterização do fenótipo dos linfócitos e detecção da expressão do CAR, as células foram avaliadas por citometria de fluxo, seguindo o mesmo protocolo descrito na sessão anterior. Para isso, uma alíquota da cultura foi coletada, e as células foram lavadas com PBS para retirada do meio de cultura. Após a lavagem, o *pellet* de células foi ressuscitado em 20 μ L de PBS, incubado com o anticorpo anti-myc (APC) por 20 minutos no escuro e em temperatura ambiente, e lavado novamente com PBS. Quando a aquisição no citômetro não pôde ser realizada no mesmo dia, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% após a marcação. Além disso, realizamos marcações para definir populações positivas para os marcadores de ativação, citotoxicidade, memória e exaustão utilizando controles negativos e FMO (**Fig. 7**). Os anticorpos monoclonais utilizados estão detalhados na **tabela 1** citada anteriormente.

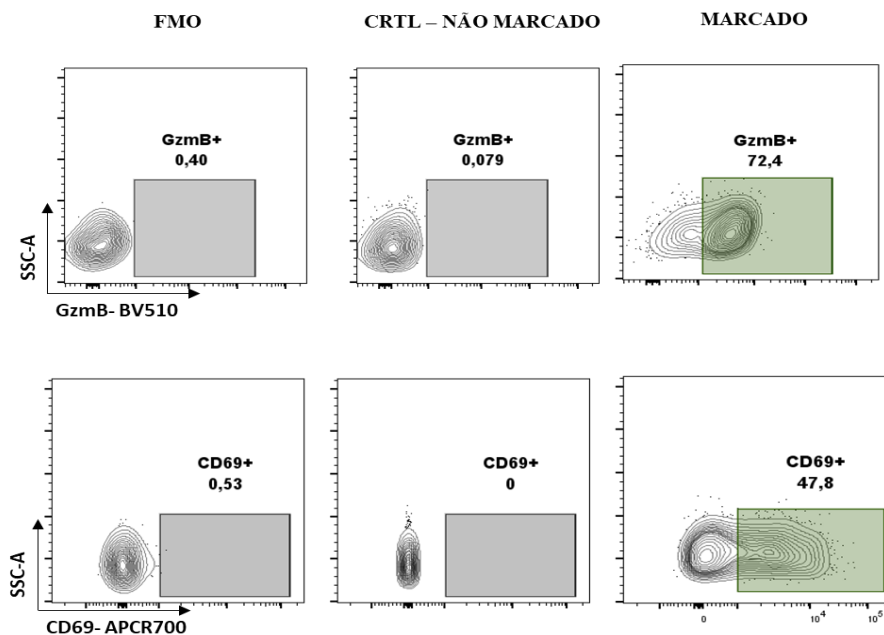


Figura 7 Controles de Marcação celular por citometria de fluxo. Controle FMO; controle com células T sem nenhum anticorpo e células T marcadas com anticorpos Anti-GzmB e Anti-CD69 como representativos.

4.8 Ensaio de Lise

Para o ensaio de lise, no qual é avaliado o potencial citotóxico das células CAR-T, a célula alvo Nalm-6 foi modificada geneticamente para expressar a enzima luciferase (luc) associada à proteína GFP por vetores lentivirais e selecionada por cell sorting. Posteriormente, as células CAR-T anti-CD19 tratadas com o inibidor da subunidade EED A395 ou seu controle A395N foram co-cultivadas com as células-alvo GFP⁺ na proporção de 0.25:1 (efetor:alvo) em

placa de 96 poços. Após 48 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, avaliamos a frequência de células GFP⁺ por citometria para verificar a taxa de células viáveis e mortas.

4.9 Expressão diferencial de genes expressos em células T CD8⁺ efectoras de camundongos WT vs EZH2^{-/-}

A partir do arquivo de counts já normalizados do conjunto de dados de RNA-seq disponíveis no Gene Expression Omnibus (GEO), sob a identificação GES106426, analisamos a expressão gênica de células T CD8⁺ Ezh2^{-/-} e de células T CD8⁺ WT após estimulação com anti-CD3 fixo [5µg/mL] e anti-CD28 solúvel [1µg/mL] por 72h, em três replicatas biológicas. Posteriormente, aplicamos o teste estatístico T bicaudal para obtermos o valor de P e calculamos o *Fold Change* (Ezh2KO/WT, Log2). Com base nos dados que obtivemos, definimos os genes diferencialmente expressos a partir do valor de P ($P < 0.05$) e Log2FC. Para análise de enriquecimento de vias, os genes foram ranqueados com base no Log2FC previamente calculado. A análise foi realizada com o software GSEA (versão 4.0.3), com as assinaturas obtidas de Kakaradov, B., Arsenio, J., Widjaja, C. *et al.* 2017, e as notas de enriquecimento foram calculadas com base no teste estatístico Kolmogorov-Smirnov e posteriormente normalizadas (NES) para contabilizar o tamanho de cada conjunto de genes. Os valores de P correspondentes foram calculados usando 1000 permutações do conjunto de genes.

4.10 Análise Estatística

Para todos os ensaios de citometria de fluxo, os dados foram avaliados utilizando o software GraphPad Prism 8. Foi utilizado o teste t de Student pareado para comparações entre condições tratadas com o inibidor epigenético e seu respectivo controle. Para todos os experimentos, um valor de p abaixo de 5% ($p < 0.05$) foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Aumento da frequência de células T CD8⁺ efectoras expressando mediadores inflamatórios e citotóxicos mediante inibição da subunidade EED do complexo PRC2

Com o objetivo de analisarmos a expressão de marcadores associados a ativação de células T, estimulamos células T CD8⁺ naïves com beads anti-CD3/CD28, rIFN- γ e rIL-2, além do tratamento com os inibidores epigenéticos e seus respectivos controles por 3, 4 e 5 dias. Em seguida, analisamos a expressão de CD25 (IL-2R), molécula expressa transitoriamente na ativação de células T imaturas e efectoras essencial para expansão clonal de células T; e CD69, molécula bem conhecida como marcador precoce de ativação de células T associada à migração de células T ativadas.

A fim de determinarmos a frequência de células positivas a partir de populações de células T CD8⁺ únicas e viáveis, utilizamos a seguinte estratégia de *gates* representada na **Figura 8**.

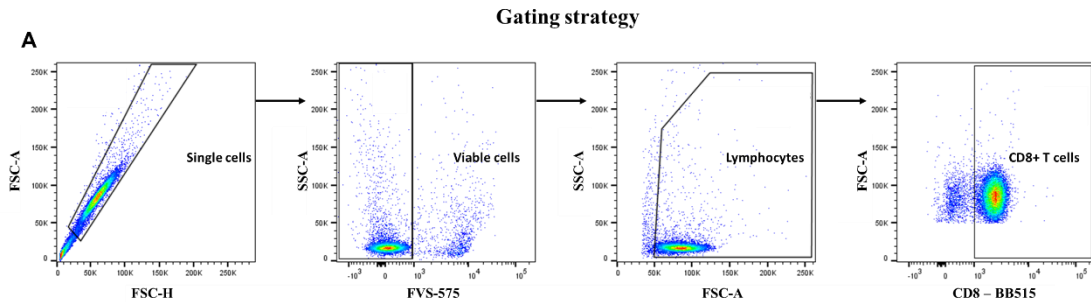


Figura 8 Estratégia de Gates para a identificação de células T CD8 humanas. Estratégia de gates utilizada para identificar células TCD8⁺ únicas e viáveis nos experimentos realizados com células T CD8⁺ isoladas de indivíduos saudáveis.

Em seguida, verificamos que a viabilidade das células se manteve em torno de 80% ao longo dos dias e independente do tratamento (**Fig. 9**).

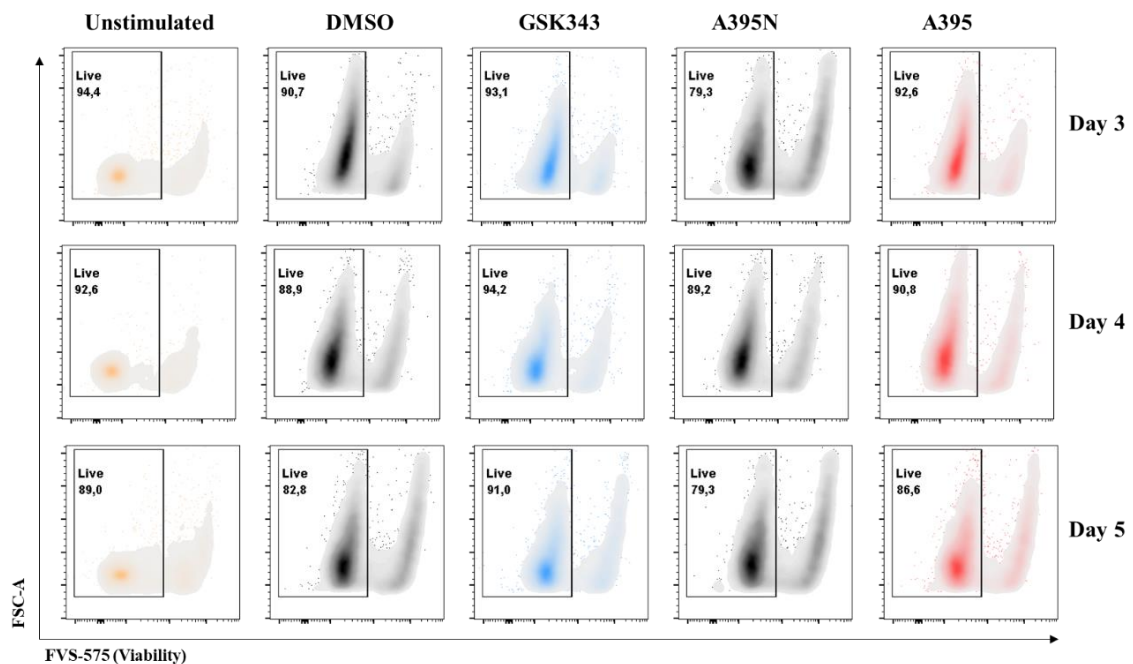


Figura 9 Viabilidade celular. Análise da viabilidade de células T CD8 Naive não estimuladas; células T CD8 tratadas com veículo DMSO estimuladas com Beads Anti-CD3/CD28, IFN γ e TNF α ; células T CD8 tratadas com o inibidor de EZH2 GSK343 estimuladas com Beads Anti-CD3/CD28, IFN γ e TNF α e células T CD8 tratadas com o inibidor de EED A395 ou seu controle negativo A395N estimuladas com Beads Anti-CD3/CD28, IFN γ e TNF α por citometria de fluxo.

Ao analisarmos inicialmente a importância do complexo PRC2 para a funcionalidade das células T CD8⁺ efetoras isoladas de doadores saudáveis, observamos que a inibição da subunidade EED pela sonda A-395 aumentou a frequência de células T CD8⁺ ativadas, visto pelo aumento da frequência de células T CD8⁺ co-expressando CD25 e CD69 (**Fig. 10A**). Como

esperado, as células T CD8+ estimuladas com beads anti-CD3/CD28, rIFN- γ e rIL-2 na presença da sonda controle A395N se tornaram efectoras, entretanto, numa cinética temporal, notamos que esse perfil não se sustentou ao longo dos dias. Em contraponto, as células T CD8+ que foram tratadas com o inibidor epigenético A-395 sustentaram um perfil de ativação com efeito prolongado visto em um número de 8 doadores saudáveis (**Fig. 10A-B**). Além de ter aumentado significativamente a frequência de células ativadas, o tratamento com A-395 aumentou e sustentou a frequência de células T CD8+GzmB+ quando comparadas com as células T CD8+ tratadas com a sonda controle A-395N em uma cinética temporal (**Fig. 10C-D**). Portanto, sugere-se que o complexo PRC2 pode reprimir a expressão de marcadores associados a ativação e mediadores citotóxicos por linfócitos T CD8+ humanos.

