

MARIANA PEREIRA PINHO

**Análise do repertório de linfócitos T em pacientes
com câncer: desvendando a resposta imune
antitumoral em humanos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

MARIANA PEREIRA PINHO

**Análise do repertório de linfócitos T em pacientes
com câncer: desvendando a resposta imune
antitumoral em humanos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

Versão Original

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira Pinho, Mariana

Análise do repertório de linfócitos T em pacientes com câncer: desvendando a resposta imune antitumoral em humanos / Mariana Pereira Pinho; orientador José Alexandre Marzagão Barbuto. -- São Paulo, 2019.

165 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Linfócitos T. 2. Antígenos tumorais. 3. Imunovigilância antitumoral. 4. Imunoterapia. 5. Câncer. I. Marzagão Barbuto, José Alexandre, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Pereira Pinho

Título da Dissertação/Tese: Análise do repertório de linfócitos T em pacientes com câncer:
desvendando a resposta imune antitumoral em humanos

Orientador: Jose Alexandre Marzagão Barbuto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de
Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

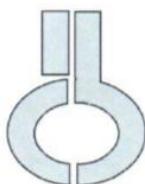
() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 05 de março de 2015.

PARECER 1221/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Análise do repertório de linfócitos T em pacientes com câncer: desvendando a resposta imune antitumoral em humanos*" do pesquisador **José Alexandre Marzagão Barbuto** e aluna **Mariana Pereira Pinho** "

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: **icb.usp.br**.

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **05.03.2016**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 31 de agosto de 2016.

PARECER 1312/CEPSH

CAAE nº 58822116.7.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1349/16

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**CÉLULAS DENDRÍTICAS NA IMUNOTERAPIA DE GLIOBLASTOMAS**", do pesquisador Prof. Dr. **José Alexandre Marzagão Barbuto**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **31/08/2017**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora-3 da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

A aqueles que iluminaram meu caminho,
me deram força para continuar, e nunca
deixaram de acreditar em mim: meus pais,
e meu amor Sívio

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ary e Denize, por todo sacrifício, incentivo e ajuda ao longo da minha vida, e aos meus irmãos, Bruno e Felipe, por todos os bons momentos que passamos juntos.

Ao amor da minha vida, Sílvia, por alegrar os meus dias e por me apoiar, me compreender, e me incentivar, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador e mentor Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e aprender com sua grande sabedoria.

À Dr^a. Federica Sallusto por ter me aceitado para fazer um estágio científico em seu laboratório na Suíça, e pelas discussões científicas e conhecimentos compartilhados, que foram fundamentais para realização deste trabalho. Também a todos os membros de seu laboratório, por toda a troca de conhecimentos e ajuda durante minha estadia.

Ao Hospital Pérola Byington e, em especial, ao Dr. Fabio Laginha e ao enfermeiro Henrique Gomes Guedes pelo auxílio na obtenção das amostras de pacientes com câncer de mama.

Ao ICESP e, em especial, ao Dr. Guilherme Lepski e a Samia Wayhs por ajudarem a conduzir o ensaio clínico e fornecer as amostras de pacientes com glioblastoma.

A todos os pacientes que, mesmo em sua frágil situação, forneceram amostras para que este estudo pudesse ser realizado.

Ao Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, suas enfermeiras, ao Dr. Joselito Brandão e aos doadores de plaquetas, por fornecerem amostras controles para este estudo.

À Engenheira Elizabeth Somessari do Centro de Irradiações do IPEN, pelo auxílio na irradiação das amostras.

À Prof^a Dr^a. Mari Sogayar, e seus alunos Renato, Otto, Fernando, Gabriel, Camila e Aline pelo auxílio com as técnicas de biologia molecular, nucleofecção e sorting.

À Célia pelo carinho e por me ajudar, tão prontamente, em todos os momentos.

Aos amigos e colegas do laboratório de imunologia de tumores, em especial ao Thiago, Sarah, Elizabeth, Nadia Emely, Gabriela, Isabella, Rodrigo, Cecília, Kleber, Barbara e Lislely por toda ajuda e apoio fornecidos, e por todos os bons momentos vividos dentro e fora do laboratório. Em especial à Carol e à Renata pelas frequentes doações de sangue para o projeto.

À Dr^a. Patrícia Bergami por todos os seus ensinamentos pessoais e científicos.

A todos os professores do departamento, pelas aulas ministradas e reagentes cedidos.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos S. Ferreira e Dr.^a Bruna Maldonado pelas bactérias cedidas.

A todos os funcionários do departamento, por manterem o prédio em funcionamento, e em especial à Eni, João, Amanda e Jotelma pela ajuda nas questões burocráticas.

Aos colegas do departamento pela amizade, discussões e bons momentos vividos.

À Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de doutorado (processo nº #2014/25988-1) e de ensino e pesquisa no exterior (processo nº #2016/01137-8) concedidas, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, #409825/20016-6). Agradecemos pelo apoio financeiro, sem o qual esse trabalho não poderia ser realizado.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

PINHO, M. P. **Análise do repertório de linfócitos T em pacientes com câncer: desvendando a resposta imune antitumoral em humanos.** 2019. 165 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A tumorigenese é caracterizada pelo acúmulo de mutações e expressão aberrante de proteínas pelas células transformadas, proteínas estas que podem ser reconhecidas pela resposta imune adaptativa do próprio. O estudo do conjunto de linfócitos T capazes de reconhecer o tumor num paciente, ou seja, de seu repertório antitumoral, é de vital importância para o melhor entendimento da relação entre o sistema imune e o câncer. Assim, este projeto teve como objetivo desenvolver um estudo aprofundado do repertório de linfócitos T reativo para tumores em pacientes com câncer, determinando-se a frequência e o padrão de resposta destas células, em diferentes fases de progressão da doença e terapia. Para avaliar a frequência de linfócitos T tumor-reativos, foram desenvolvidas e utilizadas técnicas abrangentes de detecção, que empregam a capacidade proliferativa do linfócito T frente ao seu antígeno cognato para determinar sua especificidade. Utilizando tais técnicas, fomos capazes de encontrar linfócitos T capazes de reagir com antígenos mutados (neoantígenos) em um paciente com carcinoma hepatocelular, e com um antígeno superexpresso (Her2) em pacientes com câncer de mama. Também encontramos linfócitos T reativos para estes antígenos em indivíduos saudáveis, não só no compartimento de células *naïve*, mas também dentre os linfócitos T de memória, o que adiciona evidência à teoria da vigilância imunológica. Vale notar que os linfócitos T Her2-reativos foram capazes de produzir citocinas e eliminar, especificamente, células que superexpressavam tal molécula. A frequência total de linfócitos T tumor-reativos no sangue de pacientes com câncer de mama e com glioblastoma multiforme (GBM) foi estimada utilizando-se, como fonte de antígenos, lisados de células tumorais, tendo, esta, sido maior no sangue dos doentes com câncer de mama. A frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue dos pacientes não se correlacionou com aquela encontrada no tumor, indicando que estas podem diferir significativamente. Mesmo assim, em dois pacientes, a variação temporal da frequência sanguínea de linfócitos T CD4 e CD8 GBM-reativos se correlacionou com a resposta clínica à vacinação experimental com híbridos de células dendríticas. Esta intervenção imune também foi capaz de alterar a capacidade de produção de citocinas pelos linfócitos T CD4 GBM-reativos de um paciente testado. Assim como na vacinação, a retirada cirúrgica do tumor afetou significativamente o repertório de linfócitos T GBM-reativos nos doentes, diminuindo seu número e alterando seu fenótipo. Por fim, dentre os linfócitos T reativos para câncer de mama, fomos capazes de detectar linfócitos T CD8 com possível capacidade supressora e linfócitos T CD4 que apresentavam características pró-tumorais e cujos clones apresentavam subpopulações com fenótipo *helper* distintas. Em conclusão, o estudo da frequência e função dos linfócitos T tumor-reativos aqui mostrado permitiu desvendar características da resposta imune tumoral pouco conhecidas, melhorando o conhecimento que temos da resposta imune antitumoral em humanos.

Palavras-chave: Linfócitos T. Antígenos tumorais. Imunovigilância antitumoral. Imunoterapia. Câncer.

ABSTRACT

PINHO, M. P. **Analysis of the T cell repertoire in cancer patients: unveiling the antitumor immune response in humans.** 2019. 165 p. Ph.D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Tumorigenesis is accompanied by the accumulation of mutations and aberrant expression of various proteins by the transformed cells, which can be recognized by the adaptive immune response in cancer patients. The study of the patient's ability to recognize its tumor, specifically of its antitumor T cell repertoire, is of vital importance for a better understanding of the interplay between the immune system and tumors. Therefore, this project aimed to develop an in-depth study of the tumor-reactive T cell repertoire in cancer patients, determining its frequency and response pattern, at different points of disease progression and therapy. To estimate the frequency of tumor-reactive T lymphocytes, comprehensive detection techniques – that employ the T cell proliferative capacity against its cognate antigen to determine its specificity – were developed. By using such techniques, we could find T cells reactive for mutated antigens (neoantigens) in a patient with hepatocellular carcinoma, and reactive for an overexpressed antigen (Her2) in patients with breast cancer. We also found T lymphocytes reactive for these antigens in healthy individuals, not only in the *naïve* cell compartment, but also among memory T cells, which adds evidence to the theory of immune surveillance. It is noteworthy that Her2-reactive T lymphocytes could produce cytokines and specifically eliminate cells that overexpressed Her2. The total frequency of tumor-reactive T-lymphocytes in the blood of individuals with breast cancer and with glioblastoma multiforme (GBM) was estimated using tumor cell lysates as antigen source, and it was found to be higher in the blood of breast cancer patients. The frequency of tumor-reactive T cells in patients' blood did not correlate with that found among T cells infiltrating the tumor, indicating that these may differ significantly. Even so, in two patients, temporal variation in the blood frequency of GBM-reactive CD4 and CD8 T cells correlated with their clinical response to the experimental vaccination with dendritic-tumor cell hybrids. This immune intervention also changed the cytokine production pattern of GBM-reactive CD4 T lymphocytes in the patient tested. As with vaccination, the surgical removal of the tumor also affected significantly the repertoire of GBM-reactive T lymphocytes in the patients, decreasing their frequency and altering their phenotype. Finally, among the breast cancer-reactive T cells, we detected CD8 T lymphocytes with possible suppressive capacity and CD4 T lymphocytes that had protumoral characteristics and whose clones belonged to multiple distinct subpopulations with different helper phenotypes. Altogether, the results of the frequency and function of the tumor-reactive T lymphocytes shown here unveil some tumor immune response characteristics largely unknown, which improve our understanding of the antitumor immune response in humans.

Keywords: T lymphocytes. Tumor antigens. Antitumor immune surveillance. Immunotherapy. Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação de antígenos tumorais.	27
Figura 2 – Os três E's da progressão tumoral.....	29
Figura 3 – Subtipos de linfócitos T CD4 e seu papel na resposta imune ao câncer	32
Figura 4 – Metodologias para detecção de linfócitos T específicos.....	35
Figura 5 – Pureza de linfócitos T após sorting.	43
Figura 6 – Pureza de linfócitos B após enriquecimento com esferas magnéticas e sorting.	43
Figura 7 – Imagem da cultura de células dendríticas derivadas de monócitos.	44
Figura 8 – Expansão de linfócitos B.....	45
Figura 9 – Crescimento de linfócitos T durante expansão inespecífica.	48
Figura 10 – Titulações de marcadores.	49
Figura 11 – Estratégia de análise de linfócitos T marcados com tetrâmero.....	51
Figura 12 – Estratégia de análise de produção de citocinas.....	52
Figura 13 – Triagem de bibliotecas de linfócitos T CD4 naïve de doadores saudáveis	56
Figura 14 – Triagem de bibliotecas de linfócitos T CD4 de memória de doadores saudáveis.	57
Figura 15 – Análise da biblioteca de linfócitos T CD4 sanguíneos de um paciente com carcinoma hepatocelular	59
Figura 16 – Estimulação ex vivo de linfócitos T CD4 com peptídeos tumorais.	61
Figura 17 – Estimulação ex vivo de linfócitos T CD8 de memória com peptídeos tumorais.	63
Figura 18 – Análise por tetrâmero em amostra de câmara de leucorredução ...	65
Figura 19 – Análise de reatividade com tetrâmeros em doador positivo e negativo para HLA-A2.....	66
Figura 20 – Frequência e MFI de células positivas para o tetrâmero em controles e pacientespos Luminal, Her2 ou Triplo-negativo.....	67
Figura 21 – Estimulação ex vivo de linfócitos T com a proteína recombinante Her2	71

Figura 22 – Frequência de linfócitos T tumores-reativos contra linhagens celulares no sangue de doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	74
Figura 23 – Frequência de linfócitos T reativos a lisados de amostras de tumores ex vivo, no sangue de doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	75
Figura 24 – Frequência de linfócitos T naíve e de memória tumor-reativos no sangue de doadores saudáveis	77
Figura 25 – Frequência de linfócitos T reativos para lisados controle gerado com células do sangue (PBMC) de doadores normais	78
Figura 26 – Linfócitos T reativos ao tumor autólogo de pacientes com câncer de mama no sangue e infiltrando o tumor do paciente.....	79
Figura 27 – Representação do número de linfócitos T reativos para tumores de mama.....	81
Figura 28 – Frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue de controles e pacientes.....	83
Figura 29 –Frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue de pacientes, após a remoção do tumor.....	85
Figura 30 – Gráficos representativos do fenótipo dos linfócitos T específicos para o tetrâmero	95
Figura 31 – Fenótipo naíve/memória das células específicas para o tetrâmero	96
Figura 32 – Expressão de IFN-γ por linfócitos T CD8 Her2-reativos	98
Figura 33 – Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 Her2-reativos.....	99
Figura 34 – Proporção de linfócitos T CD4 Her2-reativos capazes de produzir IFN-γ.	101
Figura 35 – Proporção de linfócitos T CD4 Her2-reativos capazes de produzir IL-17, IL-4 e IL-10.....	102
Figura 36 – Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 reativos para linhagens tumorais de mama.....	104
Figura 37 – Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 reativos para o lisado tumoral autólogo de um paciente	105
Figura 38 – Fenótipo dos linfócitos T CD8 reativos para tumor de mama de um paciente.....	106
Figura 39 – Ensaio de citotoxicidade com linfócitos T CD103 positivos ou negativos.....	108