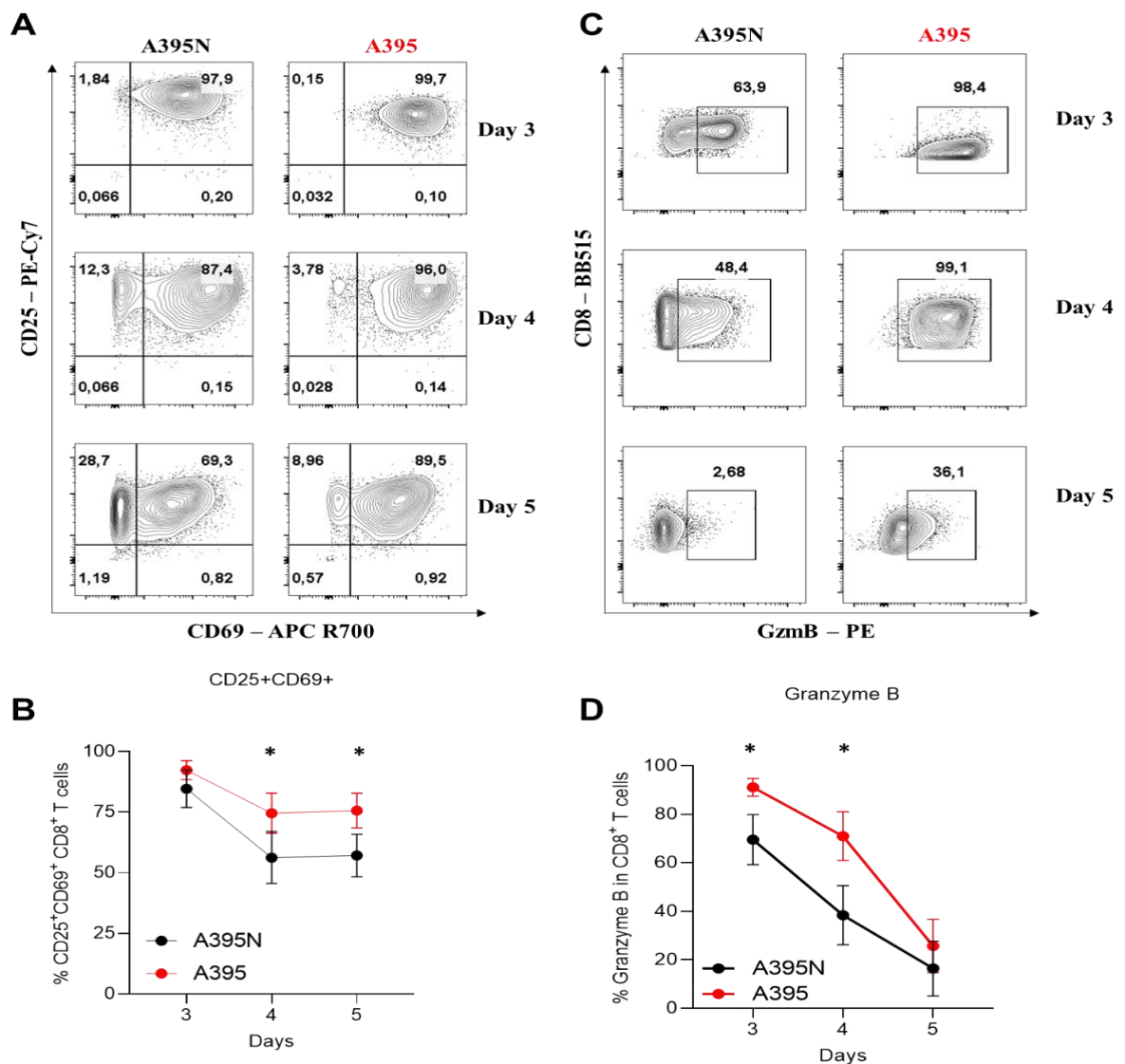


Figura 10 Análise da frequência de células T CD8+ co-expressando marcadores de ativação (CD25 e CD69) e o marcador citotóxico Granzima B por citometria de fluxo. (A-B) Co-expressão de CD25 e CD69 por células T CD8+ efectoras tratadas com o inibidor epigenético A-395 ou com o seu respectivo controle negativo A-395N após 3, 4 e 5 dias em cultura (C-D) Expressão de Granzima B por células T CD8+ efectoras tratadas com o inibidor epigenético A-395 e seu respectivo controle negativo A-395N após 3, 4 e 5 dias em cultura. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; NS, não significativo (P > 0,05). (N=8)

De modo a complementar nossos dados, avaliamos outro importante mecanismo efector dos linfócitos T CD8+ que é a produção de citocinas pró-inflamatórias. Observamos que a inibição do complexo PRC2 não alterou a frequência de células T CD8+ expressando IFN- γ ao longo do tempo (**Fig. 11A-B**). Ademais, também observamos o aumento significativo da secreção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas no dia 5 (**Fig. 11C**). Além disso, observamos um aumento significativo na frequência de T CD8+ expressando TNF- α após a inibição do PRC2 em relação ao grupo controle, sobretudo no terceiro dia pós ativação, mantendo uma sutil sustentação ao longo do tempo (**Fig. 11C-D**). Além disso, também não observamos alterações significativas da secreção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas ao longo dos dias 3, 4 e 5 (**Fig. 11F**).

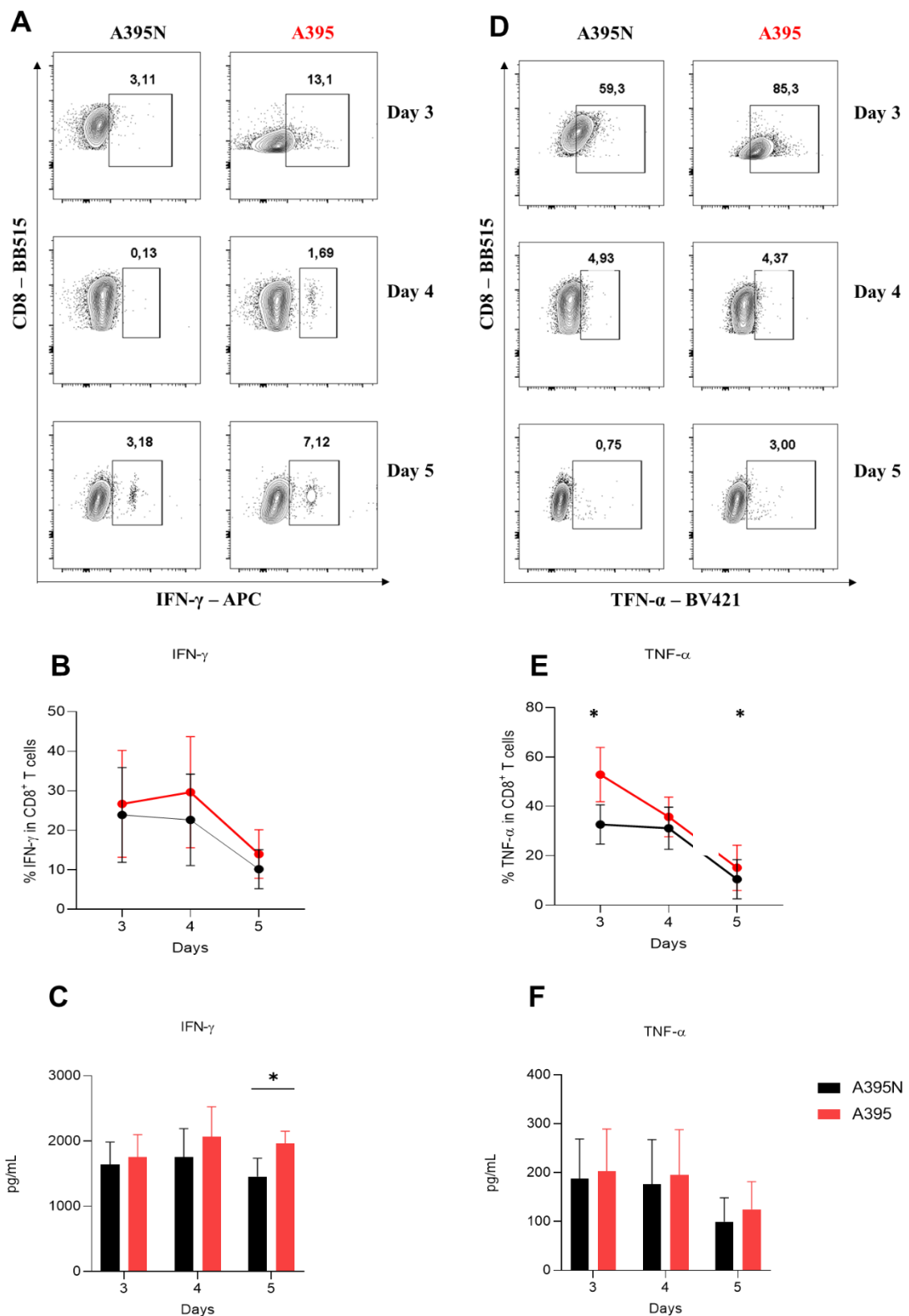


Figura 11 . Análise de da expressão e secreção de IFN- γ e TNF α por citometria de fluxo e CBA. (A-B) Expressão de IFN- γ por células T CD8⁺ efetoras tratadas com o inibidor epigenético A-395 ou com o seu respectivo controle negativo A-395N após 3, 4 e 5 dias em cultura. **(C)** Análise quantitativa da secreção de IFN- γ no sobrenadante por CBA após 3, 4 e 5 dias de cultura. **(D-E)** Expressão de TNF- α por células T CD8⁺ efetoras tratadas com o inibidor epigenético A-395 ou com o seu respectivo controle negativo A-395N após 3, 4 e 5 dias em cultura. **(F)** Análise quantitativa da secreção de TNF- α no sobrenadante por CBA após 3, 4 e 5 dias de cultura. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; NS, não significativo (P > 0,05). (N=8)

5.2 Aumento da frequência de células T CD8⁺ efetoras expressando mediadores inflamatórios e citotóxicos mediante inibição da subunidade EZH2 do complexo PRC2

Para testarmos se a inibição da subunidade EZH2 geraria resultados semelhantes ao observado com a inibição da subunidade EED do mesmo complexo, realizamos os mesmos ensaios para avaliar a resposta efetora de células T CD8⁺ após a inibição da subunidade EZH2 através do inibidor GSK343. De modo semelhante ao observado com a sonda A-395, a inibição do PRC2 com a sonda GSK343 aumentou e sustentou ao longo dos dias a frequência de células T CD8⁺ efetoras co-expressando CD25 e CD69 quando comparadas com o seu controle DMSO (**Fig. 12A-B**). Além disso, a inibição da subunidade EZH2 aumentou a frequência de células T CD8⁺ GZMB⁺ no quinto dia de cultura em relação ao controle negativo (DMSO) (**Fig. 12C-D**).

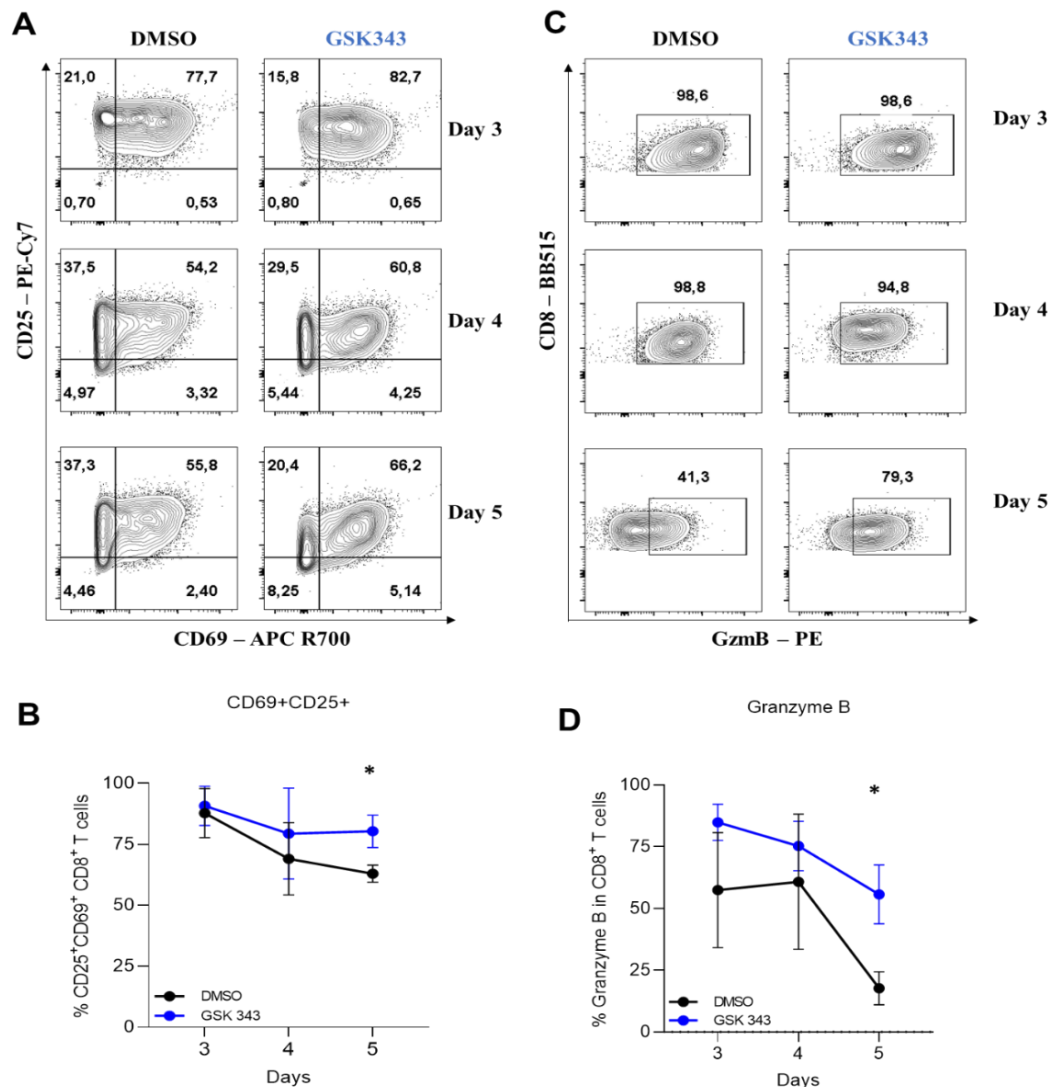


Figura 12 Análise da frequência de células T CD8⁺ co-expressando os marcadores de ativação CD25 e CD69 e o mediador citotóxico Granzima B por citometria de fluxo. (A-B) Co-expressão de CD25 e CD69 por células T CD8⁺ efetoras tratadas com o inibidor epigenético GSK343 ou com o seu respectivo controle negativo DMSO após 3, 4 e 5 dias em cultura. (C-D) Expressão de Granzima B por células T CD8⁺ efetoras tratadas com o inibidor epigenético GSK343 ou com o seu respectivo controle negativo DMSO após 3, 4 e 5 dias em cultura. Os dados quantitativos estão representados como média ± SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; NS, não significativo (P > 0,05). (N=8)

De modo similar à inibição da subunidade EED do complexo PRC2, que mostrou discreto aumento da frequência de células T CD8 IFN- γ +, mas um aumento significativo na expressão de TNF- α , a inibição específica da subunidade EZH2 via GSK343 também mostrou aumento significativo na frequência das células T CD8 TNF- α + quando comparadas com células T ativadas na presença do controle negativo (**Fig. 13**).

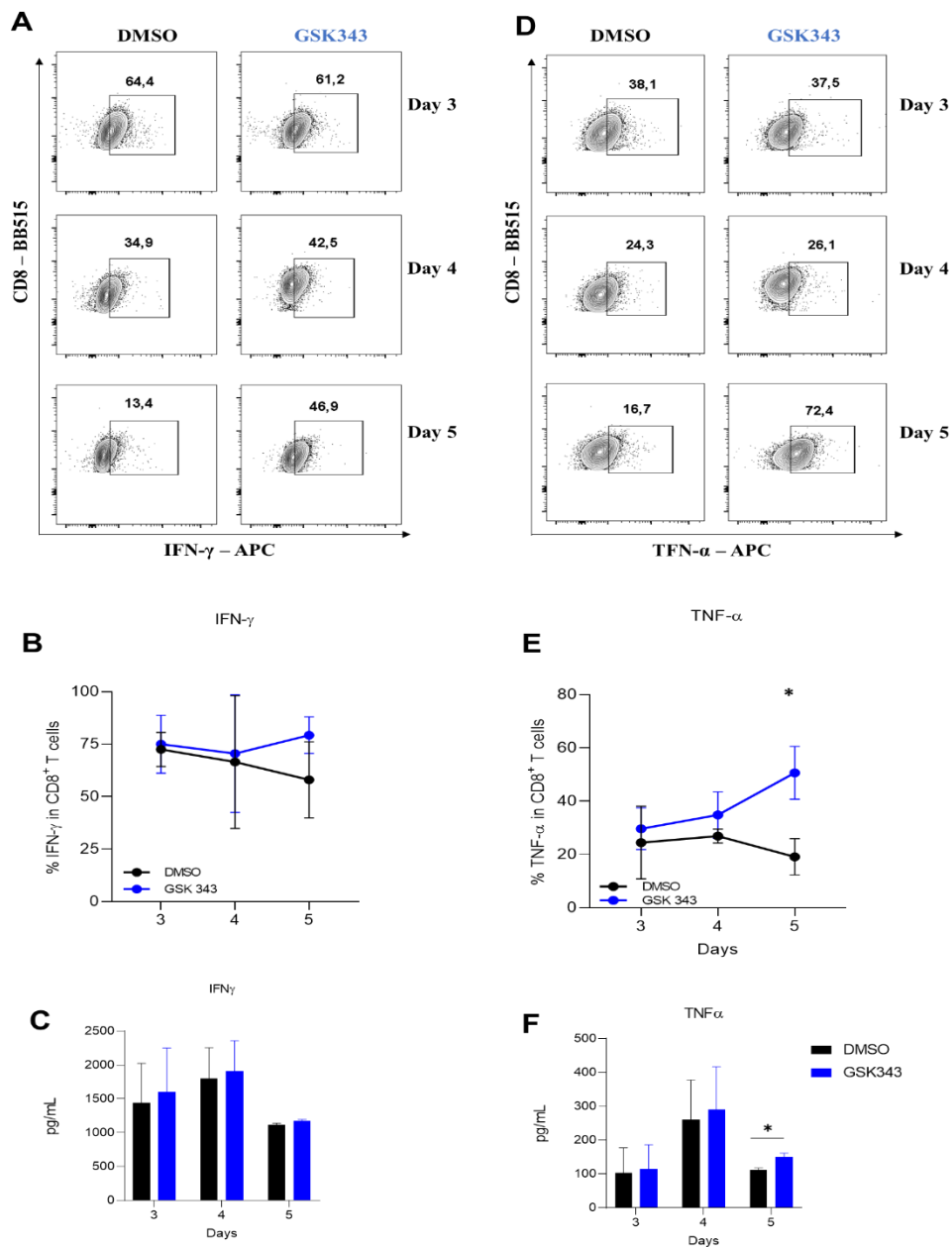


Figura 13 . Regulação mediada por PRC2 da expressão e secreção de IFN- γ e TNF α por células T CD8 (A-B) Expressão de IFN- γ por células T CD8⁺ efetoras tratadas com o inibidor epigenético GSK343 ou com o seu respectivo controle negativo DMSO após 3, 4 e 5 dias em cultura, analisada por citometria de fluxo. **(C)** Análise quantitativa da secreção de IFN- γ no sobrenadante por CBA após 3, 4 e 5 dias de cultura. **(D-E)** Expressão de TNF α por células T CD8⁺ efetoras tratadas com o inibidor epigenético GSK343 e seu respectivo controle negativo DMSO após 3, 4 e 5 dias em cultura, analisada por citometria de fluxo. **(F)** Análise quantitativa da secreção de TNF- α no sobrenadante por CBA após 3, 4 e 5 dias de cultura. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; NS, não significativo (P > 0,05), (n=8).

5.3 Topologia das células T CD8⁺ humanas após a inibição do PRC2

Para determinar os efeitos das sondas químicas na ativação e diferenciação de células T CD8⁺ de forma global, efetuamos uma análise de tSNE (*t-distributed stochastic neighbor embedding*) incluindo células oriundas de todos os grupos experimentais. Para tal, células T CD8⁺ provenientes de todos os doadores e de cada um dos grupos foram selecionadas utilizando o plugin DownSample V3 no software FlowJo V10.6.2 e concatenadas em um único arquivo, que foi utilizado como input para a análise de tSNE baseada na expressão dos marcadores CD69, CD25, TNF- α , IFN- γ e granzima B. A distribuição global das células foi analisada em um espaço bidimensional (tSNE-1 por tSNE-2) e agrupada de acordo com a semelhança do perfil de expressão dos marcadores citados anteriormente.

Observamos que as células T CD8 tratadas com os inibidores de PRC2 ocupam topologias bastante distinta daquelas vistas em células T CD8 tratadas com os controles negativos, definidas pela expressão diferencial dos marcadores de ativação celular CD69 e CD25 e, principalmente, pela expressão de Granzima B (**Fig. 14A-B**). Acerca dos efeitos da inibição da subunidade EED em linfócitos T CD8⁺ efetores, o tratamento com A395 provocou uma evidente concentração em regiões de células co-expressando os marcadores de ativação CD69 e CD25, com acúmulo da expressão de Granzima B no mesmo sítio topológico (**Fig. 14A**). De modo semelhante, a sonda inibidora da subunidade EZH2 também provocou um acentuado deslocamento das células TCD8⁺ efetoras para as regiões topológicas em que há acúmulo de Granzima B (**Fig. 14B**). Neste cenário, obtivemos dados concordantes sobre a modulação da função efetora de linfócitos T CD8⁺ durante a utilização de sondas químicas que inibem subunidades diferentes do PRC2. A rigor, o controle de epigenoma celular via inibição do PRC2 favorece o aumento da expressão do principal mediador citotóxico pelos linfócitos T CD8⁺, com modulação modesta da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias.

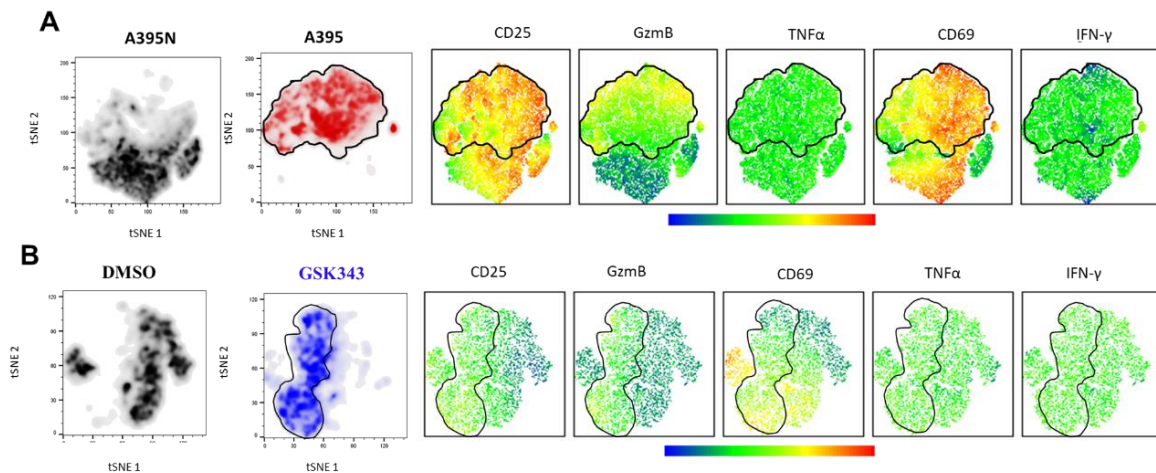


Figura 14 . Análise da distribuição topológica de células T CD8 tratadas com inibidores do PRC2 ou com os seus respectivos controles negativos. Topologia da distribuição das células provenientes de 8 doadores saudáveis vista após redução de dimensionalidade visualizada por tSNE. A) Células T CD8 efetoras tratadas com a sonda química A395 ou com o seu controle negativo A395N (B) Células T CD8 efetoras tratadas com a sonda química GSK343 ou com o seu controle negativo DMSO.