Figura 40 – Expressão de CD103 por linfócitos T CD8 de pacientes com câncer de mama.....	108
Figura 41 – Proliferação de linfócitos T CD4 na presença de linfócitos T CD8 reativos para câncer de mama	109
Figura 42 – Supressão da proliferação de linfócitos T CD4 por linfócitos T CD8 de um paciente com câncer de mama	110
Figura 43 – Perfil dos linfócitos T CD4 reativos para câncer de mama.....	112
Figura 44 – Padrão Th1/Th17 dentre linfócitos T específicos para câncer de mama	113
Figura 45 – Exemplos de expressão de IFN-γ e IL-17 por clones de linfócitos T obtidos de pacientes com câncer de mama.....	115
Figura 46 – Fenótipo Th1/Th17 de clones de linfócitos T obtidos de pacientes com câncer de mama.....	115
Figura 47 – Análise temporal do fenótipo Th1/Th17 de clones de linfócitos T	116
Figura 49 – Expressão de PD-L1 por células tumorais tratadas com sobrenadante de linfócitos T CD4.....	118
Figura 49 – Correlação entre a presença de neutrófilos infiltrantes do tumor e linfócitos Th1/17	119
Figura 50 – Expressão de CD39 por linfócitos T reativos para tumores de mama	120
Figura 51 – Esquema com as possíveis funções supressoras exercidas por linfócitos Th1/17 em câncer de mama	121
Figura 52 – Perfil dos linfócitos T CD4 GBM-reativos no sangue.....	123
Figura 53 – Perfil geral dos linfócitos T CD4 infiltrando tumores de GBM	124
Figura 54 – Produção de citocinas por linfócitos T sanguíneos de um paciente antes e após remoção do tumor	125
Figura 55 – Perfil dos linfócitos T CD4 GBM-reativos após remoção cirúrgica do tumor	126
Figura 56 – Produção de IFN-γ e IL-17 por linfócitos T CD4 GBM-reativos, antes e após tratamento imunoterapêutico de dois pacientes.....	128
Figura 57 – Perfil dos linfócitos T CD4 GBM-reativos antes e após tratamento imunoterapêutico de um paciente	129
Figura 58 – Produção de IL-10 por linfócitos T CD4 GBM-reativos, antes e após tratamento imunoterapêutico de um paciente	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de antígenos utilizados	46
Tabela 2 – Frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue versus infiltrando o tumor de um paciente.	84
Tabela 3 – Frequência de linfócitos T GBM-reativos antes e após cirurgia no sangue de um paciente.....	85
Tabela 4 – Frequência sanguínea de linfócitos T específicos para diferentes antígenos.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM-V	Meio de imunoterapia adaptativa 5
AIRE	Regulador autoimune
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
BAGE	Antígeno de melanoma B
BCR	Receptor do linfócito B
BRAF-V600E	Mutação da valina 600 do gene BRAF para glutamato
BSA	Albumina bovina do soro
CCR	Receptor de quimiocina C-C
CD	Cluster de diferenciação
cDC	Célula dendrítica convencional
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CMV	Citomegalovírus
CNA	Células não aderente
cpm	Contagem por milhão
CTA	Antígenos câncer-testículo
CTL	Linfócito T citotóxico
CTLA-4	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
CTV	Celltrace™ Violeta
CXCR	Receptor de quimiocina C-X-C
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E75	Peptídeo KIFGSLAFL do Her2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ELISPOT	Ensaio de imunoabsorção enzimática “pontual”
ER	Receptor de Estrógeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMO	Floreência menos um
Foxp3	do inglês, <i>forkhead box P3</i>

FSC	do inglês, <i>forward scatter</i>
GATA-3	Proteína Ligante de GATA 3
GBM	Glioblastoma multiforme
GM-CSF	Fator Estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
gp100	Glicoproteína 100
Her2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HLA	Antígeno leucocitário humano
hTERT	Transcriptase reversa telomerase humana
HPV	Papiloma vírus humano
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
IFN-γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IMDM	do inglês, <i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Influvac	Vacina de influenza
K562	Linhagem de células tumorais de eritroleucemia
MAGE	Antígeno de melanoma M
MCF-7	Linhagem de câncer de mama do subtipo luminal
MDA-MB-231	Linhagem de câncer de mama do subtipo triplo-negativo
Melan-A	Antígeno expresso por melanócitos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
M1	Macrófago do tipo 1
M2	Macrófago do tipo 2
NK	Células natural killers
NY-ESO-1	do inglês, <i>New York esophageal squamous cell carcinoma 1</i>
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PD-1	do inglês, <i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	do inglês, <i>programmed cell death ligand 1</i>
PE	Ficoeritrina
PerCP	do inglês, <i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i>
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
PR	Receptor de progesterona

R-10	RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino
RAS	Proteína cujo o nome deriva de “vírus do sarcoma de rato”
REDOME	Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
SK-BR-3	Linhagem de câncer de mama do subtipo Her2
SNC	Sistema nervoso central
SSC	do inglês, <i>side scatter</i>
STAT	Sinal transdutor e ativador de transcrição
TAA	Antígenos associados a tumores
T-bet	Fator de transcrição associados ao linfócito T
TCR	Receptor de células T
T_{CM}	Linfócito T de memória central
tDC	Célula dendrítica tolerogênica
T_{EM}	Linfócito T de memória efetora
T_{EMRA}	Linfócito T de memória efetora positivo para CD45RA
T_{fh}	Linfócitos T foliculares
TGF-β	do inglês, <i>transforming growth factor beta</i>
Th	Linfócito T helper
T_N	Linfócito T naïve
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo
Treg	Linfócito T regulador
Trp-2	Proteína Relacionada a Tirosinasa 2
TSA	Antígenos específicos de tumores
T-TIL	Linfócitos T infiltrantes do tumor
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 <i>O câncer de mama</i>	<i>22</i>
1.2 <i>O glioblastoma multiforme.....</i>	<i>23</i>
1.3 <i>O sistema imune, o repertório de linfócitos T e o câncer</i>	<i>24</i>
1.4 <i>Antígenos tumorais e seu reconhecimento por linfócitos T.....</i>	<i>26</i>
1.5 <i>Interações entre o sistema imune e o câncer.....</i>	<i>28</i>
1.6 <i>Subtipos de linfócitos T e seu papel na resposta ao câncer</i>	<i>30</i>
1.7 <i>Importância da análise da resposta imune ao câncer</i>	<i>33</i>
2 OBJETIVOS	37
2.1 <i>Objetivos específicos</i>	<i>37</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 <i>Coleta de amostras de sangue e tumor</i>	<i>39</i>
3.2 <i>Obtenção de soro humano e preparação de meio de cultura completo</i>	<i>39</i>
3.3 <i>Cultura das células de linhagens utilizadas</i>	<i>40</i>
3.4 <i>Digestão tumoral e isolamento de linfócitos T infiltrantes (T-TIL)</i>	<i>40</i>
3.5 <i>Preparação de lisados tumorais.....</i>	<i>41</i>
3.6 <i>Processamento do sangue e separação de PBMC.....</i>	<i>41</i>
3.7 <i>Purificação de monócitos, linfócitos T e linfócitos B do sangue</i>	<i>41</i>
3.8 <i>Diferenciação in vitro de DC a partir de monócitos do sangue periférico.</i>	<i>44</i>
3.9 <i>Expansão de linfócitos B</i>	<i>44</i>
3.10 <i>Ensaio de proliferação ex vivo de linfócitos T</i>	<i>45</i>
3.11 <i>Montagem e triagem de bibliotecas de linfócitos T</i>	<i>47</i>
3.12 <i>Expansão e clonagem de linfócitos T tumor-reativos</i>	<i>48</i>
3.13 <i>Marcação extracelular e análise fenotípica por citometria de fluxo.....</i>	<i>49</i>
3.14 <i>Marcação de linfócitos T com tetrâmeros específicos para Her2</i>	<i>50</i>
3.15 <i>Marcação intracelular para análise de citocinas.....</i>	<i>51</i>
3.16 <i>Ensaio de citotoxicidade de linfócitos T CD8.....</i>	<i>52</i>
3.17 <i>Ensaio de supressão de linfoproliferação</i>	<i>53</i>
3.18 <i>Ensaio de expressão de PD-L1 por células tumorais.....</i>	<i>53</i>
3.19 <i>Depleção de IFN-γ no sobrenadante de cultura de linfócitos T.....</i>	<i>54</i>
3.20 <i>Análise estatística.....</i>	<i>54</i>

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Resposta contra neoantígenos de carcinoma hepatocelular	55
4.1.1 Triagem de bibliotecas de linfócitos T CD4 com neoantígenos	55
4.1.2 Estimulação ex vivo de linfócitos T CD4 e CD8 com neoantígenos	60
4.2 Frequência dos linfócitos T reativos para Her2	64
4.2.1 Marcação de linfócitos T CD8 com multímeros carregando Her2	64
4.2.2 Estimulação ex vivo de linfócitos T CD4 e CD8 com Her2 recombinante.....	69
4.3 Frequência de linfócitos T reativos para tumores de mama.....	72
4.3.1 Comparação entre lisados de células de linhagens e amostras primárias ...	72
4.3.2 Linfócitos T de memória reativos para tumores em doadores saudáveis	76
4.3.3 Linfócitos T reativos para o tumor do próprio paciente	78
4.4 Frequência de linfócitos T reativos para glioblastoma multiforme.....	82
4.4.1 Frequência de linfócitos T reativos para GBM.....	82
4.4.2 Evolução da frequência de linfócitos T reativos para GBM	84
4.5 Comparação entre as frequências de linfócitos T reativos encontradas ..	88
4.5.1 Frequência de linfócitos T tumor-reativos utilizando diferentes técnicas	89
4.5.2 Frequência de linfócitos reativos para diferentes antígenos tumorais	90
4.5.3 Frequência de linfócitos tumor-reativos entre diferentes tipos tumorais	92
4.6 Fenótipo funcional dos linfócitos T reativos para Her2	94
4.6.1 Fenótipo naíve/memória de linfócitos T CD8 tetrâmero-positivos	94
4.6.2 Função dos linfócitos T CD8 reativos para Her2	97
4.6.3 Padrão de secreção de citocinas por linfócitos T CD4 Her2-reativos	101
4.7 Características dos linfócitos T CD8 reativos para tumores de mama	103
4.7.1 Capacidade citotóxica de linfócitos T CD8 reativos para câncer de mama	103
4.7.2 Possível viés supressor de células T CD8 reativas para câncer de mama	107
4.8 Função dos linfócitos T CD4 reativos para tumores de mama.....	111
4.8.1 Secreção de citocinas por células T CD4 reativas para câncer de mama ..	111
4.8.2 Perfil helper de clones de linfócitos T reativos para câncer de mama	114
4.8.3 Possível função supressora de linfócitos T reativos para câncer de mama	117
4.9 Citocinas produzidas por linfócitos T CD4 reativos para glioblastoma ..	122
4.9.1 Padrão de produção de citocinas por linfócitos T GBM-reativos	122
4.9.2 Mudança no perfil de linfócitos T após procedimento cirúrgico	125
4.9.3 Efeito do tratamento vacinal na função dos linfócitos T GBM-reativos.....	127
5 CONCLUSÕES.....	131
REFERÊNCIAS¹	133

APÊNDICE A – Capacidade linfoestimuladora de diferentes APC	146
APÊNDICE B – Ativação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4.....	155

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença gerada por alterações nas células do próprio indivíduo, que afeta uma grande parcela da população mundial. Segundo estimativas do INCA do biênio de 2018/2019, só em 2018 seriam diagnosticados mais de meio milhão de novos casos de câncer no Brasil (INCA, 2017). O tratamento do câncer encontra-se fundamentado em três grandes pilares: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Estas áreas estão em constante progresso, com avanços recentes significativos, com o advento de cirurgias cada vez menos invasivas (ACHER et al., 2018), a utilização de radioterapia localizada (GARIBALDI et al., 2017), e o direcionamento dos agentes quimioterápicos (QIN; ZHANG; ZHANG, 2018). Porém, mesmo com todos os tratamentos disponíveis, o câncer continua levando a um número elevado de óbitos, com 9,6 milhões de mortes estimadas em 2018 (BRAY et al., 2018). Nesse contexto, novas abordagens preventivas e terapêuticas mostram-se necessárias e vem sendo desenvolvidas, estando a imunoterapia entre aquelas com maior destaque (COUZIN-FRANKEL, 2013). Por estar cada dia mais presente no leito dos pacientes (BAXEVANIS; PEREZ; PAPAMICHAIL, 2009; FINKELSTEIN, 2013), a imunoterapia é considerada, hoje, como o quarto pilar no tratamento do câncer. Este tratamento visa utilizar componentes do sistema imune para combater a doença e, em geral, procura ativar no paciente com câncer, mecanismos imunológicos que se mostram efetivos em diferentes situações. Sendo assim, esforços no sentido de buscar um maior entendimento sobre a resposta imune específica para tumores são necessários para o desenvolvimento direcionado e racional de novas abordagens imunoterapêuticas.

1.1 O câncer de mama

O câncer de mama é o tipo tumoral com maior incidência entre as mulheres (INCA, 2017), sendo estimado que uma em cada oito mulheres norte americanas desenvolverão câncer de mama durante o curso de sua vida (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Histologicamente, o câncer de mama pode ser dividido em diferentes tipos, sendo o carcinoma ductal invasivo, com cerca de 70% dos casos, o de maior incidência (LI et al., 2003), e um dos focos do presente estudo. O câncer de mama também pode ser classificado de acordo com seu perfil molecular. Três subtipos principais, com alta relevância clínica, são definidos a partir do padrão de

expressão de três proteínas cuja análise já foi incorporada à rotina clínica: o receptor de estrógeno (ER), o receptor de progesterona (PR) e o Her2 (do inglês “*Human epidermal growth factor receptor 2*”) (WITHERBY et al., 2016). O subtipo luminal é caracterizado pela expressão dos receptores hormonais ER e PE, enquanto o subtipo Her2 ocorre quando a proteína Her2, localizada na membrana das células tumorais, aparece em excesso. O terceiro e último subtipo, denominado triplo-negativo, é caracterizado pela ausência de expressão das três moléculas. Além do valor prognóstico, sendo o luminal o subtipo menos agressivo, o subtipo molecular também é decisivo para determinar o tratamento a ser utilizado (WITHERBY et al., 2016). Tumores com expressão dos receptores hormonais podem ser tratados com terapia hormonal, enquanto aqueles com superexpressão de Her2 apresentam, como opção de tratamento, a molécula inibidora Lapatinibe e o anticorpo monoclonal Trastuzumab capazes de afetar sinalização via Her2. Por não apresentar um alvo específico, o subtipo triplo-negativo carece de opções alvo-específicas de tratamento.

Os cultivos a longo prazo de células tumorais isoladas de pacientes com câncer geraram o que hoje chamamos de linhagens tumorais imortalizadas. As linhagens imortalizadas são ferramentas importantes para o estudo do câncer, e até mesmo para formulação de vacinas, devido a sua capacidade de replicar-se indefinidamente, e de manter muitas das características das células tumorais originais (SRIVATSAN et al., 2014). As linhagens de câncer de mama também podem ser divididas nos mesmos subtipos encontrados nos pacientes e, as linhagens MCF-7, SK-BR-3, e MDA-MB-231 utilizadas aqui, são dos subtipos luminal, Her2 e triplo-negativo, respectivamente (DAI et al., 2017). Esta existência de subtipos bem definidos, que apresentam prognósticos, manifestações e tratamentos diferentes, representados por linhagens imortalizadas que mantem muitas das características dos tumores encontrados nos pacientes fazem do câncer de mama um modelo muito interessante para o estudo amplo da resposta imune contra tumores.

1.2 O glioblastoma multiforme

Gliomas são as neoplasias mais frequentes que acometem o sistema nervoso central (SNC), representando 80% de todos os tumores cerebrais (HANIF et al., 2017). Estes podem ser classificados de I a IV, a depender do seu grau de malignidade, sendo o grau IV, conhecido como glioblastoma multiforme (GBM), o mais agressivo e

frequente, correspondendo a aproximadamente 50% de todos os gliomas. O GBM pode surgir diretamente de mutações em células gliais, ou da progressão de astrocitomas (gliomas de menor grau) pré-existentes (LOUIS et al., 2016). O GBM é, atualmente, dividido em quatro subtipos principais de acordo com sua característica transcricional: clássico, pró-neural, neural e mesenquimal. Estudos recentes sugerem, porém, que o subtipo neural possa ser um artefato gerado pela presença de RNA de células não-tumorais nas amostras analisadas (SIDAWAY, 2017). Apesar do potencial valor prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento, ao contrário do câncer de mama, a classificação molecular do GBM ainda não se traduziu em indicações de conduta clínica indiscutíveis (PAOLILLO; BOSELLI; SCHINELLI, 2018).

Mesmo com os avanços terapêuticos, o GBM permanece largamente incurável, com uma taxa de sobrevida mediana de menos de 15 meses (FERNANDES et al., 2017). A ausência de sucesso no tratamento desta doença se deve, em grande parte, aos inúmeros desafios impostos por estes tumores: além de sua localização (que dificulta a ressecção completa do tumor e restringe a chegada de medicamentos devido a barreira hematoencefálica) (KESARI, 2011; SMINIA; WESTERMAN, 2016; YONG; LONER, 2011), o GBM apresenta uma grande heterogeneidade intra e intertumoral, além de um microambiente largamente imunossupressor (NDUOM; WELLER; HEIMBERGER, 2015; PERRIN et al., 2019). Assim sendo, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o GBM é urgentemente necessário.

1.3 O sistema imune, o repertório de linfócitos T e o câncer

O sistema imune é um sistema de reconhecimento, com uma capacidade única de identificação de moléculas. Essa capacidade de “reconhecimento específico” caracteriza o que se convencionou chamar de “imunidade adaptativa”. A imunidade adaptativa depende dos linfócitos T e B, que contêm receptores com características únicas na natureza. O receptor do linfócito T (TCR, do inglês “*T cell receptor*”) e o receptor do linfócito B (BCR, do inglês “*B cell receptor*”) são receptores altamente variáveis, formados a partir de rearranjo gênico, e que recebem o nome de receptores clonais, devido a sua distribuição celular (TONEGAWA, 1983). Todas as moléculas de TCR presentes em um único linfócito T são idênticas, mas as moléculas de TCR de linfócitos T distintos são diferentes, pois cada precursor de linfócito T rearranja o

gene do TCR de forma única, dando origem a uma molécula de TCR com uma especificidade singular. A especificidade do linfócito T só é compartilhada por seu clone, ou seja, por linfócitos T que tenham sido gerados a partir da duplicação da mesma célula. Assim, o conjunto de linfócitos T de um indivíduo – o seu repertório - é capaz de reconhecer um número muito elevado de moléculas diferentes, denominadas antígenos.

Por ser formado a partir de rearranjo, a sequência gênica do TCR é diferente em cada clone. Assim, com o advento de técnicas de sequenciamento de DNA, a análise destas sequências se tornou possível. Este tipo de estudo é frequentemente chamado de estudo de repertório de receptores de linfócitos T (TCR), uma vez que são analisadas as sequências gênicas de um grande conjunto de receptores. Porém, infelizmente, ainda não somos capazes de determinar, a partir da sequência gênica do TCR, o antígeno reconhecido por esta molécula, nem a consequência deste reconhecimento pelo linfócito. Assim, os estudos de sequenciamento de TCR ainda se restringem a avaliação de diversidade e frequência de clones presentes em um conjunto de linfócitos T, ao longo do tempo e/ou em diferentes tecidos. O estudo do conjunto de sequência de TCR presente em um grupo de linfócitos T (análise de repertório dos receptores de linfócitos T), não deve, porém, ser confundido com a análise de repertório de linfócitos T. O estudo do repertório imune, por assim dizer, vai além da análise das sequências dos TCR, podendo englobar diversas análises a serem realizadas em um conjunto de linfócitos T, cujo objetivo seja o melhor entendimento da resposta imune gerada por estes (CORTI; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2011).

O estudo do repertório imune se torna mais complexo a cada dia, com o advento de novas tecnologias que permitem análises até então impossíveis, que tem permitido um rápido avanço no entendimento do funcionamento da resposta imune adaptativa. Neste contexto, o estudo do repertório de linfócitos T capazes de reconhecer tumores se destaca, tanto por suas nuances, uma vez que se trata de resposta a antígenos com grande similaridade a antígenos presentes no próprio indivíduo saudável, quanto por seu grande potencial de tradução clínica.

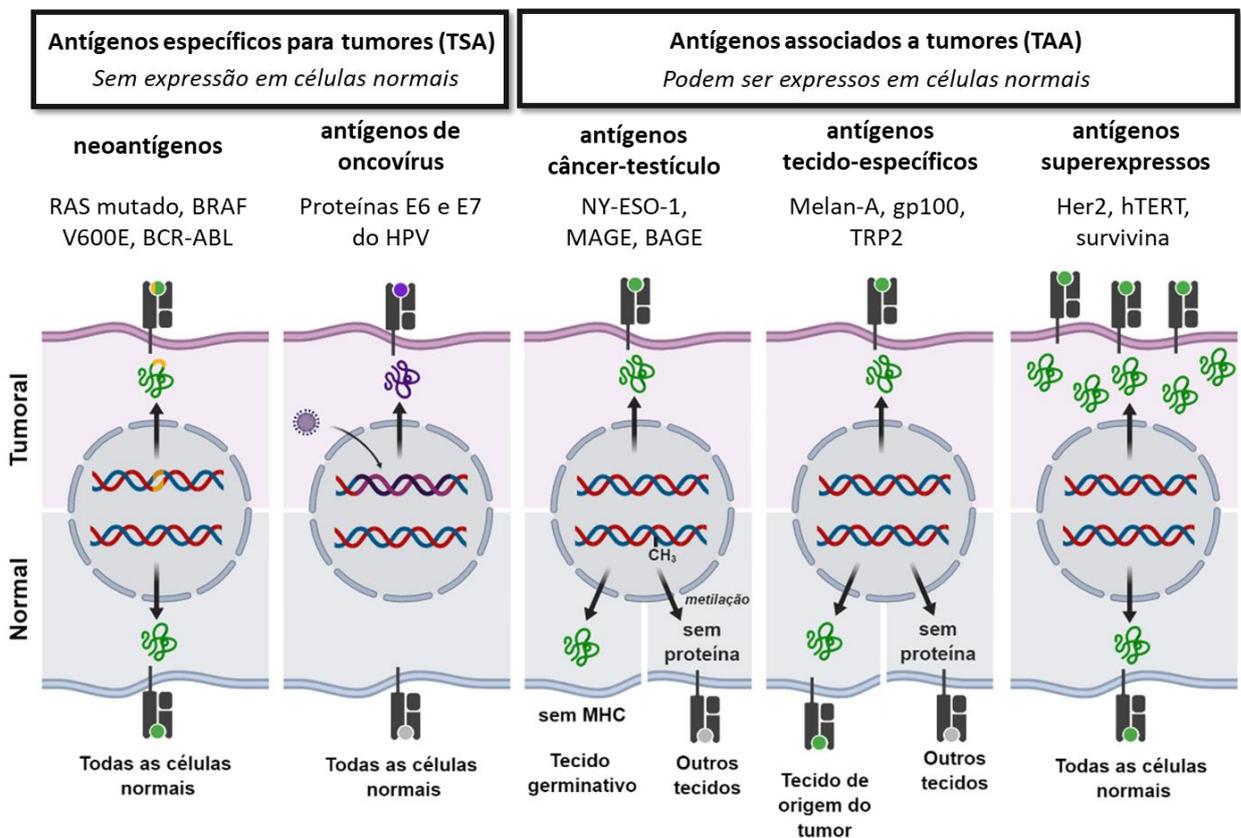
1.4 Antígenos tumorais e seu reconhecimento por linfócitos T

Por meio do TCR, os linfócitos T reconhecem fragmentos peptídicos de proteínas que sejam apresentados no contexto das moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês “major histocompatibility complex”). Para que os linfócitos T sejam capazes de reconhecer células tumorais, portanto, estas precisam conter peptídeos que possam ser reconhecidos por linfócitos T. Apesar da capacidade, teórica, de reconhecer qualquer proteína, o repertório de linfócitos T de um indivíduo é considerado incompleto. Isto ocorre porque, durante o desenvolvimento dos linfócitos T, estes passam por um processo chamado de tolerância central, em que células que expressarem um TCR capaz de reconhecer peptídeos derivados de proteínas próprias com alta afinidade acabam sendo eliminados ou se diferenciando em linfócitos T reguladores (ITOH et al., 1999; KAPPLER; ROEHM; MARRACK, 1987; XING; HOGQUIST, 2012). Sendo assim, a capacidade do sistema de gerar uma resposta efetora de alta afinidade contra proteínas próprias é reduzida, o que é desejável para evitar que doenças autoimunes sejam desencadeadas. Logo, células tumorais, que são geradas a partir de modificações de células próprias, deveriam apresentar uma baixa imunogenicidade, devido ao processo de seleção do repertório. De fato, em camundongos, o bloqueio transitório da tolerância central é capaz de aumentar a quantidade de linfócitos T antitumorais (KHAN et al., 2014); e camundongos com deficiência do fator de transcrição AIRE, responsável pela expressão de proteínas próprias no timo durante o processo de seleção do repertório, mostraram-se capazes de rejeitar células de melanoma singeneico (ZHU; NAGAVALLI; SU, 2013).

Porém, antes mesmo que os linfócitos T com alta afinidade para antígenos próprios sejam eliminados, o repertório de linfócitos T é selecionado positivamente pela interação de baixa afinidade de seu TCR com as moléculas de MHC (apresentando antígenos próprios) (JAMESON; HOGQUIST; BEVAN, 1995). Portanto, os linfócitos T que fazem parte do repertório de linfócitos T maduros apresentam uma capacidade inata de reconhecer, com baixa afinidade, moléculas de MHC carregadas com proteínas próprias. Assim, não é surpreendente que seja possível encontrar linfócitos T específicos para determinadas proteínas próprias, que embora não exclusivas das células neoplásicas, são classificadas como antígenos associados ao tumor (TAA; do inglês, “*tumor associated antigens*”) (Figura 1). Por

exemplo, linfócitos T CD8 específicos para Melan-A, que é uma proteína própria expressa em melanócitos e em células tumorais de melanoma, assim como linfócitos T CD4 Melan-A-específicos, podem ser encontrados em alguns pacientes com melanoma, e até mesmo em alguns indivíduos normais (BIOLEY et al., 2006; LEE et al., 1999b; PITTET et al., 1999).

Figura 1 – Classificação de antígenos tumorais. Classes de antígenos tumorais considerados específicos (TSA) e associados (TAA) a tumores, com exemplos de membros de cada classe, e esquema do padrão de expressão nas células tumorais comparado com a expressão em tecidos normais de indivíduos saudáveis. *Criado com BioRender.com.*



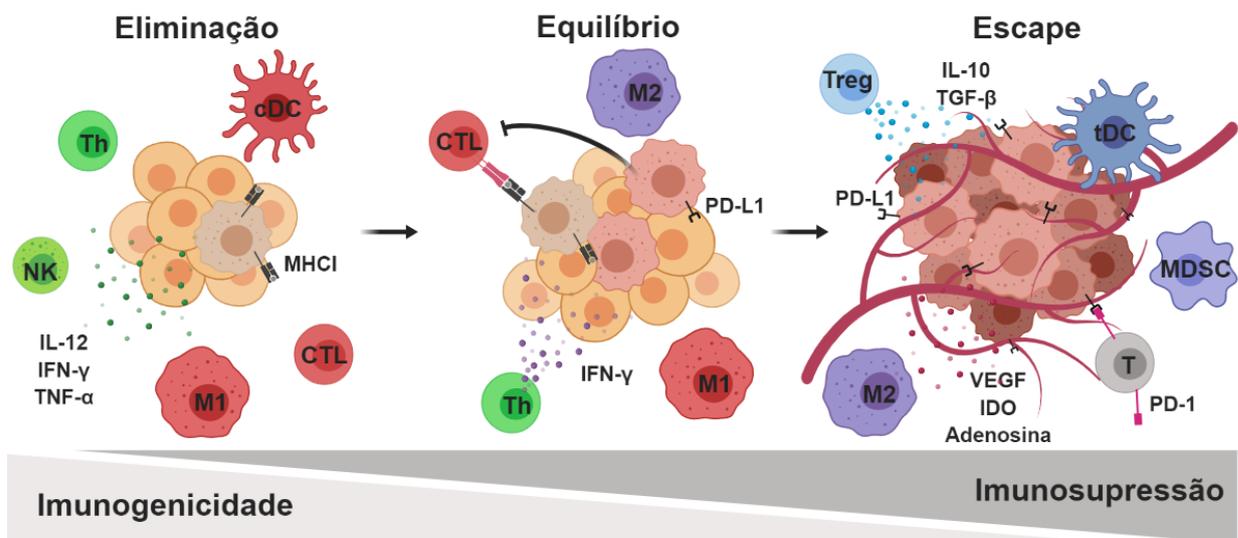
Já foram encontrados em pacientes com câncer linfócitos T específicos para diversos TAA. Alguns TAA são proteínas cuja expressão é aumentada no tumor, outros são proteínas cuja expressão é típica em células germinativas e outros ainda, restritos a um determinado tecido. Além dos antígenos associados a tumores, existem também antígenos que são encontrados apenas nos tumores (TSA; do inglês, “*tumor specific antigens*”) (Figura 1). O TCR expresso por um linfoma de células T foi um dos primeiros TSA descritos, o que, inclusive, ajudou na caracterização posterior do, até então desconhecido, receptor específico do linfócito T (ALLISON; MCINTYRE;

BLOCH, 1982). Antígenos de vírus presentes em tumores associados a infecções virais são classificados, em geral, como TSA – embora, neste caso, a definição de “especificidade tumoral” seja falha e a melhor descrição talvez fosse de “antígenos virais associados a tumor”. Por outro lado, o processo de tumorigênese é caracterizado por um acúmulo de mutações nas células transformadas (BOZIC et al., 2010; LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003). As proteínas mutadas muitas vezes são capazes de gerar peptídeos diferentes que podem ser reconhecidos com alta afinidade por linfócitos T, o que permite que tais proteínas sejam chamadas de “neoantígenos tumorais”. A simples capacidade de ser reconhecido pelo sistema, todavia, não garante que uma resposta imune com relevância clínica possa ser montada contra estes antígenos.