5.4 A Inibição das subunidades EED e EZH2 do complexo repressor Polycomb 2 modula a proliferação de células T CD8+ humanas num período mais crônico de estimulação

Diante do que foi exposto, buscamos investigar os efeitos diretos da inibição de diferentes subunidades do complexo PRC2 em células T CD8+ humanas em um período mais crônico para melhor mimetizar o ocorrido no microambiente tumoral. Para isso, isolamos células T CD8+ de doadores saudáveis e testamos as diferentes condições experimentais citadas anteriormente, a fim de avaliarmos o efeito da inibição do complexo PRC2 sobre a capacidade proliferativa das células, as quais foram marcadas com CellTrace Violet, estimuladas *in vitro* na presença ou não dos inibidores e analisadas após sete dias de cultura.

Observamos que a inibição da subunidade EED através do inibidor epigenético A395 não induziu alterações na proliferação das células T CD8+ quando comparadas com a sua sonda controle A395N (**Fig. 15A**). Em contrapartida, a utilização da sonda epigenética inibidora da subunidade EZH2 (GSK343) resultou em perda da capacidade proliferativa de células T CD8+ sete dias após o estímulo em comparação com as células tratadas com o controle negativo (**Fig. 15B**). Com a inibição da subunidade EZH2, houve aumento da frequência de células que passaram por poucos ciclos de proliferação (1 e 2 ciclos), com redução da frequência de células que passaram por vários ciclos de proliferação (4, 5 e 6 ciclos de proliferação) (**Fig. 15B**).

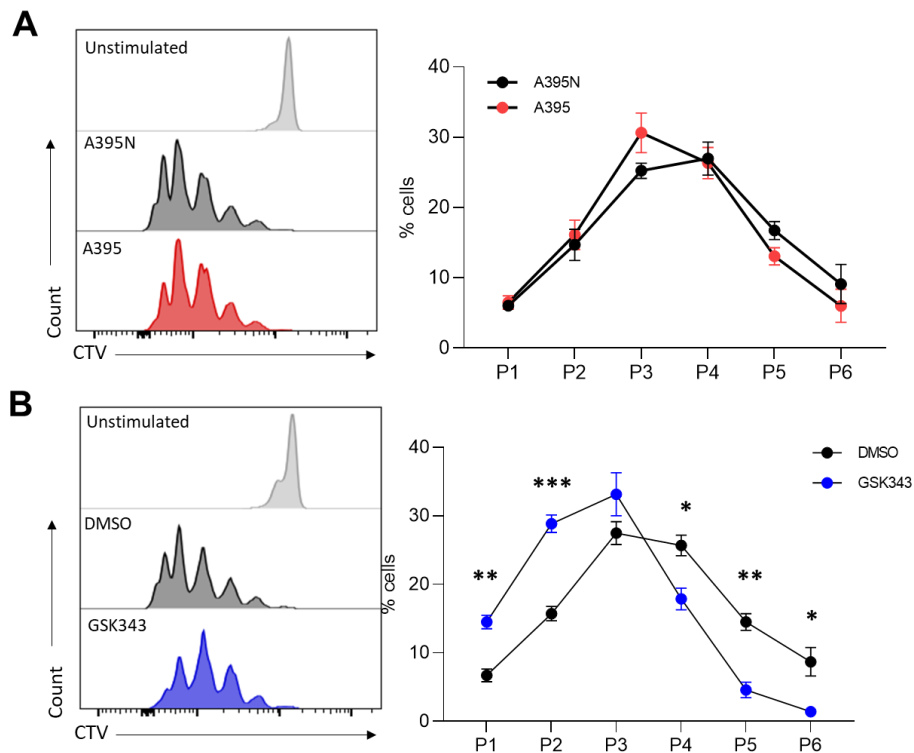


Figura 15 . Efeito da inibição do complexo PRC2 sobre a capacidade proliferativa de células T CD8⁺ humanas efetoras. (A) Análise comparativa da proliferação entre células T CD8 efetoras tratadas por 7 dias com A395 ou com o controle negativo A395N. **(B)** Análise comparativa da proliferação entre células T CD8 efetoras tratadas por 7 dias com GSK343 ou com o controle negativo DMSO. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t de Student em cada pico de proliferação. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; NS, não significativo (P > 0,05). (N= 4)

5.5 A Inibição das subunidades EED e EZH2 do complexo repressor Polycomb 2 não altera o perfil de expressão de marcadores associados à exaustão celular em células T CD8⁺ humanas após um período mais crônico de estimulação

Ao avaliarmos a expressão de marcadores celulares associados à exaustão celular no sétimo dia pós-ativação, observamos que a inibição de PRC2 não altera a expressão dos receptores inibitórios CD39, CD73, LAG3 e PD-1 em células T CD8⁺ quando tratadas com o inibidor A395 em relação ao seu controle A395N (**Fig. 16A-D**). Ao analisarmos o efeito da inibição da subunidade EZH2, notamos um perfil de expressão dos receptores inibitórios CD39, CD73 e LAG3 bastante similar àquele observado durante a inibição da subunidade EED, sem que houvesse alteração em relação ao grupo controle (**Fig. 16E-G**). Porém, a inibição da subunidade EZH2 diminuiu a frequência de células T CD8 expressando PD1 em relação ao grupo tratado com DMSO (**Fig. 16H**). De um modo geral, mesmo com a redução da capacidade proliferativa, os nossos dados sugerem que a inibição do PRC2 não acelerou o perfil de exaustão em linfócitos T CD8 humanos num período mais crônico de estimulação. Portanto, os nossos

dados mostram que a inibição do PRC2 potencializa a dinâmica de expressão de mediadores citotóxicos e inflamatórios por linfócitos T CD8 humanos num período agudo de estimulação celular, sem que haja intensificação do perfil de exaustão celular a longo prazo. Esses dados nos encorajaram a avaliar o impacto da inibição do PRC2 sobre as funções efetoras/citotóxicas de células CAR-T anti-CD19.

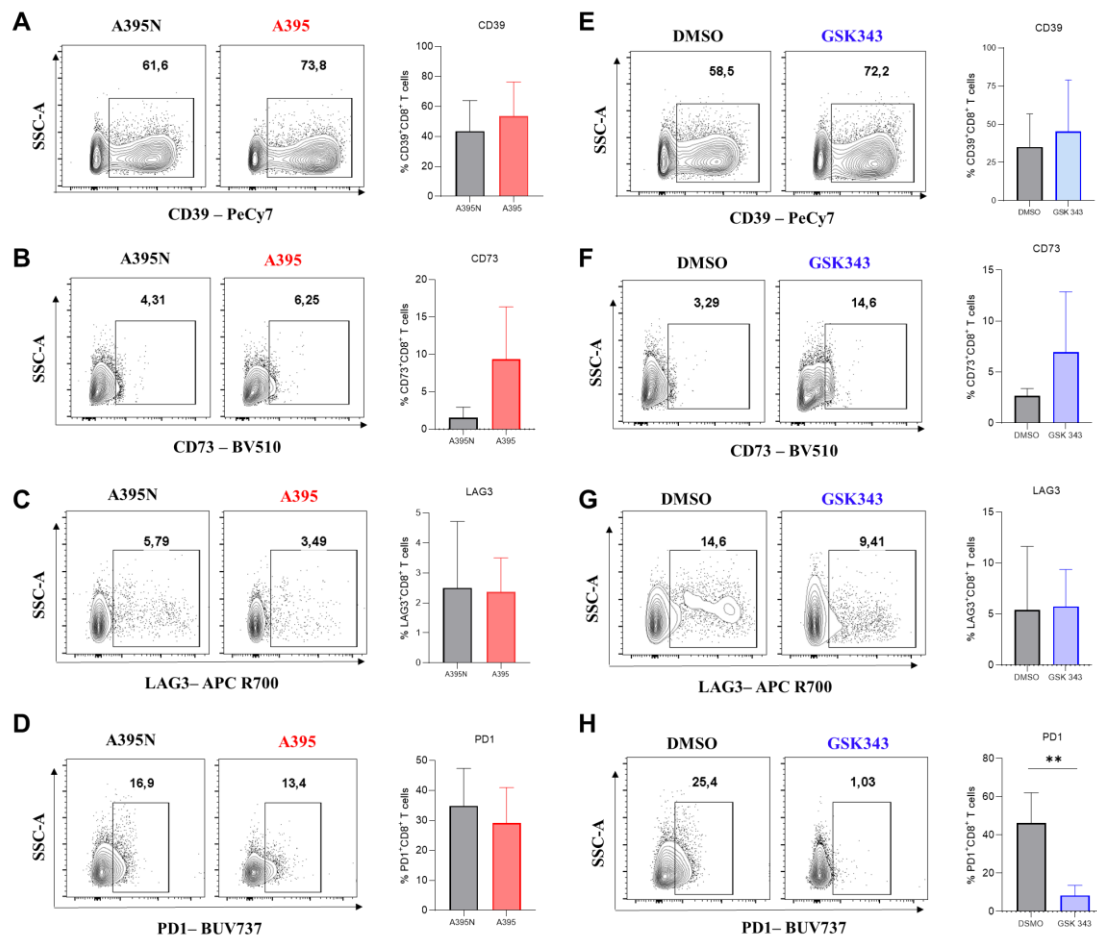


Figura 16 . A inibição do PRC2 não acelera o perfil de expressão de receptores inibitórios em linfócitos T CD8 efetores frente a estímulo policlonal mais crônico. (A-D) Expressão dos marcadores extracelulares (A) CD39, (B) CD73, (C) LAG3 e (D) PD1 em células T CD8⁺ humanas tratadas com o inibidor A395 ou com o controle negativo A395N. (E-H) Expressão dos marcadores extracelulares (A) CD39, (B) CD73, (C) LAG3 e (D) PD1 em células T CD8⁺ humanas tratadas com o inibidor GSK343 ou com o seu controle DMSO. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; NS, não significativo (P > 0,05). (N= 4)

5.6 Análise transcriptômica de linfócitos T CD8⁺ efetores de camundongos WT vs Ezh2^{-/-}

A fim de nos aprofundarmos em como a inibição do complexo PRC2 impactaria de forma global as células T CD8⁺, analisamos dados públicos de sequenciamento gênico do trabalho de Chen, Guobing et al. disponíveis no Gene Expression Omnibus (GEO), sob a identificação GES106426. O modelo utilizado no trabalho consiste em células T CD8⁺ derivadas de camundongos nocautes condicionais para Ezh2 (Ezh2-c-KO) e selvagens (WT). Para análise de transcriptoma por *microarray*, células T CD8⁺ + naive de camundongos Ezh2-c-KO e WT foram isoladas e estimuladas *in vitro* com anti-CD3 fixo [5 µg/mL] e anti-CD28 solúvel [1 µg/mL] por 72 h. Observamos 842 genes com expressão aumentada e 1015 genes com expressão diminuída em células T CD8⁺ de camundongos Ezh2-c-KO em comparação com células T CD8⁺ derivadas de camundongos WT (**Fig. 17A**). Além disso, observamos que células T CD8⁺ derivadas do grupo Ezh2-c-KO apresentaram maior expressão de genes relacionados à citotoxicidade celular, como *Prf1*, *Gzmf*, *Gzme*, *Gzmc* e *Gzmb*, bem como genes de citocinas e quimiocinas e seus respectivos receptores, como *Ccl5*, *Cxcr5*, *IFN γ* , *Cxcr1*, *Cxcr17* (**Fig. 17B**). Ademais, a análise de enriquecimento do conjunto de genes (GSEA) entre os grupos KO e WT revelou enriquecimento de assinaturas gênicas e vias associadas à função citotóxica e efetora (**Fig. 17C e D**).