1.5 Interações entre o sistema imune e o câncer

A ideia de que células tumorais poderiam ser reconhecidas e eliminadas pelo sistema imune surgiu com a teoria da vigilância imunológica (BURNET, 1961; EHRLICH, 1909). Segundo a teoria, o sistema imune estaria constantemente eliminando células que estivessem sofrendo o processo de transformação maligna, protegendo o indivíduo da doença. No paciente que desenvolve a doença clinicamente, o que ocorreria seria um “escape” à vigilância, pela seleção de células mais agressivas (BURNET, 1970). Embora contestada logo após sua proposição, estudos em camundongos imunodeficientes acabaram por demonstrar, inequivocamente, que o sistema imune, de fato, exerce pressão seletiva durante a tumorigênese e que tumores que se desenvolvem em animais imunodeficientes são rapidamente eliminados em animais imunocompetentes (DUNN et al., 2002). Esta capacidade de imunovigilância é bastante suportada por outros dados experimentais (KOEDEL et al., 2007; SMYTH; DUNN; SCHREIBER, 2006), e implica que tumores que se desenvolvem dependem de células “sobreviventes”, que estabeleceriam um equilíbrio com o sistema imune que, eventualmente, escapam e dão origem a uma doença progressiva (Figura 2). Além dos dados experimentais, evidências de que tal proteção imune existe incluem, mas não se restringem, à maior incidência de câncer em indivíduos com imunodeficiência (ENGELS et al., 2008) e a presença de inúmeros mecanismos de escape do sistema imune nas células tumorais humanas (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Figura 2 – Os três E’s da progressão tumoral. Esquema indicando as diferentes formas de interação entre o sistema imune e células neoplásicas. Na primeira, ocorre a eliminação das células tumorais por meio de células com capacidade antitumoral, num processo chamado de Imunovigilância Tumoral. A fase de equilíbrio é aquela em que se acredita que a imunoeedição tumoral seja mais relevante. Nesta etapa ocorre a eliminação de determinadas células tumorais pelo sistema imune, e a seleção de clones mais resistentes. Assim, os tumores passam a conter cada vez mais células resistentes ao sistema imune, as quais, frequentemente, ainda apresentam capacidades imunossupressoras, até que escapam dos mecanismos efetores da resposta imune, gerando uma doença progressiva. *Criado com BioRender.com.*



Assim, durante a progressão do tumor, aconteceria o que é chamado de imunoeedição: a pressão exercida pela resposta imune faria uma seleção de clones capazes de escapar dos mecanismos efetores da resposta imune, ou até mesmo subvertê-la a seu favor (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Células tumorais são capazes de utilizar uma variedade de mecanismos de evasão do sistema imune, muitos dos quais são mecanismos ativados para limitar a resposta imune em condições fisiológicas (TING KOH; LUZ GARCÍA-HERNÁNDEZ; MARTIN KAST, 2006). Um exemplo de mecanismo de evasão bastante conhecido e relevante para a prática clínica é a expressão da molécula PD-L1 (do inglês “*programmed cell death ligand 1*”) por células tumorais. A expressão de PD-L1 por células tumorais pode ser induzida pelo IFN-γ produzido pelos linfócitos T presentes no microambiente tumoral, um processo que já foi descrito tanto no câncer de mama quanto no GBM (ALI et al., 2015; CASTRO et al., 2018; QIAN et al., 2018). Outra via de imunossupressão existente, mas menos conhecida, é composta pelas ectonucleotidases CD39 e CD73, presentes na superfície celular, e que são capazes de clivar o ATP extracelular em

adenosina, que, por sua vez, é capaz de exercer diferentes funções supressoras (ANTONIOLI et al., 2013; DEAGLIO et al., 2007).

Um número crescente de estudos indica que o sistema imune é capaz de alterar, positiva e negativamente, o crescimento tumoral. Os diferentes tipos de células imunes que compõem o microambiente tumoral são responsáveis por modular a doença, e modificar o balanço entre as atividades pró- e antitumoral do sistema (BURKHOLDER et al., 2014). Linfócitos T, quando ativados, são capazes de se diferenciar em subtipos com funções efetoras distintas (PATENTE et al., 2019). O papel relativo de cada subpopulação de linfócitos T na resposta imune contra o câncer, porém, ainda é, em grande parte, desconhecido como se verá a seguir.

1.6 Subtipos de linfócitos T e seu papel na resposta ao câncer

Quando ativados, linfócitos T CD8 podem adquirir capacidade citotóxica, tornando-se linfócitos T citotóxicos (CTL). A estas células é atribuído grande potencial antitumoral, uma vez que elas podem induzir, diretamente, a morte das células tumorais (MAHER; DAVIES, 2004). Outros mecanismos de ação, como a produção de IFN- γ por essas células, também se mostraram importantes no combate ao câncer, sendo, em alguns casos, até mais importantes do que a citotoxicidade mediada pelas CTL (BARTH JR. et al., 1991; QIN et al., 2003). Porém, linfócitos T CD8 nem sempre apresentam capacidade antitumoral, podendo até apresentar características supressoras, ainda muito negligenciadas (WALLER et al., 2006). De fato, vários trabalhos reportam não haver correlação entre a presença de linfócitos T CD8, capazes de reconhecer o tumor e a resposta clínica obtida após imunoterapia (LEE et al., 1999a; NIELSEN; MARINCOLA, 2000).

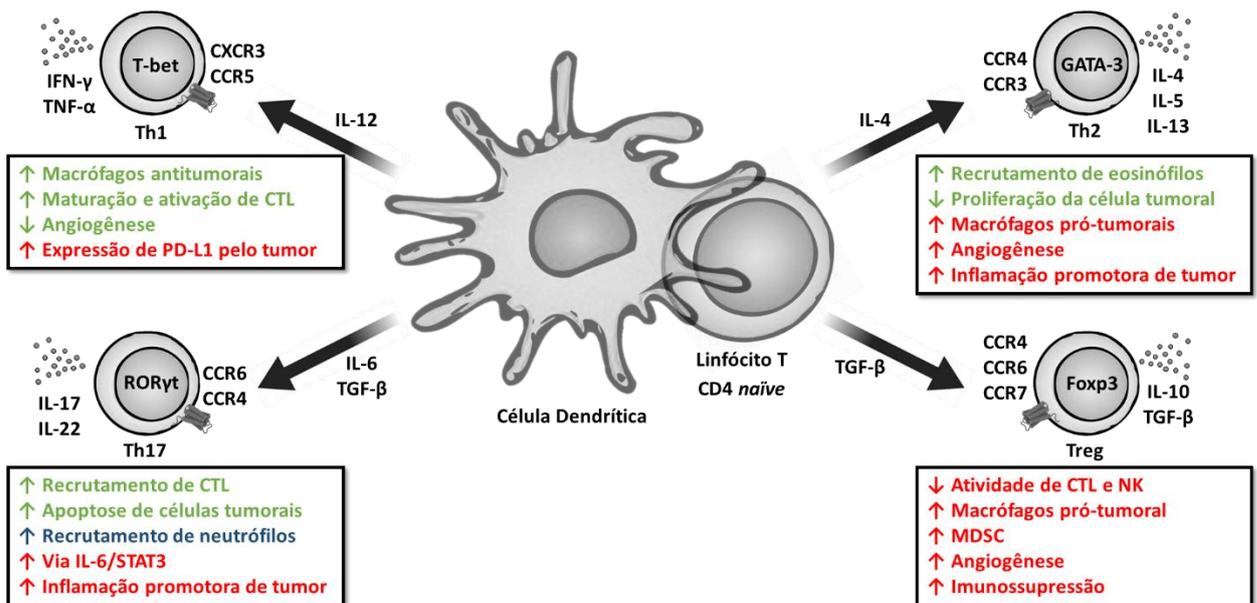
Em camundongos, por exemplo, a resposta protetora obtida utilizando imunização com híbridos de células dendríticas e células tumorais ocorre, pelo menos em parte, devido à ativação de linfócitos T CD4 por essas células (Tanaka et al., 2005; Koido et al., 2014). Curiosamente, todavia, o papel dos linfócitos T CD4 no controle do câncer é muito menos conhecido. Sabe-se que esses linfócitos são necessários para a correta ativação dos linfócitos T citotóxicos (CHURCH et al., 2014), mas sua contribuição para a resposta antitumoral vai, muito provavelmente, além dos mecanismos ligados à ativação de uma resposta citotóxica (GERLONI; ZANETTI, 2005).

Os linfócitos T CD4 são, em geral, os responsáveis por coordenar a resposta imunológica em sua atividade como linfócitos T *helper* (Th) (STEINMAN, 2003). Esses linfócitos T são capazes de se diferenciar em subtipos com funções efetoras distintas e que podem ser caracterizados pela expressão diferencial tanto de fatores de transcrição, quanto de receptores de quimiocinas (ZIELINSKI et al., 2011). Sua diferenciação depende, fortemente, do microambiente em que são ativados e, mais especificamente, das citocinas nele encontradas (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Uma das principais fontes das citocinas que determinam o padrão de resposta dos linfócitos T são as células dendríticas (DC) (DE SAINT-VIS et al., 1998). As DC são células apresentadoras de antígenos, que apresentam uma capacidade única de ativar linfócitos T *naïve* e, portanto, iniciar uma resposta imune primária (STEINMAN; NUSSENZWEIG, 1980).

Quando produzem grandes quantidades de TGF- β , as DC induzem, preferencialmente, a diferenciação dos linfócitos T em células reguladoras (Treg), que se caracterizam pela expressão elevada do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25), baixa expressão de CD127, e a presença do fator de transcrição Foxp3 (MALDONADO; VON ANDRIAN, 2010). Não só as citocinas oferecem um papel importante nesta diferenciação, mas outras moléculas expressas pelas células dendríticas também tem se mostrado determinantes para este processo. É o caso, por exemplo, da expressão de Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) pelas células dendríticas, o que as torna capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T *naïve* em Treg (RODRIGUES et al., 2016).

Quando se consideram os linfócitos T CD4 “efetores”, três diferentes subtipos de linfócitos T *helper* podem ser destacados: linfócitos Th1, cuja diferenciação depende de IL-12, e que são caracterizados pela expressão de T-bet, produção de IFN- γ e expressão dos receptores de quimiocina CCR5 e CXCR3; linfócitos Th2, induzidos por IL-4 e caracterizados pela expressão de GATA-3, produção de IL-4 e expressão dos receptores CCR4 e CCR3; e linfócitos Th17, diferenciados, em camundongos, na presença de IL-6 e TGF- β e caracterizados pela expressão de ROR γ t, produção de IL-17 e IL-22 e expressão de CCR6 (KAPSENBERG, 2003; PATENTE et al., 2019; ZIELINSKI et al., 2011) (Figura 3). Além destes, diversos outros subtipos de linfócitos Th já foram descritos, como os Th22, Th9 e os linfócitos T *helper* foliculares (Tfh), todos estes capazes de exercer papéis distintos na resposta contra o câncer (LIUDAHL; COUSSENS, 2018).

Figura 3 – Subtipos de linfócitos T CD4 e seu papel na resposta imune ao câncer. Linfócitos T CD4, dependendo do estímulo que recebem durante sua ativação inicial, podem se diferenciar em células *helper* com características diferentes, que expressam fatores de transcrição, citocinas, e receptores de quimiocinas distintos. Todos estes linfócitos T apresentam papéis na resposta contra o câncer. Porém, cada subtipo pode exercer funções diversas, ou até mesmo antagônicas na resposta imune ao câncer, tornando-se pró- ou antitumoral a depender do microambiente onde estão inseridos.



Diversos estudos mostram que os linfócitos T CD4 são capazes, por si só, de proteger o indivíduo do desafio com células tumorais e, também, induzir a regressão de cânceres sólidos e hematológicos (COHEN et al., 2000; FUJIWARA et al., 1984; GREENBERG; KERN; CHEEVER, 1985). Porém, subtipos de linfócitos T CD4 podem apresentar papéis anti e pró-tumorais distintos, sendo ainda muito discutido qual seria o subtipo ideal quando se pretende induzir uma resposta contra o câncer (Figura 3). Classicamente, linfócitos Th1 são classificados como tendo maior capacidade antitumoral, enquanto linfócitos Th2 apresentariam um viés pró-tumoral (LIUDAHL; COUSSENS, 2018). Porém, curiosamente, apesar da visão usual de que se tratam de células com funções antagônicas, tanto linfócitos Th1 quanto Th2 podem orquestrar respostas antitumorais capazes de erradicar o tumor (NISHIMURA et al., 1999). Apesar disto, os linfócitos Th17, na verdade, são o subtipo com o papel mais controverso na resposta imune contra o câncer, já tendo sido descritos como tendo papéis tanto anti quanto pró-tumoral, dependendo da neoplasia e modelo estudado (BAILEY et al., 2014; WILKE et al., 2011; YOUNG, 2016). Intrigantemente, um estudo que comparou diretamente o papel dos diferentes subtipos de linfócitos Th contra um

mesmo antígeno tumoral mostrou que, no modelo estudado, os linfócitos Th17 foram os mais eficientes no combate ao câncer, num processo criticamente dependente da produção de IFN- γ (MURANSKI et al., 2008). Pode parecer estranho que a ação efetora de células Th17 seja devida à produção de IFN- γ , uma citocina característica da resposta Th1; na verdade, um crescente número de dados tem mostrado a existência, em humanos, de linfócitos T *helper* capazes de produzir as duas citocinas IL-17 e IFN- γ (ANNUNZIATO et al., 2007). Estas células, às vezes denominadas de Th1/Th17 ou Th1*, são caracterizadas pela expressão de ambos CXCR3 (expresso em linfócitos Th1) e CCR6 (expresso em linfócitos Th2), e parecem estar relacionadas a resposta contra a *Mycobacterium tuberculosis* (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007). Seu papel na resposta antitumoral, porém, ainda é pouco estudado.

1.7 Importância da análise da resposta imune ao câncer

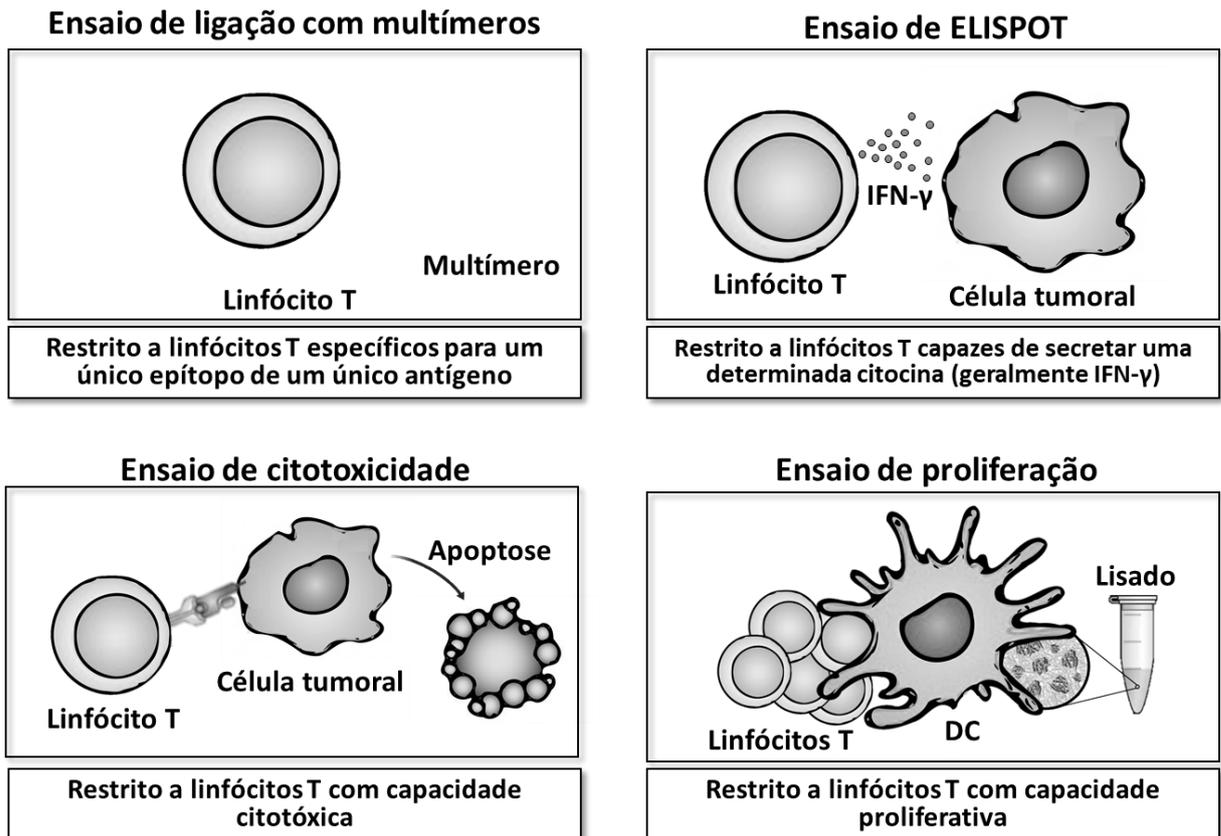
Como mencionado acima, muitos estudos apontam para o fato de que os componentes da resposta imune adaptativa são capazes de reconhecer e eliminar especificamente células tumorais. Por outro lado, quando se tenta recrutar o sistema imune contra o câncer, em protocolos de imunoterapia ativa (ou mesmo passiva), os mecanismos que atuam e contribuem, efetivamente, para o controle da doença nos pacientes com câncer ainda são imprecisamente conhecidos. Isto dificulta o aperfeiçoamento destes protocolos e se reflete na heterogeneidade das respostas entre os pacientes, apesar de se observarem, muitas vezes, melhora significativa no quadro clínico da doença (DRAUBE et al., 2011; STRIOGA et al., 2013).

No geral, parece consensual na literatura que a presença de antígenos tumorais reconhecíveis pela resposta imune do paciente está associada a boas respostas clínicas à imunoterapia. Este é o caso da associação entre e a carga mutacional de diversos tipos tumorais específicos e a melhor resposta ao tratamento com inibidores de *checkpoints*, como os anticorpos específicos para CTLA-4 (do inglês “*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*”), PD-1 (do inglês “*programmed cell death protein 1*”) e seu ligante PD-L1 (GIBNEY; WEINER; ATKINS, 2016); ou a correlação entre maior eficácia da imunoterapia com linfócitos infiltrantes do tumor (T-TIL; do inglês “*tumor-infiltrating lymphocytes*”) com a frequência de células tumor-específicas entre as mesmas (LU et al., 2014).

Apesar de sua importância indiscutível, o rastreamento da resposta imune de linfócitos T antitumorais apresenta um desafio considerável, especialmente no que diz respeito a uma avaliação ampla do repertório capaz de reagir contra tumores. A maioria dos trabalhos que analisam a presença e frequência de linfócitos T específicos para o câncer utiliza múltiplos de MHC. Esses múltiplos são compostos por moléculas de MHC conjugadas a fluorocromos e carregadas com peptídeos que, quando em contato com linfócitos T, se ligam nos linfócitos cujos TCRs sejam restritos pela molécula de MHC utilizada no múltiplo, e específicos para o peptídeo ligado nessas moléculas (BAKKER; SCHUMACHER, 2005). Logo, a identificação de linfócitos T específicos para antígenos tumorais é limitada, uma vez que só é possível para os linfócitos T que reconhecem epítopos selecionados de proteínas tumorais. Sendo assim, o conhecimento que se pode conseguir desta maneira é restrito e não necessariamente representa o que acontece com todo o repertório de linfócitos T que reage àquele antígeno e, principalmente, com o repertório completo de linfócitos T capazes de reagir contra o tumor (Figura 4).

Uma outra categoria de métodos utilizada para verificar a presença de linfócitos T específicos para tumores se baseia na utilização de uma característica funcional dos linfócitos T como indicativo de especificidade (Figura 4). As duas metodologias mais utilizadas envolvem a detecção da produção de citocinas, especialmente IFN- γ , por meio da técnica de ELISPOT, e o ensaio de citotoxicidade celular, que consiste em avaliar a presença de linfócitos T capazes de eliminar células tumorais. Estas técnicas são especialmente úteis na avaliação da presença de linfócitos T CD8 com capacidade antitumoral, uma vez que se utiliza de dois mecanismos efetores importantes no controle da doença, como forma de avaliar a presença de células reativas. Porém, estes métodos falham em detectar linfócitos T que não apresentam tais mecanismos efetores, e são especialmente deficientes na avaliação da presença de linfócitos T CD4 tumor-reativos.

Figura 4 – Metodologias para detecção de linfócitos T específicos. O rastreamento de linfócitos T específicos para um determinado antígeno pode ser feito por meio da avaliação de sua ligação direta ao complexo formado pelo MHC com o peptídeo de interesse (Ensaio de ligação com multímeros), ou por meio da resposta dos linfócitos T quando em contato com o antígeno para os quais são específicos. Esta resposta pode ser detectada pela produção de citocinas – como no caso da avaliação da produção de IFN- γ via ELISPOT – pela capacidade de eliminar alvos contendo o antígeno (análise de citotoxicidade), ou até mesmo pela resposta proliferativa. Dentre as três, a análise de proliferação é a única que não depende diretamente da função exercida pelo linfócito estudado.



Sendo assim, visando a análise ampla e com menor viés funcional da frequência de linfócitos T, do que a encontrada com as outras técnicas disponíveis, a frequência de linfócitos T tumor-reativos neste trabalho foi calculada principalmente utilizando uma técnica descrita recentemente e com potencial de avaliar de maneira muito mais abrangente o repertório: a metodologia de triagem de bibliotecas de linfócitos T (CAMPION et al., 2014; GEIGER et al., 2009). Essas bibliotecas são construídas a partir da separação dos linfócitos T, de acordo com o seu fenótipo de superfície, nas subpopulações de linfócitos T de interesse (como, por exemplo, *naïve*/memória) (ZIELINSKI et al., 2011) e posterior expansão inespecífica de todos os clones presentes em cada subpopulação de linfócitos T, utilizando IL-2 e fitohemaglutinina (PHA) (MORETTA et al., 1983). As células de cada biblioteca são,

então, desafiadas com antígenos tumorais específicos apresentados por células apresentadoras de antígeno, sendo considerados específicos para o antígeno, os linfócitos T que sofrerem proliferação (GUY et al., 2013). Para aprendizagem do método, o trabalho contou com a colaboração da criadora deste, a Dra. Federica Sallusto, por meio de um estágio de pesquisa realizado na Suíça. Durante o trabalho, variações desta técnica foram testadas e implementadas, sendo discutidas adiante, visando adaptá-lo para o contexto tumoral, onde a afinidade baixa e os mecanismos de evasão tumoral são capazes de atrapalhar a identificação dos linfócitos T tumor-específicos.

Parece claro que o aprimoramento dos protocolos de imunoterapia ativa contra o câncer depende tanto da determinação do potencial real de reconhecimento de TAA pelo sistema imune dos pacientes, quanto da avaliação do tipo de resposta imune que os linfócitos T que reconhecem esses antígenos geram *in vivo* frente à doença. Portanto, o presente projeto visou avaliar o repertório de linfócitos T CD8 e CD4 capazes de reconhecer antígenos tumorais em indivíduos saudáveis e em pacientes com câncer, nestes, tanto antes quanto depois de intervenções imunoterapêuticas. Além da determinação da frequência de linfócitos T específicos para antígenos tumorais, também foi avaliado o fenótipo funcional dessas células, desvendando, assim, a evolução da resposta imune frente a uma neoplasia, à medida que ela progride ou, por outro lado, regride, em resposta ao tratamento.

2 OBJETIVOS

Avaliar, quanto à frequência e fenótipo funcional, o repertório de linfócitos T capazes de reagir com antígenos tumorais em doadores saudáveis e em pacientes com câncer e, quando possível, antes e após o tratamento da doença.

2.1 *Objetivos específicos*

Quanto à frequência:

- ❖ Avaliar a frequência de linfócitos T, no sangue de doadores saudáveis e no sangue de um paciente, capazes de reagir contra neoantígenos tumorais de seu carcinoma hepatocelular.
- ❖ Determinar, no sangue de doadores saudáveis e no sangue e no tumor de pacientes com câncer de mama, a frequência e fenótipo de linfócitos T reativos para a proteína Her2.
- ❖ Estimar a frequência de linfócitos T reativos para tumores de mama (considerando todos os antígenos presentes no tumor e abrangendo amplamente os fenótipos de linfócitos T) infiltrando o tumor dos pacientes e presentes no sangue destes e de indivíduos saudáveis.
- ❖ Quantificar, nos pacientes com glioblastoma multiforme, o número de linfócitos T CD4 e CD8 reativos para seus próprios tumores, e avaliar a cinética desta frequência no sangue destes pacientes, após a remoção do tumor e tratamento imunoterapêutico com vacina de híbridos de células dendríticas.

Quanto ao fenótipo e à função:

- ❖ Avaliar os linfócitos T capazes de reagir contra a proteína Her2 quanto ao seu estágio de diferenciação (*naïve*/memória), capacidade citotóxica e padrão de produção de citocinas.

- ❖ Caracterizar o fenótipo funcional dos linfócitos T capazes de reagir contra lisados de tumores de mama, em doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama.

- ❖ Determinar o fenótipo dos linfócitos T CD4 específicos para glioblastoma multiforme nos pacientes, e as alterações deste fenótipo após intervenção cirúrgica e imunoterapêutica. Correlacionar este fenótipo com a resposta terapêutica obtida com a vacinação com híbridos de células dendríticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está registrado na Plataforma Brasil (CAAE: 41905115.0.0000.5467 e 58882116.7.1001.5467) e conta com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 1221/CEPSH e 1312/CEPSH).

3.1 Coleta de amostras de sangue e tumor

Câmaras de leuco-redução de doadores de plaquetas do Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz foram coletadas após consentimento por escrito dos doadores, de onde foram obtidas as células do sangue dos indivíduos controles do estudo. Após consentimento livre e esclarecido dos pacientes com câncer de mama e de glioblastoma multiforme, um total de no máximo 40 mL de sangue periférico foi colhido em tubo de heparina sódica antes da cirurgia, assim como um fragmento tumoral foi coletado durante o procedimento cirúrgico. Para os pacientes com GBM, novas coletas de sangue foram realizadas logo antes da administração das doses de vacinas com híbridos de células dendríticas. A peça tumoral foi acondicionada em tubo de 50 mL contendo PBS ou RPMI-1640 na presença de antibiótico/antimicótico, e mantida em geladeira até seu processamento (após, no máximo 24 horas da cirurgia).

3.2 Obtenção de soro humano e preparação de meio de cultura completo

Para obtenção do soro humano, utilizou-se sangue de doadores saudáveis com tipo sanguíneo AB. O sangue foi coletado em tubo seco, sendo mantido por 1 h a temperatura ambiente para induzir coagulação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1100 x g por 20 min, e o soro foi coletado, filtrado em filtro de 0.2 µm (Corning) e congelado a -20 °C até sua utilização. O meio de cultura utilizado para os ensaios de proliferação autóloga de linfócitos T, aqui denominado meio completo, foi preparado utilizando-se RPMI-1640 com 5% de soro humano AB suplementado com 1 mM sódio-piruvato (Lonza), 0,1 mM aminoácidos não essenciais (Lonza), 2 mM L-glutamina (Lonza), 5x10⁻⁵ M β-Mercaptoetanol (Sigma), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 250 ng/mL de anfotericina B (Gibco™ Antibiotic-Antimycotic 100X; Thermo Fisher Scientific).

3.3 Cultura das células de linhagens utilizadas

Todas as linhagens usadas foram sistematicamente verificadas quanto à presença de micoplasma, sendo usadas em experimento apenas aquelas livres de tal contaminação. A passagem de todas as linhagens também foi controlada durante os experimentos de modo a se usar apenas passagens dentro um intervalo de, no máximo, 10 repiques, diminuindo-se assim a variação genética que pode ocorrer devido ao grande tempo de cultivo. As linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (R-10; Sigma) acrescido de antibiótico e antimicótico.

3.4 Digestão tumoral e isolamento de linfócitos T infiltrantes (T-TIL)

As amostras tumorais obtidas após ressecção cirúrgica foram pesadas em placa de petri e tiveram suas dimensões medidas. Em seguida, as peças foram fatiadas em pequenos fragmentos (1 mm) com auxílio de bisturi e pinça, sendo transferidas para garrafa com agitador magnético estéril, contendo RPMI, antibiótico/antimicótico, e colagenase (5,6 µg/mL). A amostra foi, então, mantida sob agitação em banho maria por 2 h. Após este período, o conteúdo do frasco foi vertido em um tubo contendo uma seringa com gaze, para reter os fragmentos não digeridos. Estes fragmentos foram utilizados para obtenção dos lisados tumorais, enquanto o líquido filtrado contendo a suspensão de células foi lavada 3x com RPMI. Durante as lavagens, no caso das amostras de câncer de mama, o excesso de gordura da amostra foi sendo retirado. A quantidade de células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, sendo congelados, de cada paciente com GBM, 12 criotubos contendo 10^7 células cada para confecção da vacina de híbridos de células dendríticas e células tumorais. O restante da suspensão celular dos pacientes cm GBM, assim como toda a suspensão de células de câncer de mama foram utilizadas para isolamento dos linfócitos T infiltrantes (T-TIL). Os T-TIL foram isolados do restante das células por meio de separação magnética positiva com esferas magnéticas anti-CD3, conforme instruções do fabricante (Miltenyi Biotec). Os linfócitos T foram, então, mantidos em cultura para a análise de sua especificidade e fenótipo, enquanto as células negativas para CD3 foram congeladas para posterior utilização nos ensaios de citotoxicidade, sendo parte utilizada para geração de lisados tumorais.

3.5 Preparação de lisados tumorais

Para preparação do lisado tumoral das linhagens, as células em cultura foram tripsinizadas, recuperadas em tubos plásticos de 1,5 mL e ressuspendidas em PBS. Para preparação do lisado tumoral de amostras de tumores de pacientes, foram utilizados fragmentos que não foram digeridos após tratamento com colagenase, além de parte da suspensão de células negativas para CD3 obtida após digestão. As amostras de células e/ou fragmentos de tecido foram lavadas uma vez com PBS e ressuspendidas em PBS, sendo transferidas para criotubos. Os criotubos, então, sofreram 5 ciclos de congelamento rápido em nitrogênio líquido seguido de descongelamento. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi novamente transferido para tubos plásticos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 13000 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi recuperado em outro tubo, quantificado por Bradford utilizando o Quick Start™ Bradford Protein Assay (Biorad), e utilizado como lisado tumoral nos ensaios de proliferação autóloga.

3.6 Processamento do sangue e separação de PBMC

As células mononucleares (PBMC) do sangue foram separadas a partir de centrifugação do sangue em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Para isso, o sangue foi diluído 1:1 em PBS e submetido à centrifugação sobre 12 mL de Ficoll-Paque por 30 min a 900 x *g*, com parada lenta (sem freio; *brake*) na temperatura de 18 °C. A camada de células mononucleares foi recuperada em outro tubo, juntamente com RPMI-1640, e centrifugada a 1200 rpm por 10 min. Foram feitas mais duas lavagens a 1100 e 900 rpm, respectivamente. O pellet de PBMC foi coletado e utilizado para separação das diferentes células imunes e para diferenciação de células dendríticas.