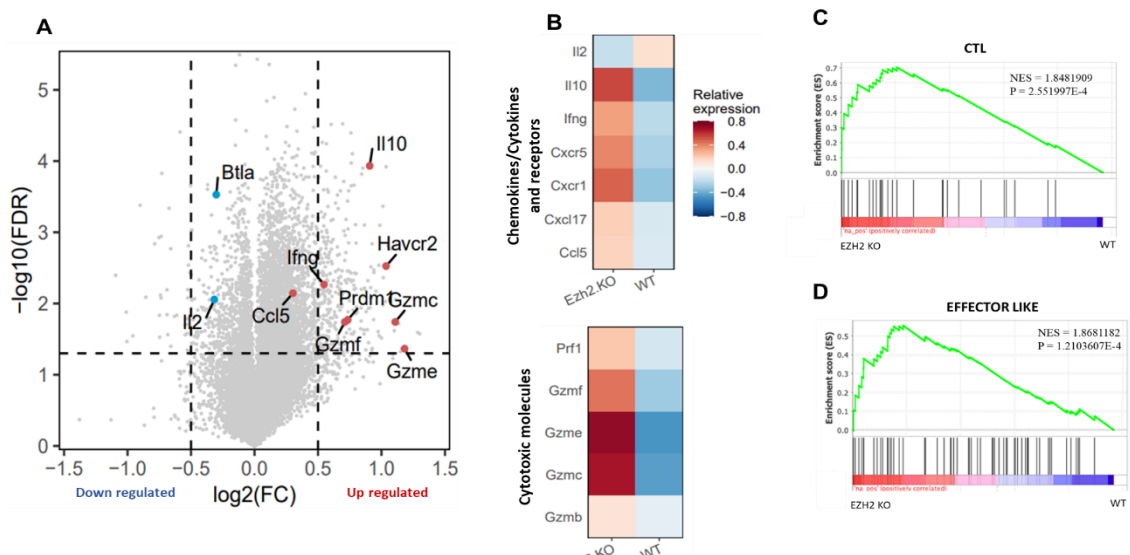


Figura 17 Análise dos dados de RNA-seq de Weng NP et al., 2018 de células T CD8 murinas WT e *ezh2* KO. Linfócitos T CD8⁺ naive isolados de camundongos WT ou Ezh2-c-KO estimuladas com anti-CD3/CD28 *in vitro* por 72 h. Cada grupo tinha três repetições biológicas independentes. **(A)** *Volcano plot* mostrando a expressão alterada de genes regulados positivamente e negativamente (FDR < 0,05) entre WT e Ezh2-c-KO. **(B)** *Heatmap* ilustrando a expressão relativa de genes associados a citocinas, quimiocinas e receptores, além de genes relacionados a citotoxicidade celular. **(C e D)** Análise de Enriquecimento (GSEA) comparando conjunto de genes associados a atividade efetora e citotoxicidade celular em células T CD8 Ezh2 KO e células TCD8 WT.

5.7 Caracterização fenotípica de células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EED do complexo PRC2

Dada a intensa modulação da atividade inflamatória e citotóxica de linfócitos T CD8+ humanos via inibição do PRC2, buscamos investigar se os inibidores de PRC2 teriam efeitos semelhantes em células CAR-T anti-CD19 nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. A fim de determinarmos frequências de células positivas a partir das subpopulações de linfócitos CAR⁺CD4⁺ e CAR⁺CD8⁺ únicos e viáveis, utilizamos a seguinte estratégia de gates representada na **Figura 18**.

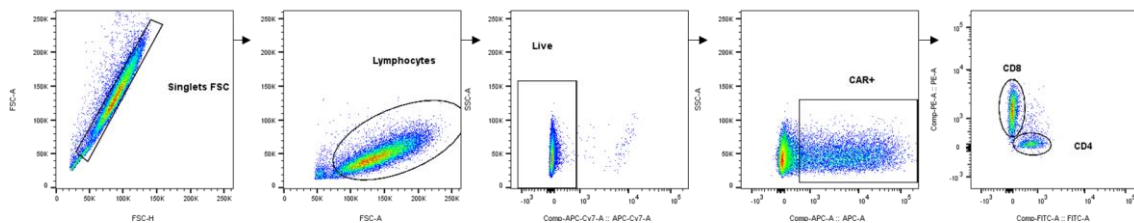


Figura 18 . Estratégia de Gates. Estratégia de gates utilizada para identificar células CAR⁺ únicas e viáveis e posteriormente subpopulações de linfócitos CAR⁺CD4⁺ e CAR⁺CD8⁺.

Primeiramente, avaliamos se a inibição da subunidade EED através do inibidor A395 causaria efeitos na expressão do gene CAR, e observamos que a modulação epigenética não causou nenhum efeito significativo na expressão do receptor (**Fig. 19A-B**). Como esperado, a razão de células T CD4:CD8 permaneceu sem diferença significativa (**Fig. 19C**). Além disso, observamos que não houve diferença na frequência do marcador de ativação celular CD69 dentro das subpopulações de células T CD4⁺ (**Fig. 19D**) e T CD8⁺ (**Fig. 19E**). Por outro lado, observamos um aumento significativo na frequência de células T CD8⁺GzmB⁺ tratadas com o inibidor A395 em comparação ao seu controle A395N no dia 7 pós-ativação, sem que observássemos diferenças entre os grupos nos tempos iniciais (**Fig. 19F**).

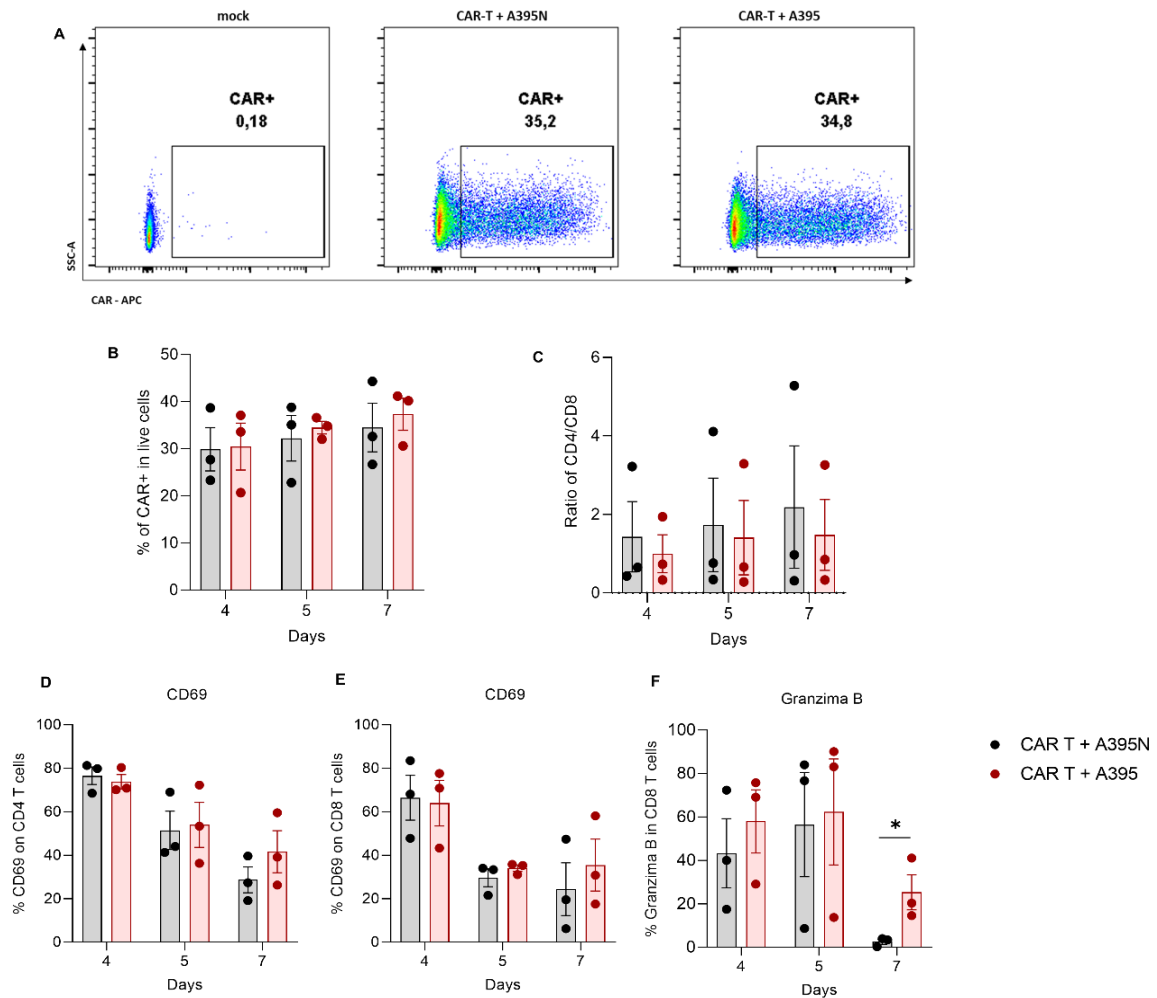


Figura 19 . Caracterização fenotípica de células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EED nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. (A) Dot plots representativos mostrando a expressão do gene CAR em células Mock (células eletroporadas sem plasmídeo), CAR-T tratadas com o inibidor A395 e CAR-T tratadas com o controle A395N. **(B)** Quantificação da expressão do gene CAR em células tratadas com o inibidor A395 ou com o controle A395N nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. **(C)** Razão CD4:CD8 dentro da população CAR+. **(D)** Expressão de CD69 dentro da população CAR+CD4+ tratadas com o inibidor A395 ou com o controle A395N nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. **(E-F)** Expressão de CD69 dentro da população CAR+CD8+ tratadas com o inibidor A395 ou com o controle A395N nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. **(F)** Expressão de Granzima B dentro da população CAR+CD8+ tratadas com o inibidor A395 e seu controle A395N nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; NS, não significativo (P > 0,05).

5.8 Análise da expressão de marcadores associados à exaustão celular em células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EED do complexo PRC2

A fim de caracterizar ainda mais o perfil de células CAR-T tratadas com o inibidor A395, observamos a expressão dos marcadores associados à exaustão celular CD39, LAG3 e PD1 nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. Pudemos constatar que não houve mudanças significativas nas populações de células CAR+CD4+ expressando CD39, LAG3 e PD1 (Fig. 20A-C). Já nas células CAR+CD8+, observamos um aumento significativo na expressão de CD39 no quarto

dia pós-ativação, mas que não se sustenta significativamente nos dias posteriores (**Fig. 19D**). De modo similar à população de células CAR+CD4+, células CAR+CD8+ não apresentaram alterações nas expressões de marcadores inibitórios clássicos, como LAG3 e PD-1, quando comparamos as células tratadas com o inibidor A395 e as tratadas com o controle A395N (**Fig. 20E-F**).