3.7 Purificação de monócitos, linfócitos T e linfócitos B do sangue

A purificação dos diferentes tipos de células imunes, importante para os ensaios de estimulação de linfócitos T, foi obtida por meio do uso de esferas magnéticas e da separação celular acoplada à citometria de fluxo (*Cell Sorting*). Em

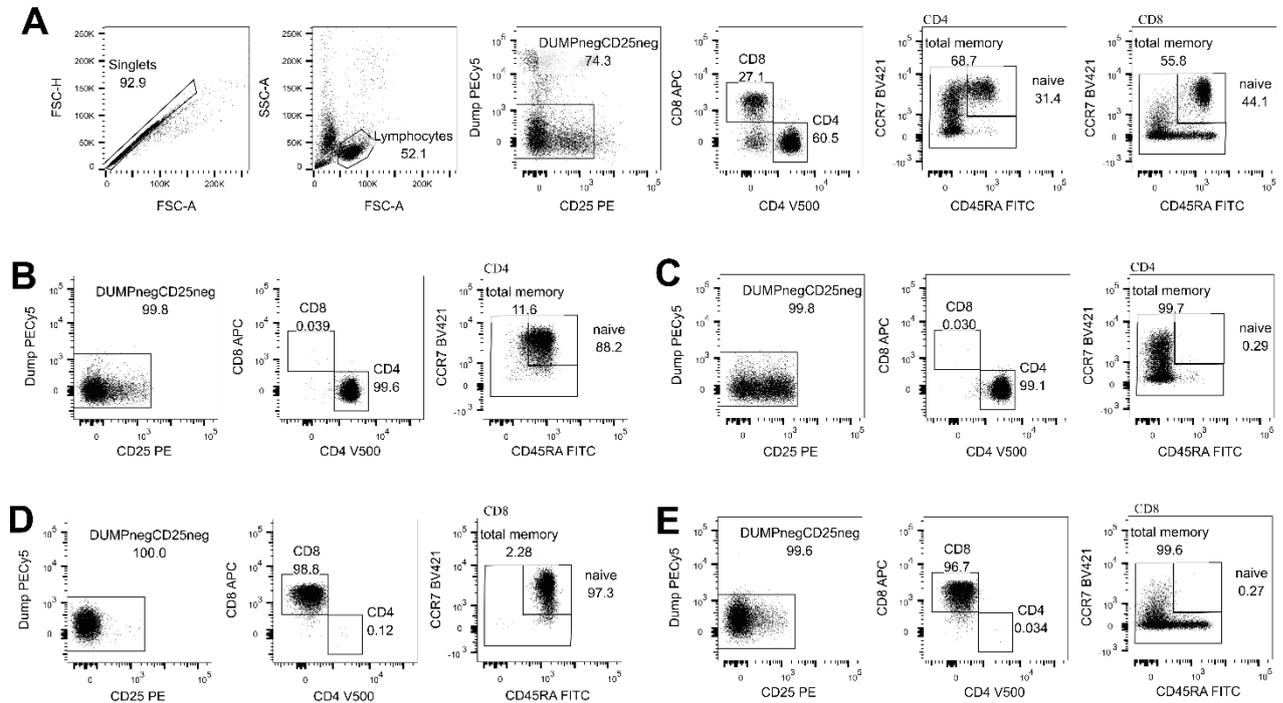
cada experimento, a pureza de cada tipo celular foi avaliada, sendo normalmente encontrada pureza acima de 90% para todos os tipos celulares.

A purificação de monócitos foi realizada por meio de seleção positiva com esferas magnéticas ligadas a anticorpos específicos para CD14 (Miltenyi Biotec). Em resumo, as PBMC foram centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L de tampão de lavagem (PBS suplementado com 2,5% soro humano AB e 2 mM de EDTA) e incubadas com 10 μ L CD14 *microbeads* (Miltenyi Biotec) por 20 min a 4 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas em tampão de lavagem (300 x g, 4 °C, 10 min) e passadas por colunas magnéticas, sendo recuperada a fração positiva (monócitos) e a fração negativa.

Linfócitos T foram obtidos por meio de seleção negativa com esferas magnéticas, conforme instruções do fabricante (Miltenyi Biotec), utilizando as células da fração negativa recuperada da separação dos monócitos ou as células não aderentes (CNA) obtidas das culturas de diferenciação de células dendríticas. Para isso, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 40 μ L/ 1×10^7 células de tampão de lavagem adicionando-se 10 μ L/ 1×10^7 células do coquetel Biotin-Antibody (Miltenyi Biotec), e incubadas por 10 min a 4 °C. Após a incubação, foram adicionados 30 μ L/ 1×10^7 células de tampão de lavagem seguido de 20 μ L/ 1×10^7 células de *microbeads* anti-Biotina (Miltenyi Biotec), sendo as células incubadas por mais 15 min a 4 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas com tampão de lavagem (300 x g, 4 °C, 10 min) e passadas na coluna magnética, sendo recuperada a fração negativa (contendo as células que não ficaram presas à coluna), enriquecida em linfócitos T CD3.

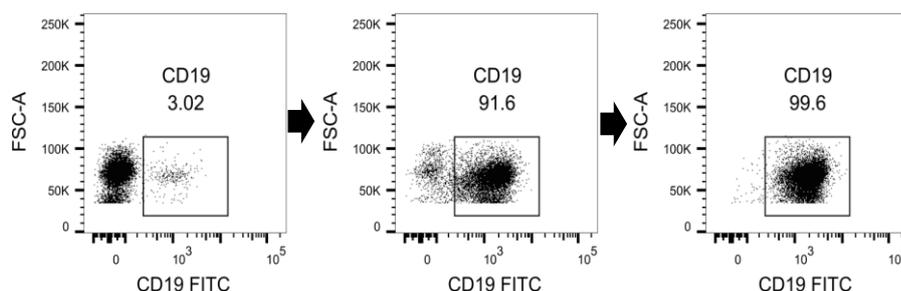
A obtenção de linfócitos T CD4 e CD8 se deu por meio da separação dos linfócitos T previamente purificados, com esferas magnéticas específicas para CD4, recuperando-se a fração positiva (linfócitos T CD4) e negativa (linfócitos T CD8). Nos experimentos onde maior pureza era desejada, os linfócitos T CD4 e CD8 foram obtidos por meio de separação celular acoplada a citometria de fluxo (*Cell sorting*) no equipamento Aria (BDBioscience). A obtenção dos linfócitos T com fenótipo de memória total ou *naïve* também foi feita por meio de separação celular acoplada a citometria de fluxo (*Cell sorting*) no equipamento Aria (BDBioscience) (Figura 5).

Figura 5 – Pureza de linfócitos T após sorting. (A) Estratégia de gates para separação por citometria de fluxo de células T naíve e memória. (B) Linfócitos T CD4 naíve após purificação. (C) Linfócitos T CD4 de memória total após purificação. (D) Linfócitos T CD8 naíve após purificação. (E) Linfócitos T CD8 de memória total após purificação.



Linfócitos B, quando necessários, foram obtidos por meio de dois passos, sendo o primeiro passo um enriquecimento de células CD19⁺ utilizando esferas magnéticas anti-FITC dentre células CD14^{neg} (fração negativa da seleção de monócitos) marcadas com CD19 FITC. O segundo passo foi o isolamento das células CD19⁺ dentre as células enriquecidas por meio de separação celular acoplada a citometria de fluxo (*Cell sorting*), obtendo-se uma população de linfócitos B extremamente purificada (Figura 6).

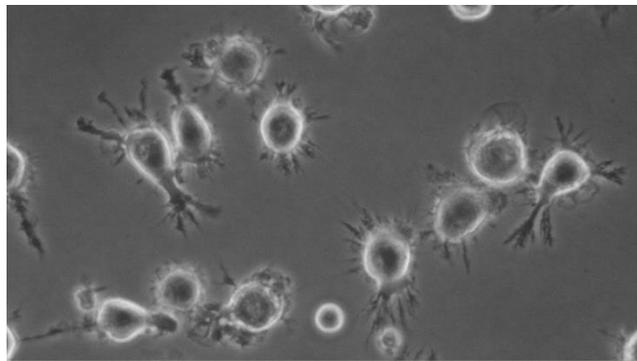
Figura 6 – Pureza de linfócitos B após enriquecimento com esferas magnéticas e *sorting*. Expressão de CD19 em amostras não enriquecidas (esquerda), em amostras após enriquecimento com esferas magnéticas (meio) e em amostras enriquecidas e separadas por *sorting* (direita).



3.8 Diferenciação *in vitro* de DC a partir de monócitos do sangue periférico

Para diferenciação das células dendríticas (DC), os monócitos foram obtidos por meio de purificação com esferas magnéticas, ou por aderência em plástico em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C, com meio AIM-V (Thermo Fisher Scientific). Após incubação, as células não aderentes (CNA) foram coletadas e mantidas em meio de cultura completo, para posterior utilização. Os monócitos foram cultivados por 7 dias em meio contendo 50 ng/mL de GM-CSF (Peprotech) e 50 ng/mL de IL-4 (Peprotech), em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Para maturação destas células, acrescentou-se ao meio de cultura o fator de necrose tumoral TNF- α (50ng/mL, Peprotech) nos últimos dois dias de cultura, ou as moléculas LPS (100 ng/mL) ou poly-IC (20 μ g/mL) nas últimas 20 h de cultura. Após a cultura, as células apresentavam tamanho e características morfológicas (presença de projeções citoplasmáticas e dendritos) de células dendríticas (Figura 7).

Figura 7 – Imagem da cultura de células dendríticas derivadas de monócitos. Foto tirada do sétimo dia de cultura da diferenciação de DC em microscópio invertido com contraste de fase (aumento de 200x).

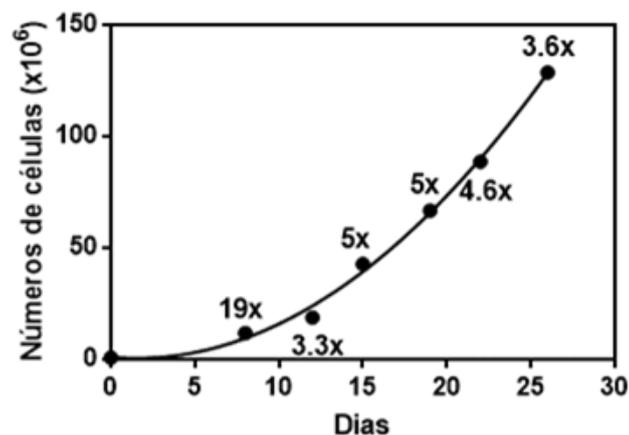


3.9 Expansão de linfócitos B

Para aumentar o número de linfócitos B disponíveis para fazer o desafio das bibliotecas de linfócitos T, estes foram expandidos durante o período de montagem das bibliotecas. Para isto, 2×10^5 linfócitos B purificados foram ressuspensos em 2 mL de meio de expansão de células B (IMDM, 0,1% de Ciprofloxacina, 10% de soro AB humano, 300 μ g/mL de transferrina, 25 μ g/mL de insulina humana e 15 μ g/mL gentamicina) e cultivadas em poços de uma placa de 12 poços com IL-4 (8 ng/mL) e 1×10^5 células K562-CD40L (células da linhagem K562 modificadas para expressar

constitutivamente o receptor CD40L) previamente gama-irradiadas (45 Gy). Após um dia, adicionou-se 4 ng de IL-4 a cada poço e, no dia 4, cada poço recebeu mais 1 mL de meio de expansão de células B com 8 ng/mL de IL-4. Os linfócitos B foram recuperados no dia 7, lavados e devolvidas à cultura, onde foram reestimuladas com a linhagem celular. Após esta recuperação inicial, a reestimulação foi feita a cada 3 a 4 dias até o final da cultura. Para a reestimulação, os linfócitos B foram recuperados, centrifugados a $800 \times g$ por 10 min e ressuspensos em meio de expansão de células B na concentração de 1×10^6 células B por mL. As células K562-CD40L previamente gama-irradiadas foram descongeladas, ressuspensas em meio de expansão de linfócitos B na concentração de 1×10^5 células por mL e misturadas com as células B, obtendo-se uma razão de 1:10 de células K562-CD40L e células B. Adicionou-se IL-4 à cultura na concentração final de 8 ng/mL, e 2 mL da suspensão celular foi colocada em cada poço de uma placa de 6 poços. Em cada etapa de reestimulação, foram utilizados 6×10^6 linfócitos B, sendo o restante das células congeladas. Com este protocolo, espera-se que haja um aumento no número de linfócitos B de 5 a 10 vezes na primeira estimulação e 2 a 5 vezes nas estimulações subsequentes (Figura 8).

Figura 8 – Expansão de linfócitos B. Número de linfócitos B durante os dias de expansão, começando com 6×10^5 células. Os números no gráfico indicam o índice de expansão a cada ciclo de reestimulação.



3.10 Ensaio de proliferação *ex vivo* de linfócitos T

Para os ensaios de proliferação, as células (linfócitos T e células apresentadoras de antígeno) foram marcados com carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Thermo Fisher Scientific) ou, no caso de uma reestimulação, com CellTrace™ Violet (CTV; Thermo Fisher Scientific). Para isso, as células foram ressuspensos em PBS

(1×10^7 células/mL) contendo 2,5 μ M CFSE ou 5 μ M CTV, sendo incubados a 37 °C no escuro por 10 ou 20 min, respectivamente. Em seguida, a amostra foi diluída em RPMI-1640 com 5% de soro humano gelado, sendo incubada no gelo por 5 min e centrifugada por 7 min a 600 x g. Linfócitos T (50.000 por poço) foram plaqueados em meio completo (ver 3.2) na placa de 96 poços com fundo em U juntamente com as APC (proporção de 10:1 para DC ou 2:1 para monócitos e linfócitos B), sendo mantidos na estufa por 5 dias. Para o ensaio de proliferação alogeneica, foram utilizadas DC de um doador diferente do doador de linfócitos T, na proporção de 10 DC para 1 linfócito T. Ao término da cultura a diluição do CFSE, assim como a expressão de CD25, foi avaliada por citometria de fluxo.

Tabela 1 – Lista de antígenos utilizados. Concentração e descrição dos antígenos utilizados nos ensaios autólogos. A concentração de 3:1 significa que foi utilizado o equivalente a 3 bactérias ou leveduras para cada célula apresentadora de antígeno.

Antígeno	Concentração	Descrição
Toxóide	10 μ g/mL	Toxóide tetânico
Influvac	2 μ g/mL	Vacina de influenza contendo as cepas HA A/California/7/2009, HA A/Hong Kong/4801/2014 e HA B/Brisbane/60/2008-like (formulação 2016/2017)
CMV	5 μ g/mL	Lisado de <i>Citomegalovirus</i> (cepa VR1814)
<i>C. albicans</i>	3:1	Leveduras de <i>Candida albicans</i> obtidas após inativação a 70 °C por 1 h
Bactérias	3:1	Lisados de bactéria obtidos após inativação a 100 °C por 20 min das seguintes bactérias: <i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Shigella flexneri</i> ; <i>Enterobacter aerogenes</i> ; <i>Lactobacillus Casei shirota</i> (Yakult).
MHC I t-pep	10 μ g/mL	Mistura de peptídeos restritos pelo MHC de classe I flanqueando regiões do genoma com mutação encontrados no tecido tumoral de um paciente com carcinoma hepatocelular.
MHC II t-pep	10 μ g/mL	Mistura de peptídeos restritos pelo MHC de classe II flanqueando regiões do genoma com mutação encontrados no tecido tumoral de um paciente com carcinoma hepatocelular.
Lisado tumoral	10 μ g/mL	Lisado tumoral obtido das linhagens K562 (eritroleucemia), MCF-7 (câncer de mama do subtipo luminal B), MDA-MB-231 (câncer de mama do subtipo triplo-negativo), SK-BR-3 (câncer de mama do subtipo Her2), ou de amostras <i>ex vivo</i> de tumores de pacientes com diferentes tipos de câncer.
Her2	4 μ g/mL	Proteína Her2 recombinante

Para os ensaios de proliferação autóloga, as APC (monócitos, linfócitos B ou DC) foram marcadas com CFSE, irradiadas a 45 Gy e carregadas com o antígeno de interesse diretamente na placa ou, quando a quantidade de antígeno disponível era baixa, em tubos de 15 mL por 5 h na estufa, na concentração de 2×10^6 APC por mL de meio (Tabela 1). Nestes ensaios, foram plaqueados poços independentes com o mesmo antígeno (mínimo de 8 replicatas), que foram marcados, após 5 dias de estimulação, com anticorpos contra CD3, CD4, CD8 e CD25 e lidos no citômetro FACSCanto. Os poços positivos foram, então, determinados como sendo aqueles com porcentagem de linfócitos T CFSE^{low}CD25⁺ superior ao obtido com a média + 1,96 desvios padrão de poços sem adição de antígenos. A frequência de linfócitos T reativos para o antígeno foi então determinada por meio do número de poços negativos, utilizando-se a distribuição de Poisson.

Além do estímulo com APC autólogas e alogeneicas, os linfócitos T foram submetidos a diferentes estímulos inespecíficos para avaliação da proliferação. Estes estímulos foram utilizados nas seguintes concentrações: Dynabeads CD3/CD28 – 1 esfera para 32 linfócitos T; PHA (fito-hemaglutinina) – 1% volume/volume (2 μ L em 200 μ L de meio, na presença de APC). Ao mesmo tempo, para saber se a proliferação era específica, 10 μ g/mL de anticorpos contra MHC de classe I (pan anti-HLA-A/B/C, clone W6/32) e de classe II (anti-HLA-DR, clone HB55; anti-HLA-DP, clone B7.21; anti-HLA-DQ, clone SPVL3; ou pan anti-HLA-DP/DQ/DR, clone TU39) foram utilizados.

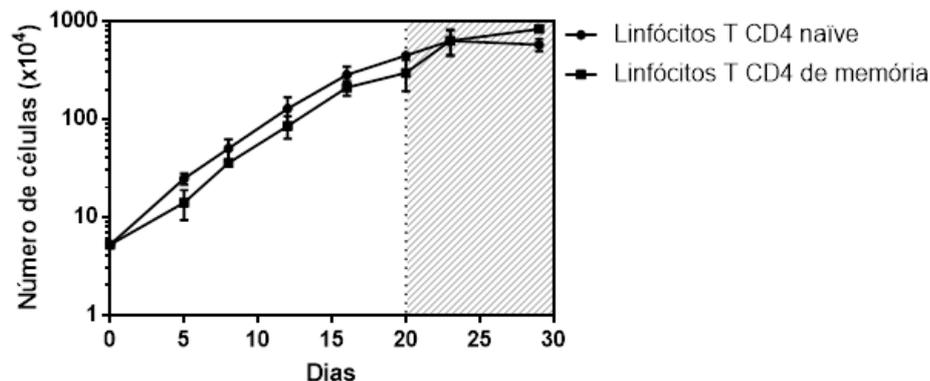
3.11 Montagem e triagem de bibliotecas de linfócitos T

As bibliotecas de linfócitos T foram montadas conforme previamente descrito (GEIGER et al., 2009). Para cada subtipo de linfócitos T, foram utilizadas duas placas de fundo em U com 96 poços, com um volume de 200 μ L por poço de meio completo (ver 3.2). Cada subtipo de linfócitos T foi plaqueado na concentração de 2.000 células por poço, na presença de PBMC alogeneicas previamente gama-irradiadas (45 Gy, 10^4 células/poço), IL-2 (500 U/mL) e 1 mg/mL de fito-hemaglutinina (PHA). Durante os 20 dias seguintes, duas vezes por semana, as placas eram duplicadas quando as células atingiam a "confluência" ou o meio era apenas mudado quando ainda havia espaço para as células crescerem. As bibliotecas estavam prontas para serem interrogadas quando os linfócitos T entravam em repouso: blastos diminuía de

tamanho, menor número de *clusters* de células nos poços e o número de linfócitos T não estava mais claramente aumentando (Figura 9).

A triagem das bibliotecas de linfócitos T foi realizada como previamente descrito (CAMPION et al., 2014), depois de 20 a 30 dias de expansão não-específica. Resumidamente, os linfócitos T de cada biblioteca foram lavados quatro vezes com RPMI-1640 + 0,5% soro humano AB, para retirada completa da IL-2. As células T ($2,5 \times 10^5$ /poço) foram então cocultivadas com APC (monócitos, linfócitos B ou células dendríticas) autólogas irradiadas, na razão de 1:10 APC para linfócitos T, salvo quando especificado o contrário. As APC foram carregadas ou não com os antígenos de interesse. Após 3 dias, adicionou-se 10 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^3H]-timidina por poço e depois de 16-18 horas a proliferação foi medida por um contador de cintilação. A frequência de precursores de linfócitos T específicos de antígeno foi determinada com base no número de poços negativos de acordo com a distribuição de Poisson. O índice de estimulação foi determinado dividindo o valor de cintilância (cpm) obtido no poço com a APC com o antígeno pelo valor do mesmo poço estimulado com a APC sem antígeno.

Figura 9 – Crescimento de linfócitos T durante expansão inespecífica. Número de linfócitos T de memória e *naïve* durante os 30 dias de estimulação com PHA e PBMC alogeneicas.



3.12 Expansão e clonagem de linfócitos T tumor-reativos

Após estimulação *ex vivo* dos linfócitos T, os poços contendo linfócitos T que proliferaram (CFSE^{low}CD25⁺, conforme determinado por citometria de fluxo de uma amostra de cada poço) foram corados com anticorpos específicos para CD4, CD8, e CD25, sendo isolados por separação celular acoplada a citometria de fluxo (*Cell sorting*). Para clonagem, as células reativas para o antígeno de interesse obtidas por

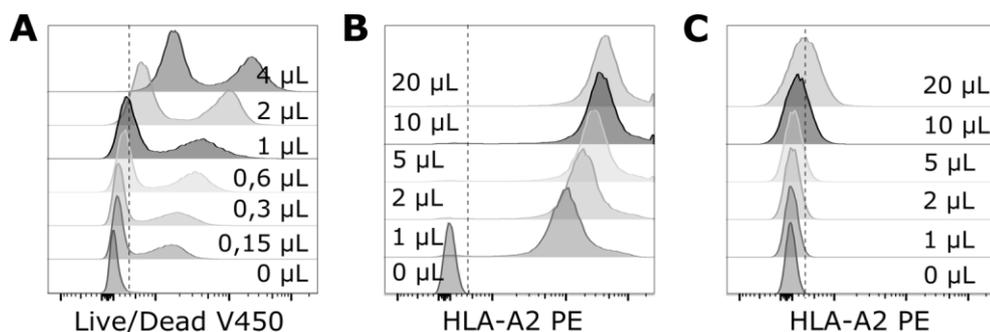
FACS foram ressuspensas em meio completo suplementado com IL-2 (500 U/mL) a uma concentração de 0,5 células T em 50 μ L de meio contendo PHA (1 mg/mL) e PBMC alogeneicas gama-irradiadas ($2,5 \times 10^4$ por poço), sendo colocado 50 μ L desta solução em cada poço de uma placa de 384 poços. Após 10-15 dias de expansão, os poços com sobrenadante amarelo e/ou alta densidade de células foram transferidos para placas de fundo em U de 96 poços. Os linfócitos T foram mantidos em cultura até entrarem em repouso, quando foram realizados os ensaios funcionais com os clones obtidos.

Para expansão de todas as células específicas que foram selecionadas, estas foram plaqueadas em poços de uma placa de 96 fundo em U com 200 μ L meio completo suplementado com IL-2 (500 U/mL), IL-7 (1 ng/mL), IL-15 (1 ng/mL), contendo PHA (1 mg/mL) e PBMC alogeneicas gama-irradiadas (1×10^5 por poço).

3.13 Marcação extracelular e análise fenotípica por citometria de fluxo

Após a contagem em câmara de Neubauer, alíquotas de 2×10^5 células foram colocadas em tubos plásticos de 1,5 mL e lavadas por 5 min a $500 \times g$ e 4°C , com 200 μ L/tubo de PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS e os anticorpos específicos foram adicionados na concentração apropriada para cada marcador de interesse. Estes tubos foram, então, incubados por 20 min a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após este período, o material foi novamente lavado com 200 μ L/tubo de PBS. Após a lavagem, as células, já marcadas, foram ressuspensas em 200 μ L de PBS e analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto ou Fortessa (BD Biosciences). Os dados foram adquiridos com a utilização do software FACS Diva (BD Biosciences) e analisados com o software FlowJo (BD Biosciences).

Figura 10 – Titulações de marcadores. (A) Titulação do Live/Dead Violeta. (B) Titulação de HLA-A2 PE em doador positivo. (C) Titulação de HLA-A2 PE em doador negativo.



A concentração adequada de cada marcador foi determinada a partir da titulação destes, realizada em todos os anticorpos e marcadores novos do laboratório. Um exemplo da titulação de anticorpos e marcadores de citometria de fluxo pode ser visto na Figura 10.

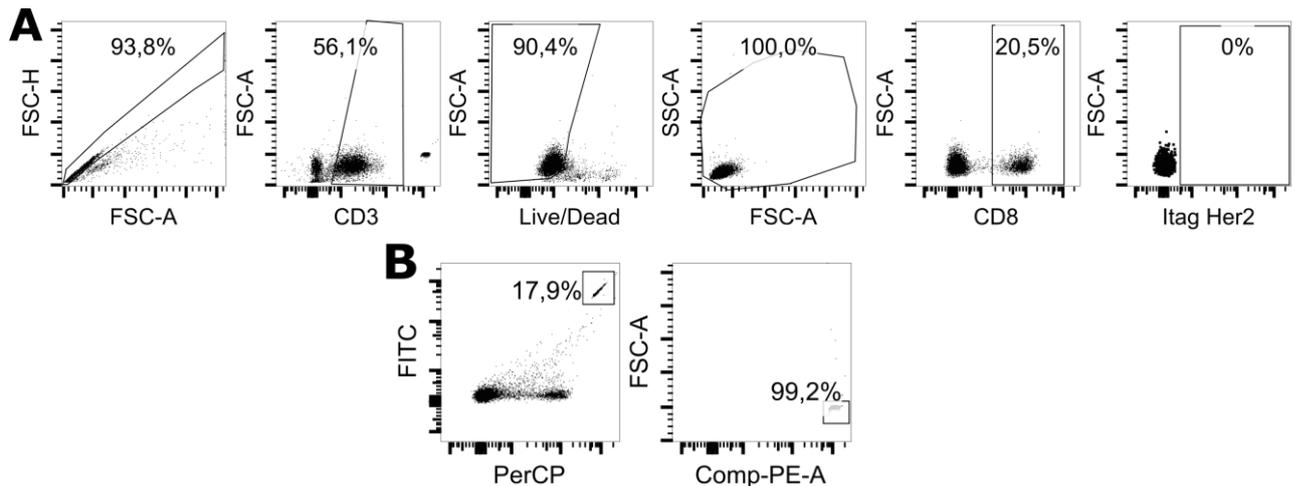
3.14 Marcação de linfócitos T com tetrâmeros específicos para Her2

O sangue dos indivíduos foi, primeiramente, testado por citometria de fluxo para a presença do alelo HLA-A2 do MHC, sendo utilizadas para marcação com o multímero apenas as amostras provenientes de pacientes positivos para HLA-A2. Linfócitos T (3×10^6 células) foram marcados com 5 μ L de solução de tetrâmeros “iTAg MHC Tetramer – HLA-A*0201 Her2/neu Tetramer – KIFGSLAFL – PE” (MBL International) e com 1 μ L de Live/Dead V450, 10 μ L de CD45RA APC, 8 μ L de CD8 PerCP, 2 μ L de CCR7 PE-Cy7 e 2 μ L de CD3 V500 por 30 min no escuro a temperatura ambiente em 400 μ L de PBS. As células foram lavadas com 6 mL de PBS (400 x g, 5 min), sendo 15% separado para leitura do grupo sem seleção. O restante foi ressuspensionado em 80 μ L de tampão de lavagem (PBS suplementado com 0,5% soroalbumina bovina e 2 mM de EDTA), com mais 20 μ L de microbeads anti-PE (Miltenyi Biotec), sendo incubado por 15 min a 4 °C. Após a incubação, as células foram lavadas adicionando-se 2 mL do tampão de lavagem e centrifugando a 400 x g, 4 °C, por 5 min. Então, as células foram ressuspensionadas em 500 μ L de tampão de lavagem e colocadas na coluna magnética, sendo recuperadas a fração eluída e a fração enriquecida. As células foram, então, fixadas com PBS + 0,5% de formaldeído, e lidas entre 1 e 24 h após a fixação. Imediatamente antes da leitura, foram adicionadas 10 μ L de 123count™ eBeads (Thermo Fisher Scientific) para quantificação das células positivas para o tetrâmero. Foi adquirido o máximo de eventos possíveis em todos os tubos.

A análise foi feita delimitando, consecutivamente, as células únicas (*singlets*), positivas para CD3, células vivas, com tamanho e granulosidade característicos de linfócitos T e positivas para CD8, sendo feito um último *gate* nas células positivas para o tetrâmero, utilizando-se o FMO (Figura 11A). A análise de CD45RA por CCR7 também foi feita delimitando-se os quadrantes por meio da utilização de FMO para essas moléculas. As esferas de contagem foram determinadas por meio da

delimitação dos eventos em FITC x PerCP seguido dos eventos em PE x FSC (Figura 11B).

Figura 11 – Estratégia de análise de linfócitos T marcados com tetrâmero. (A) Seleção de *singlets*, células positivas para CD3, células vivas (negativas para Live/Dead), com tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de linfócitos T, positivas para CD8. A delimitação dos eventos positivos para o tetrâmero foi feita utilizando o tubo de FMO (“*fluorescence minus one*”). (B) Seleção das *esferas de contagem* por meio da delimitação dos eventos em FITC x PerCP seguido de PE x FSC.



Para cada tubo, a quantidade total de células CD8 e/ou positivas para o tetrâmero foi calculada pela fórmula:

$$\text{num total de células} = \frac{(\text{num de células adquiridas}) \times (\text{num de beads adicionadas ao tubo})}{(\text{num de beads adquiridas})}$$

Em seguida, a porcentagem de células positivas para o tetrâmero foi calculada pela fórmula:

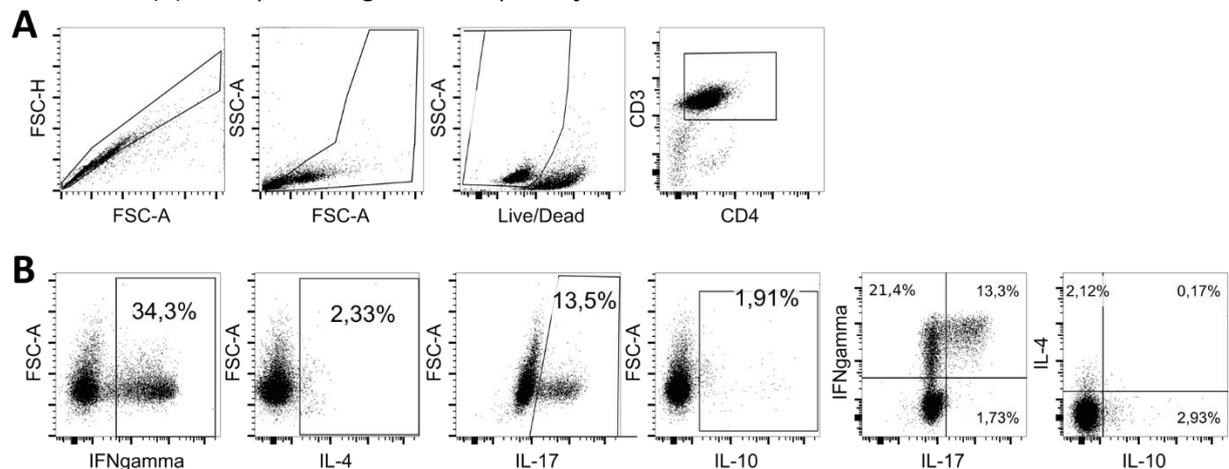
$$\% \text{ cels Her2} = \frac{(\text{num de céls Her2 na fração eluída}) + (\text{num de céls Her2 na fração enriquecida})}{(\text{num de céls CD8 na fração eluída}) + (\text{num de céls CD8 na fração enriquecida})}$$

3.15 Marcação intracelular para análise de citocinas

Os linfócitos T foram incubados com PMA (phorbol-12-miristato-13-acetato; 10 ng/mL), ionomicina (500 ng/mL) e 1 µL de brefeldina (BD GolgiPlug; BD Biosciences)/mL de meio, 16 h antes do início do protocolo de marcação. Após incubação, os linfócitos T foram marcados extracelularmente com Live/Dead (Thermo

Fisher Scientific). Após marcação extracelular, as células foram ressuspensas em 100 μ L de tampão Perm/Fix (eBiosciences), sendo incubadas por 45 min a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de tampão de lavagem Perm Wash 1x (eBioscience) por poço, sendo a placa centrifugada a 1500 rpm por 5 min. Após retirada do sobrenadante, as células foram bloqueadas com 10 μ L de solução com 2% de soro fetal bovino em PBS 15 min à temperatura ambiente. Após incubação, os anticorpos para marcação intracelular foram adicionados na quantidade padronizada, em mais 100 μ L de tampão de lavagem. Após uma hora de marcação, as células foram centrifugadas com tampão de lavagem, ressuspensas em PBS, e lidas imediatamente no citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences). Como controle da marcação foi feito um tubo com isotipo controle (para verificar a eficiência do bloqueio) e para definição do limiar de positividade dos marcadores foram feitos um tubo sem a adição dos anticorpos específicos para as citocinas, e um grupo marcado com o painel completo, mas sem ativação com PMA e ionomicina. A estratégia de análise utilizada para os linfócitos T CD4 pode ser vista na Figura 12.