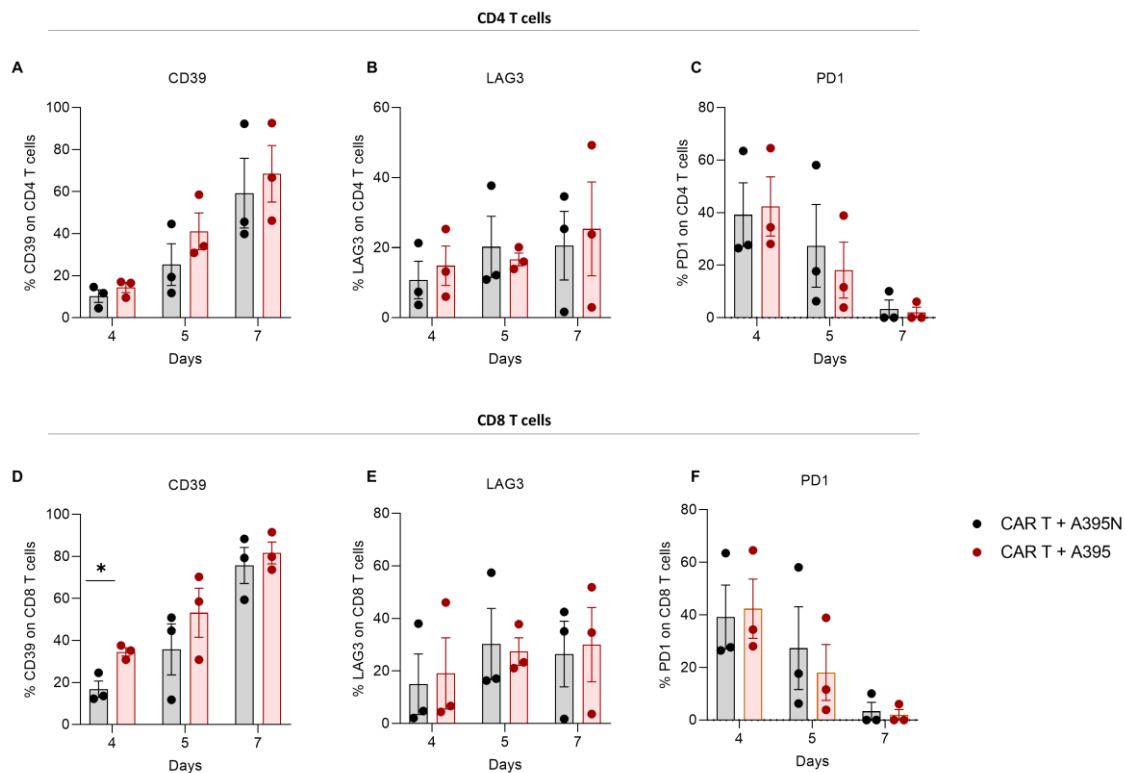


Figura 20 . Análise da expressão de receptores inibitórios em células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EED do complexo PRC2. (A-C) Análise da expressão dos marcadores extracelulares CD39 (A), LAG3 (B) e PD1 (C) em células CAR+CD4+ nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. (D-F) Análise da expressão dos marcadores extracelulares CD39 (D), LAG3 (E) e PD1 (F) em células CAR+CD8+ nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; NS, não significativo ($P > 0,05$).

5.9 Caracterização fenotípica de células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EZH2 do complexo PRC2

Analisamos se a inibição da subunidade EZH2 também induziria efeitos no perfil fenotípico de células CAR-T anti-CD19 nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. Inicialmente, investigamos se o inibidor GSK343 causaria prejuízos na expressão do gene CAR e observamos que a inibição da subunidade EZH2 não causou nenhum efeito significativo na expressão do receptor (**Fig. 21A e B**). Além disso, a proporção de células T CD4:CD8 também permaneceu sem diferença significativa (**Fig. 21C**). Posteriormente, observamos que não houve diferença na frequência do marcador de ativação celular CD69 dentro das subpopulações de células T

CD4+ (**Fig. 21D**) e T CD8+ (**Fig. 21E**), bem como em T CD8+GzmB+ tratadas com o inibidor A395 em comparação ao seu controle A395N no dia 7 pós-ativação (**Fig. 21F**).

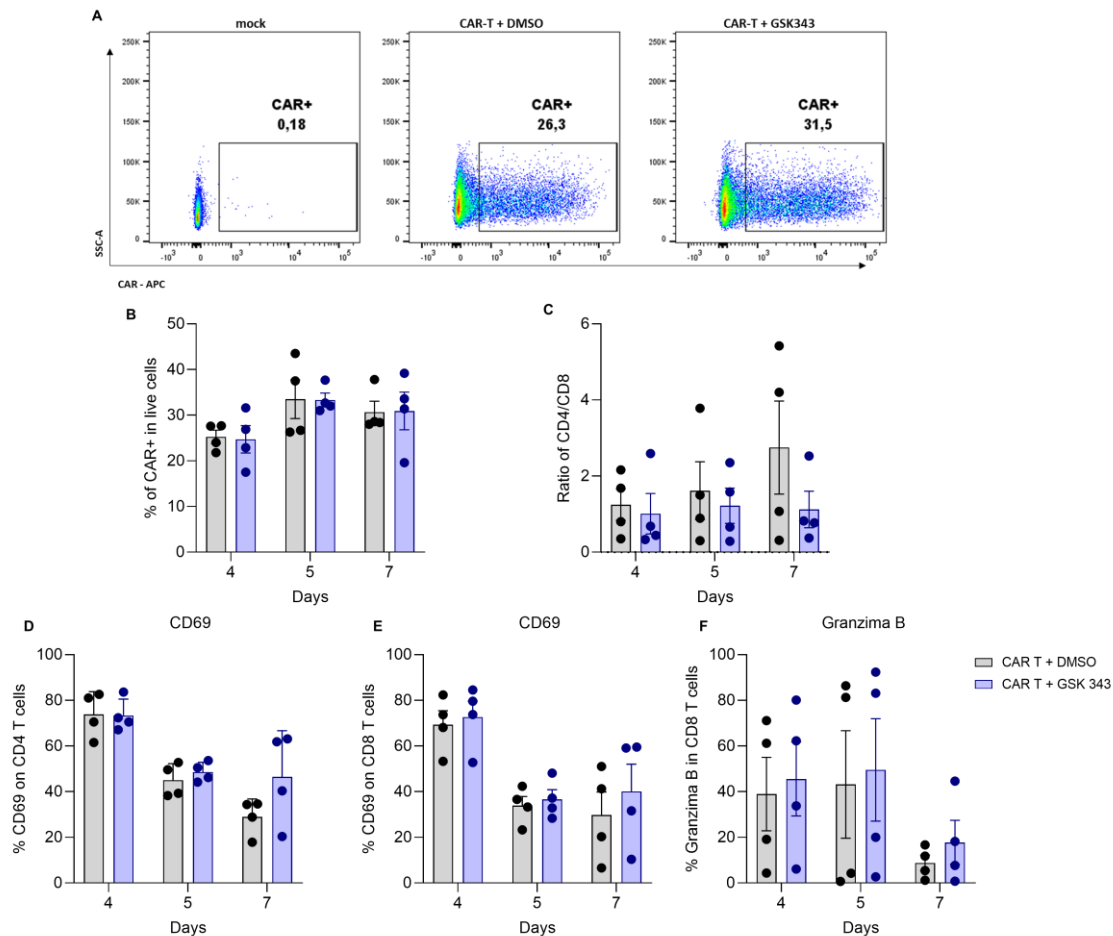


Figura 21 . Caracterização fenotípica de células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EZH2 nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação celular. (A) Dot plots representativos mostrando a expressão do gene CAR em células Mock (células eletroporadas sem plasmídeo), CAR-T tratadas com o inibidor GSK343 e CAR-T tratadas com o controle DMSO. (B) Quantificação da expressão do gene CAR em células tratadas com o inibidor A395 ou com o controle A395N nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. (C) Razão CD4:CD8 dentro da população CAR+. (D) Expressão de CD69 dentro da população CAR+CD4+ tratadas com o inibidor A395 ou com o controle A395N nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. (E) Expressão de CD69 dentro da população CAR+CD8+ tratadas com o inibidor GSK343 ou com o controle DMSO nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. (F) Expressão de Granzima B dentro da população CAR+CD8+ tratadas com o inibidor GSK343 ou com o controle DMSO nos dias 4, 5 e 7 pós-ativação. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; NS, não significativo ($P > 0,05$).

5.10 Análise da expressão de marcadores associados à exaustão celular em células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EZH2 do complexo PRC2

Observamos, em seguida, a expressão dos marcadores associados à exaustão celular CD39, LAG3 e PD1 durante os dias 4, 5 e 7 pós-ativação das células CAR-T tratadas com o inibidor GSK343 ou com o controle DMSO. Constatamos que não houve mudanças significativas nas populações de células CAR+CD4+ expressando CD39, LAG3 e PD1 ao longo

do tempo (**Fig. 22A-C**), com exceção de um aumento pontual (exclusivamente no dia 5) da frequência de células CAR+CD4+ expressando CD39 em células tratadas com GSK343 em relação ao controle (**Fig. 22A**). De maneira análoga, a frequência de células CAR+CD8+ expressando CD39 aumentou exclusivamente no quinto dia após a inibição de EZH2, mas que não se sustentou significativamente no dia posterior (**Fig. 22D**). De modo similar, a frequência de células CAR+CD8+ expressando LAG3 não foi alterada pela inibição da subunidade de EZH2 ao longo do tempo (**Fig. 22E**). Entretanto, de modo surpreendente, a expressão da molécula de PD1 diminuiu significativamente ao longo do tempo em células CAR+CD8+ tratadas o inibidor de EZH2 (GSK343) comparada com aquela observada em células tratadas com o controle negativo (DMSO).

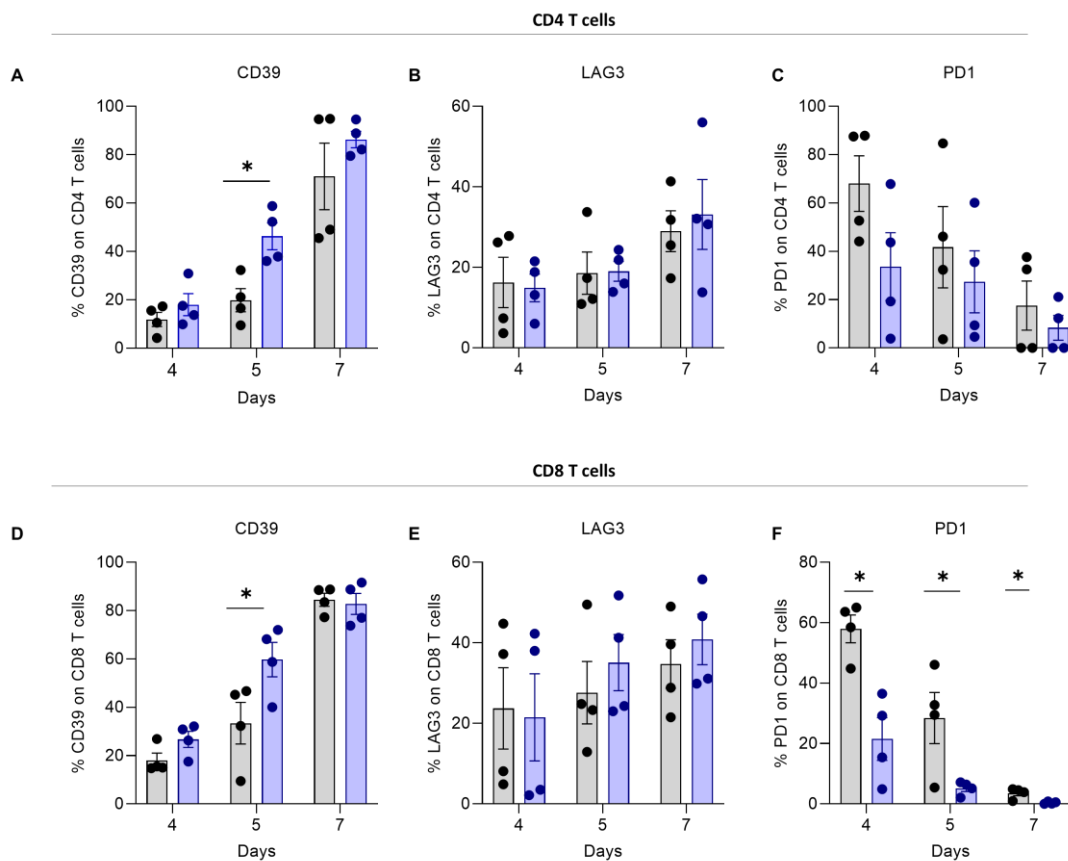


Figura 22 . Análise da expressão de receptores inibitórios em células CAR-T anti-CD19 após inibição da subunidade EZH2 do complexo PRC2. (A-C) Análise da expressão dos marcadores extracelulares CD39 (A), LAG3 (B) e PD1 (C) em células CAR+CD4+ nos dias 4, 5 e 7 pós ativação. (D-F) Análise da expressão dos marcadores extracelulares CD39 (D), LAG3 (E) e PD1 (F) em células CAR+CD8+ nos dias 4, 5 e 7 pós-estimulação policlonal. Os dados quantitativos estão representados como média \pm SEM.; os valores de P foram calculados pelo teste de t Student, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; NS, não significativo ($P > 0,05$).

5.11 A inibição da subunidade EED do Complexo PRC2 em células CAR-T anti-CD19 aumenta sua capacidade antitumoral frente às células de linhagem de LLA-B

Para validarmos o potencial antitumoral de células CAR-T anti-CD19 tratadas com os inibidores do complexo PRC2, realizamos um ensaio de lise celular com células de linhagem tumoral de LLA-B CD19+ Nalm-6 em uma proporção de efetora:alvo de 0.25:1. Observamos que, em comparação com as células CAR-T tratadas com a sonda controle A395N, as células CAR-T tratadas com o inibidor A395 foram mais eficazes na eliminação de células tumorais Nalm-6 (CD19+) ao longo de 48 h. Como observado na Figura 23, houve uma morte aproximadamente duas vezes maior das células tumorais quando em co-cultura com células CAR-T tratadas com o inibidor da subunidade EED. É válido ressaltar que o resultado abaixo é um experimento preliminar conduzido com apenas dois doadores, sendo necessária a realização de mais ensaios comprobatórios.

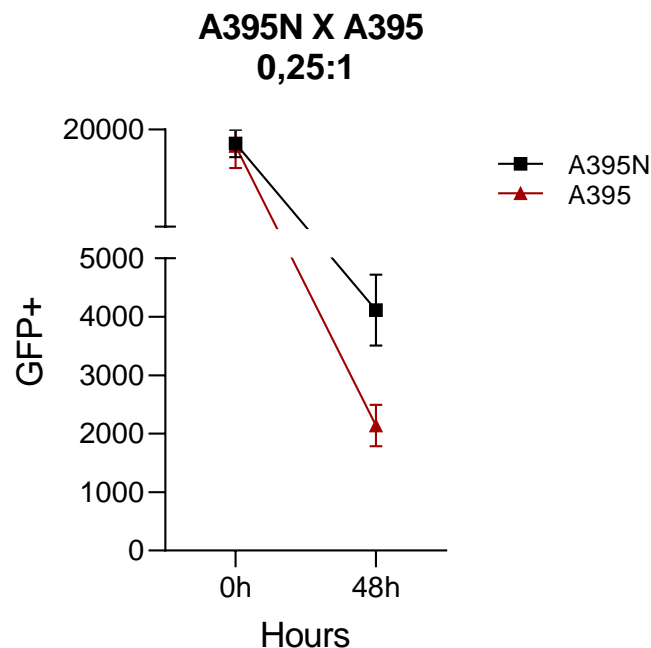


Figura 23 . Ensaio de morte celular com células de linhagem celular de LLA-B Nalm-6 CD19+. Co-cultura de células de células Nalm-6 GFP+ com linfócitos CAR-T tratados com o inibidor A395 ou seu controle negativo A395N durante 48h. (N=2)

Diante desse cenário, nossos dados demonstram que a repressão do complexo PRC2 aumenta a expressão de moléculas associadas a uma atividade efetora e citotóxica em células T CD8+ de indivíduos saudáveis e em células CAR-T anti-CD19; e este aumento potencializou a eliminação de células tumorais Nalm-6 após uma co-cultura realizada com células CAR-T tratadas com o inibidor A395 durante 48h. Ademais, a inibição da subunidade EZH2 diminuiu

a expressão do relevante checkpoint imune PD1 em linfócitos CAR+CD8+ em todos os dias de ativação, sem comprometimento sustentado de outros receptores inibitórios. Portanto, destacamos um grande potencial modulatório de sondas químicas inibidoras do PRC2 sobre células T CD8+ efectoras humanas e sobre células CAR-T anti-CD19, com potencialização da atividade citotóxica e com impacto mínimo sobre a capacidade proliferativa e sobre o perfil de exaustão dessas células.

6. DISCUSSÃO

Os estudos que relatam os efeitos dos inibidores do complexo PRC2 se concentram, principalmente, em seu impacto nas células cancerígenas e no microambiente do tumor em geral, visto que a superexpressão de diferentes subunidades desse complexo está intimamente envolvida na tumorigênese e na progressão de células tumorais, tornando sua inibição uma estratégia viável para a terapia epigenética do câncer⁴¹. Até o momento, as possíveis implicações da regulação epigenética sobre o sistema imune são parcamente caracterizadas.

A fim de ampliar os estudos nessa área e diversificar as pesquisas dos efeitos do Complexo Repressor Polycomb 2 em outros tipos celulares também importantes no contexto antitumoral, buscamos avaliar como a ativação de células T CD8 naíves podem sofrer alterações funcionais e fenotípicas através de mecanismos epigenéticos. Para tanto, utilizamos sondas químicas com capacidade de modular os processos de metilação celular, especialmente aqueles com capacidade de reprimir a transcrição gênica por meio do depósito de marcas repressoras, como a trimetilação da lisina 27 na histona H3, na região promotora de genes inflamatórios³⁷.

Primeiramente, mostramos como a modulação *in vitro* de linfócitos T CD8+ humanos via inibição da subunidade EED do complexo PRC2 resultou em um aumento na frequência de células T CD8+ efectoras que expressam marcadores de ativação, grânulos citotóxicos e citocinas pró-inflamatórias em uma cinética temporal, sem que a célula perca funcionalidade em períodos mais longos de estimulação, mantendo a proliferação celular e a expressão de marcadores associados à exaustão celular sem alterações significativas. Apesar da EED não ser a subunidade catalítica do complexo PRC2, esta é necessária para complementar a atividade de metiltransferase das subunidades catalíticas EZH2/1, além de exercer a função de ativação alostérica via ligação de H3K27me3. Os estudos sobre a inibição ou deleção da subunidade EED são quase sempre limitados a células tumorais. O nosso grupo, porém, é pioneiro no que se refere à modulação epigenética da atividade de linfócitos T CD4+ murinos e humanos³⁹. Mostramos, por exemplo, que a inibição do PRC2 favorece a resposta pró-inflamatória de

linfócitos T CD4+, com indução aumentada de mediadores pró-inflamatórios, como IFN- γ e TNF- α , o que nos encorajou a avaliar o impacto do PRC2 como um complexo repressor da atividade antitumoral de linfócitos T CD8.

A inibição da subunidade EZH2 do mesmo complexo também provocou um aumento na frequência de linfócitos T CD8+ expressando marcadores de ativação celular, além do grânulo citotóxico Granzima B e a citocina pró-inflamatória TNF α . Nesse sentido, trabalhos mostram evidências indicando que EZH2 pode regular a produção de citocinas por células T CD8+. Utilizando protocolo com células T CD8 naíves de camundongos Ezh2-c-KO e WT, as quais foram isoladas e ativadas *in vitro* com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, a produção aumentada de IFN- γ , interleucina 2 (IL-2) e GZMB após 72h de estimulação de células T CD8 Ezh2-c-KO, sugerindo que a ação da metiltransferase EZH2 inibe a produção de citocinas, especialmente citocinas pró-inflamatórias³⁴. Em contrapartida, outro estudo observou resultados opostos. A deleção condicional de EZH2 em células T CD8+ ativadas prejudicou a produção de TNF- α , mas produziu porcentagens equivalentes de células IFN- γ + e IL-2+ em comparação com as células EZH2^{fl/fl} 8 dias após infecção com o vaccinia codificando gp100 (VVA-gp100)⁴⁶. Considerando que os resultados contraditórios podem ser explicados pelo uso de metodologias diferentes, o primeiro trabalho realizou a deleção de Ezh2 em células CD8 T CD8+ naive com deficiência de EZH2 no desenvolvimento de timócitos (EZH2 fl/fl CD4Cre +), já no segundo trabalho utilizaram o nocaute condicional com um sistema Gzmb (Granzima B)-Cre. o papel de EZH2 na produção de citocinas por células T CD8+ precisa ser colocado em cada ambiente de cada modelo de infecção crônica e/ou câncer de modo individualizado⁴⁴.

Além disso, o tratamento com o inibidor GSK343 retardou a proliferação celular num período mais longo de estímulo, visto por uma menor porcentagem de células nos últimos picos de divisão. Ademais, nossos dados mostraram que o tratamento com o inibidor GSK343 resultou em uma diminuição na frequência do marcador associado à exaustão PD1 no dia 7 após ativação policlonal. A via inibitória de PD-1 tem um papel central na regulação da exaustão de células T em cenários de infecções crônicas e no câncer, e a imunoterapia direcionada ao bloqueio de PD-1 é aprovada para o tratamento de diversos (sub)tipos tumorais. Contudo, nem todos os pacientes respondem ao tratamento e há um interesse considerável no desenvolvimento de terapias direcionadas a PD-1 para melhorar a taxa de resposta geral e obter respostas mais completas e duradouras em pacientes com câncer. Nesse contexto, alternativas associadas à

modulação epigenética com inibidores de pequenas moléculas podem ser uma estratégia promissora.

Para delinear ainda mais nossos experimentos e aprimorar a área da imunoterapia contra o câncer, direcionamos os resultados promissores obtidos através da modulação da atividade inflamatória e citotóxica de linfócitos T CD8⁺ humanos via inibição do PRC2 para um contexto clínico. Buscamos nos valer desta aplicação para potencializar a função citotóxica antitumoral em células CAR-T específicas para CD19, antígeno com expressão restrita aos linfócitos B e seus progenitores. Nós vimos que o aumento da expressão de Granzima B em CAR-T tratadas com os inibidores do Complexo PRC2 refletiu numa maior capacidade dessas células eliminarem células de linhagem tumoral em comparação aos seus respectivos controles. Para nossa surpresa, a inibição das subunidades EED e EZH2 aumentaram a capacidade efetora de células CAR-T e não promoveram a expressão de marcadores associados à exaustão celular, pelo contrário, a inibição da subunidade EZH2 diminuiu drasticamente a expressão de PD1 em todos os dias de cultura. Diante do que foi exposto, nossos resultados abrem novas perspectivas para a manipulação da reprogramação epigenética tanto no contexto de terapias adotivas de células T quanto de células CAR-T.

7. CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto, nossos dados apontam para um controle epigenético da funcionalidade de linfócitos T CD8⁺ através da inibição de diferentes subunidades do complexo PRC2. Mostramos que as sondas químicas GSK343 e A395 exercem efeitos sobre o aumento na expressão de marcadores de ativação, sobre a capacidade de produção de mediadores inflamatórios e sobretudo citotóxicos em células T CD8⁺ sem que haja comprometimento da sua capacidade proliferativa. Além disso, mostramos que a inibição da metiltransferase EZH2 diminuiu a expressão do relevante imunocheckpoint PD1, sugerindo que o complexo repressivo PRC2 tem ação supressora direta sobre a função antitumoral dessas células.

Ademais, a inibição deste complexo com inibidores específicos também exerceu efeito estimulador sobre a capacidade de produção de mediadores citotóxicos em células CAR-T anti-CD19, levando as células CAR-T tratadas com o inibidor A395 eliminarem as células de linhagem tumoral de LLA-B CD19⁺ Nalm-6 mais eficientemente em comparação com células CAR-T anti-CD19 tratadas com o controle A395N.

Nossos dados resultados sugerem que a modulação epigenética por meio da inibição do complexo PRC2 pode ser uma alternativa promissora para potencializar a atividade antitumoral

de células CAR-T, podendo despontar futuramente como uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de pacientes com LLA-B.

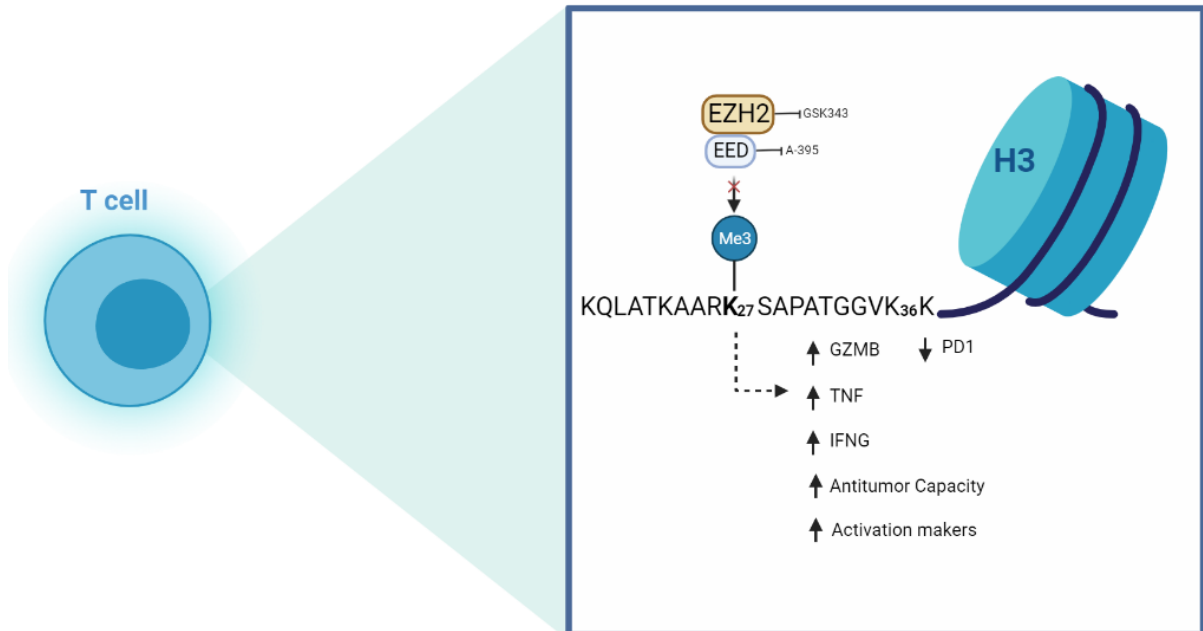


Figura 24 . Efeitos da inibição do complexo PRC2 em células T. Esquema gráfico de explicação sobre os efeitos dos inibidores das subunidades EZH2 e EED em células T.

REFERÊNCIAS

1. XU C et al. CD8 + T cells mediate the antitumor activity of frankincense and myrrh in hepatocellular carcinoma. **J Transl Med.** 2018.
2. HE, X., XU, C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. **Cell Res** 30, 660–669 (2020).
3. TAKADA & JAMESON. Self–class I MHC molecules support survival of naïve CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. **J Exp Med.** 2009.
4. DE LA ROCHE M et al. Origins of the cytolytic synapse. **Nat. Rev. Immunol.** 2016.
5. BIJLSMA MF et al. Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. **Cell. Signal.** 2007.
6. BLANK, CU, HAINING, WN, HELD, W. et al. Definindo 'exaustão de células T'. **Nat Rev Immunol** 19, 665-674 (2019).
7. STINCHCOMBE JC et al. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. **Nature.** 2006.
8. VOSKOBOINIK I et al. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. **Nat. Rev. Immunol.** 2015.
9. BRUSERUD O et al. IFN-gamma and TNF-alpha secretion by CD4+ and CD8+ TCR alpha beta + T-cell clones derived early after allogeneic bone marrow transplantation. **Eur J Haematol.** 1993.
10. NIELL HB et al. Cytotoxic effects of alpha- and gamma-interferon and tumor necrosis factor in human bladder tumor cell lines. **Urological Research.** 1994.
11. JOHANSSON S et al. Effect of Inflammatory Cytokines on Major Histocompatibility Complex Expression and Differentiation of Human Neural. **Stem Cells.** 2008.
12. VITIELLO GAF, FERREIRA WAS, CORDEIRO DE LIMA VC, MEDINA TDS. Antiviral Responses in Cancer: Boosting Antitumor Immunity Through Activation of Interferon Pathway in the Tumor Microenvironment. **Front Immunol.** 2021;12:782852. Published 2021 Dec 2.
13. ZHAO M et al. IL-6/STAT3 pathway induced deficiency of RFX1 contributes to Th17-dependent autoimmune diseases via epigenetic regulation. **Nat Commun.** 2018.
14. MCCARTHY MK et al. IL-17 contributes to neutrophil recruitment but not to control of viral replication during acute mouse adenovirus type 1 respiratory infection. **Virology.** 2014.

15. MÜLLER E. Toll-Like Receptor Ligands and Interferon- γ Synergize for Induction of Antitumor M1 Macrophages. **Front Immunol.** 2017.
16. ZHAO Z. TNF Induction of NF- κ B RelB Enhances RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Promoting Inflammatory Macrophage Differentiation but also Limits It through Suppression of NFATc1 Expression. **PLoS One.** 2015.
17. NAGARSHETH N et al. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. **Nat. Rev. Immunol.** 2017.
18. LANITIS E et al. Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity. **Curr. Opin Immunol.** 33, 55-63 (2015).
19. CARMELIET P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature.** 407, 249-257 (2000).
20. Shweiki D et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature.** 359, 843-845 (1992).
21. BUCKANOVICH RJ et al. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. **Nat. Med.** 14, 28- 36 (2008).
22. WU NZ, et al. Diminished leukocyte-endothelium interaction in tumor microvessels. **Cancer Res.** 52, 4265-4268 (1992).
23. GRIFFIOEN AW et al. Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. **Cancer Res.** 56, 1111-1117 (1996),
24. HUANG Y et al. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. **Cancer Res.** 73, 2943-2948 (2013).
25. FACCIABENE A et al. Tumor hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. **Nature.** 475, 226-230 (2011).
26. LI AH et al. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **J. Immunol.** 170, 3369-3376 (2003).
27. CUI TX et al. Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA 101 and suppressing the corepressor CtBP2. **Immunity.** 39, 611-621 (2013).
28. MIZUKAMI Y et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of FOXP3 + regulatory T cells in gastric cancer. **Int. J. Cancer.** 122, 2286-2293 (2008)

29. HUBER V et al. Cancer acidity: an ultimate frontier of tumor immune scape and a novel target of immunomodulation. *Semin. Cancer Biol.* 43, 74-89 (2017).
30. FISCHER K et al. Inhibitory effect of tumor-cell derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 109, 3812-3819 (2007).
31. MENDLER AN et al. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int. J. Cancer.* 131, 633-640 (2012).
32. Speiser DE. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 599- 611 (2016).
33. Margueron R & Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 469, 343-349 (2011).
34. Chen, Guobing et al. "Ezh2 Regulates Activation-Induced CD8⁺ T Cell Cycle Progression via Repressing Cdkn2a and Cdkn1c Expression." *Frontiers in immunology* vol. 9 549. 26 Mar. 2018
35. Gray SM et al. Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8⁺ T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency. *Immunity.* 46, 596-608 (2017).
36. Köhler N, Ruess DA, Kesselring R, Zeiser R. The Role of Immune Checkpoint Molecules for Relapse After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2021
37. DuPage M et al. The chromatin-modifying enzyme EZH2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. *Immunity.* 42, 227-238 (2015).
38. Ghoneim HE et al. De novo epigenetic programs inhibit PD-1 blockade mediated T cell rejuvenation. *Cell.* 170, 142-157 (2017).
39. Suarez ER et al. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PDL1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model. *Oncotarget.* 7, 34341-55 (2016).
40. Scheer S, Ackloo S, Medina T et al. A chemical biology toolbox to study protein methyltransferases and epigenetic signaling. *Nature Communications,* 10, 19 (2019).
41. Barsyte-lovejoy, Dalia. *Chemical Biology Approaches for Characterization of Epigenetic Regulators.* 2016.
42. Pace L, et al. The epigenetic control of stemness in CD8(+) T cell fate commitment. *Science.* 2018

43. Naito T, Muroi S, Taniuchi I, Kondo M. Loss of Eed leads to lineage instability and increased CD8 expression of mouse CD4(+) T cells upon TGFbeta signaling. **Mol. Immunol.** 2018.
44. Kakaradov, B., Arsenio, J., Widjaja, C. *et al.* Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8⁺ T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. **Nat Immunol** 18, 422–432 (2017).
45. He, S., Liu, Y., Meng, L. *et al.* Ezh2 phosphorylation state determines its capacity to maintain CD8⁺ T memory precursors for antitumor immunity. **Nat Commun** 8, 2125 (2017).
46. Gray SM, Amezcua RA, Guan T, Kleinstein SH, Kaech SM. Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8⁺ T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency. **Immunity.** 2017
47. Miliotou AN & Papadopoulou LC. CART-cell therapy: a new era in cancer immunotherapy. **Curr Pharm Biotechnol.** 19, 5-18 (2018).
48. Arrowsmith, C. H. *et al.* The promise and peril of chemical probes. **Nat. Chem. Biol.** 11, 536–541 (2015).
49. Ribich, S., Harvey, D. & Copeland, R. A. Drug discovery and chemical biology of cancer epigenetics. **Cell Chem. Biol.** 24, 1120–1147 (2017).
50. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. **Blood Cancer J.** 2021
51. Hong M, Clubb JD, Chen YY. Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. **Cancer Cell.** 2020
52. Tokarew, N., Ogonek, J., Endres, S. *et al.* Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. **Br J Cancer** 120, 26–37 (2019).
53. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, Maiti S, Manuri P, Senyukov V, Jena B, Kebriaei P, Champlin RE, Huls H, Cooper LJ. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. **PLoS One.** 2013.
54. Singh H, Huls H, Kebriaei P, Cooper LJ. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19. **Immunol Rev.** 2014
55. Prommersberger S, Monjezi R, Shankar R, Schmeer M, Hudecek M, Ivics Z, Schlee M. Minicircles for CAR T Cell Production by Sleeping Beauty Transposition: A Technological Overview. **Methods Mol Biol.** 2022

56. Gill S, June CH. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. **Immunol Rev.** 2015
57. Shah NN, Johnson BD, Schneider D, Zhu F, Szabo A, Keever-Taylor CA, Krueger W, Worden AA, Kadan MJ, Yim S, Cunningham A, Hamadani M, Fenske TS, Dropulić B, Orentas R, Hari P. Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial. **Nat Med.** 2020
58. Kochenderfer, J. N. *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. **Blood** 119, 2709–2720 (2012).