Figura 12 – Estratégia de análise de produção de citocinas. (A) Seleção de *singlets*, com tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de linfócitos T, células vivas (negativas para Live/Dead), células positivas para CD3 e CD4. (B) Exemplos dos gráficos de produção de citocinas encontrado em uma amostra.



3.16 Ensaio de citotoxicidade de linfócitos T CD8

Diferentes concentrações de linfócitos T, obtidos após expansão, foram colocados em contato com células tumorais alvo, previamente marcadas com CFSE, em placas de 96 poços com fundo em U. A placa foi centrifugada por 10 s a 13000 rpm e mantida em estufa de CO₂ a 37 °C por 16h. Após a incubação, as células foram

marcadas com CD4, CD8 e Live/Dead. A leitura foi feita imediatamente após a marcação, no citômetro FACSCanto. A análise da citotoxicidade foi feita por meio da determinação da porcentagem de células positivas para Live/Dead dentro das células positivas para CFSE e negativas para CD3 e CD8, excluindo, assim, as células efetoras da análise. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada pela fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidade} = \left(\frac{\% \text{ de células alvo mortas} - \% \text{ de morte espontânea}}{100 - \% \text{ de morte espontânea}} \right) * 100$$

sendo que a morte espontânea foi aquela observada na ausência de células efetoras.

3.17 Ensaio de supressão de linfoproliferação

Linfócitos T CD4 e CD8 foram marcados com CFSE e CTV, respectivamente (ver 3.10), e cocultivados, em diferentes proporções de células CD4 e CD8, na presença de dynabeads. Após 72h, os linfócitos ali presentes foram marcados com CD3, CD4, CD8 e CD25, sendo lidos imediatamente no FACSCanto. A porcentagem de linfócitos T proliferantes foi, então, determinada em cada uma das duas populações utilizando, para defini-las, tanto a expressão de CD4 e CD8, quanto a positividade para cada um dos corantes. Foram consideradas proliferantes, aquelas que sofreram diluição de seu corante e positividade para CD25. Como ensaio piloto, linfócitos T CD8 positivos e negativos para CD103 foram obtidos por separação acoplada a citometria de fluxo e cocultivadas com linfócitos T CD4 do mesmo indivíduo.

3.18 Ensaio de expressão de PD-L1 por células tumorais

A expressão de PD-L1 por células tumorais foi avaliada após incubação destas com sobrenadante de linfócitos T CD4 reativos ou não para tumores. Para isso, 10.000 linfócitos T (ou 1.000 linfócitos T provenientes de clones de linfócitos T) foram ativados ou não por 72 h com dynabeads (1:32) em 200 µL de meio completo em placas de fundo em U. Após incubação, o sobrenadante foi coletado e usado contra as células tumorais. Células primárias e células tumorais de linhagem foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células por poço, em 160 µL de R-10, recebendo 40 µL (20%)

de sobrenadante de linfócitos T, ou, como controle positivo, 20 ng/mL de IFN- γ recombinante. 48 após incubação, as células foram retiradas com PBS com 2mM EDTA, marcadas com Live/Dead e anticorpo anti-PD-L1, e lidas no FACSCanto.

3.19 Depleção de IFN- γ no sobrenadante de cultura de linfócitos T

A citocina IFN- γ foi depletada dos sobrenadantes dos linfócitos T CD4 utilizando-se o kit de ELISA de IFN- γ (R&D Systems). Para isto, o anticorpo de captura do kit de ELISA foi diluído 1:180 em PBS. Foram adicionados 50 μ L de anticorpo diluído por poço da placa de 96 poços *high binding* estéreis, sendo esta incubada *overnight* a 4 °C. A placa foi, então, lavada 3x com PBS-Tween 0,05%, sendo o excesso de tampão retirado entre as lavagens batendo a placa sobre papel toalha. Em seguida, os poços foram incubados à temperatura ambiente por 1 h com 300 μ L de tampão de bloqueio (PBS-BSA 1%). Após incubação do bloqueio, foram feitas mais 3 lavagens e 100 μ L de sobrenadante foram colocados por poço, sendo a placa incubada por 2 h à temperatura ambiente. Após incubação, o sobrenadante foi coletado e utilizado nos ensaios de expressão de PD-L1. Como controle, anticorpos IgG de isotipo controle foi utilizado como anticorpo de captura.

3.20 Análise estatística

Todos os resultados foram testados para normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Testes paramétricos foram utilizados apenas quando as amostras passavam no teste de normalidade ($p > 0,05$, portanto a distribuição da amostra não era considerada estatisticamente diferente da distribuição normal), enquanto amostras que não passaram pelo teste de normalidade foram analisadas com testes não paramétricos. Para a análise estatística entre dois grupos foi utilizado o teste T (paramétrico) ou o Wilcoxon (não paramétrico). Para análise de diferentes grupos foi utilizado o teste de variância ANOVA com pós teste de Bonferroni (paramétrico) ou o teste de Friedman com pós-teste de Dunn (não paramétrico). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o nível descritivo foi menor do que 5%, ou seja, o valor de p foi menor ou igual a 0,05 (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$) nos resultados analisados. A análise estatística e os gráficos apresentados foram gerados com auxílio do software GraphPad Prisma versão 5 para Windows.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para fornecer um melhor entendimento do repertório de linfócitos T específicos para tumores em humanos, avaliamos a frequência e função dos linfócitos T reativos para tumores em diferentes contextos. Primeiramente, a resposta contra antígenos definidos foi avaliada, sendo utilizados antígenos tumorais de duas classes diferentes: neoantígenos e antígenos superexpressos. Em seguida, estimou-se a frequência total de linfócitos T reativos para tumores de mama e de glioblastoma multiforme (considerando todos os antígenos tumorais e abrangendo linfócitos T com diferentes funções), por meio da utilização de lisados tumorais como fonte de antígenos.

Posteriormente, o fenótipo funcional dos linfócitos T tumor-reativos foi estudado. Primeiramente, avaliou-se a proporção de linfócitos T Her2-reativos com fenótipo *naïve* e memória, além de sua capacidade de produção de IFN- γ e citotoxicidade. Linfócitos T CD8 reativos para tumores de mama tiveram sua capacidade citotóxica e supressora medida. Ainda, determinamos o perfil de produção de citocinas da população total de linfócitos T CD4 reativos para os lisados de tumores de pacientes com câncer de mama ou com glioblastoma multiforme, sendo esta mesma análise realizada também em clones de linfócitos T reativos para tumores de mama. Por fim, a possível função dos linfócitos T CD4 tumor-reativos foi também estudada.

4.1 *Resposta contra neoantígenos de carcinoma hepatocelular*

O processo de carcinogênese é acompanhado de mutações capazes de gerar novas sequências peptídicas, dando origem a neoantígenos. Este tipo de antígeno tumoral é o mais estudado, devido a sua expressão restrita a células tumorais, característica que os torna atraentes para o uso em estratégias imunoterapêuticas. Assim, iniciamos os estudos analisando a frequência de linfócitos T específicos para tais neoantígenos, no laboratório da Dr^a Federica Sallusto, na Suíça.

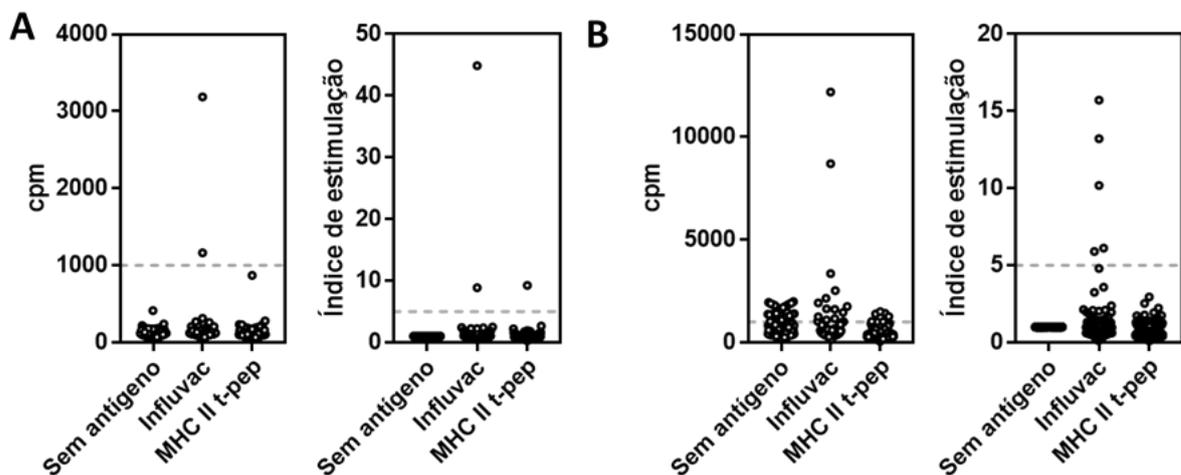
4.1.1 *Triagem de bibliotecas de linfócitos T CD4 com neoantígenos*

Estudos sobre a presença e fenótipo de linfócitos T CD8 específicos para neoantígenos são frequentes, mas geralmente se restringem à análise de uma única

sequência peptídica da proteína mutada, por meio da construção e marcação com multímeros. Além disso, poucos estudos analisam o repertório de linfócitos T CD4 específicos para tais antígenos. Visando analisar, de uma maneira mais ampla, a frequência de linfócitos T CD4 específicos para neoantígenos, utilizamos um conjunto de peptídeos restritos pelo MHC de classe II contendo sequências de proteínas mutadas encontradas em um paciente com carcinoma hepatocelular (MHC II t-pep), como fonte de neoantígenos.

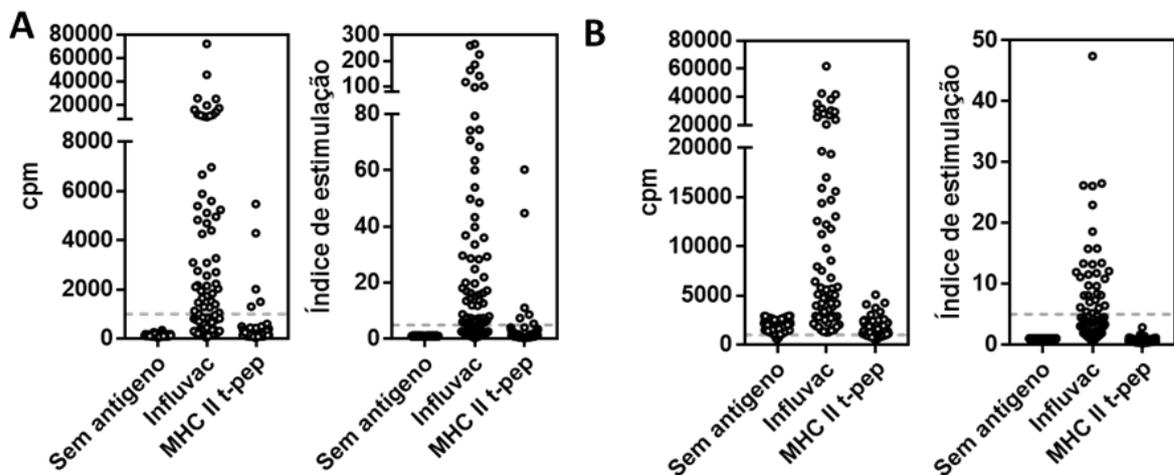
A técnica de triagem de bibliotecas de linfócitos T foi utilizada para determinar a frequência de linfócitos T CD4 reativos para os neoantígenos, devido a sua característica de, por meio da análise da proliferação dos linfócitos T em resposta a um antígeno, ser capaz de determinar a especificidade de uma maneira independente da função do linfócito T (CAMPION et al., 2014). Para montagem das bibliotecas, linfócitos T com um determinado fenótipo foram purificados por FACS, plaqueados em uma dada quantidade em poços de placas de 96 poços com fundo em U, e expandidos não-especificamente utilizando fitohemaglutinina (PHA), IL-2 e PBMC alogeneicas previamente gama-irradiadas (45 Gy). Uma vez constatado o fim da expansão dos linfócitos no poço, as células ali presentes, designadas como uma "linhagem de linfócitos T", foram desafiadas com monócitos autólogos carregados com o MHC-II t-pep, e sua proliferação foi avaliada por incorporação de timidina tritiada. Foram consideradas positivas, as linhagens de linfócitos T que tiveram valor de cintilância maiores que 1.000 cpm e índice de estimulação maior do que 5.

Figura 13 – Triagem de bibliotecas de linfócitos T CD4 *naïve* de doadores saudáveis. Proliferação (cpm) e índice de estimulação de linfócitos T CD4 *naïve* de dois doadores saudáveis (A) e (B) estimulados com monócitos sem antígeno, ou carregados com a vacina de influenza (Influvac), ou com os peptídeos tumorais restritos pelo MHC de classe II (MHC II t-pep).



Para avaliar se indivíduos saudáveis eram capazes de responder contra neoantígenos tumorais, foram utilizadas bibliotecas de linfócitos T CD4 *naïve* e de memória, geradas a partir de sangue de dois doadores saudáveis. Nenhuma das linhagens das duas bibliotecas de doadores saudáveis interrogados continha clones de linfócitos T CD4 *naïve* específicos para os peptídeos tumorais (Figura 13). O repertório de linfócitos T *naïve* é muito diverso, e células T específicas para um dado antígeno, mesmo este sendo um antígeno presente em patógenos, aparecem em baixa frequência neste compartimento (JENKINS; MOON, 2012). Sendo assim, a incapacidade de detectar linhagens de linfócitos T CD4 *naïve* específicos para neoantígenos quando se rastreiam apenas 400.000 linfócitos T *naïve* (2.000 células T por poço, em duas placas de 96 poços) não é surpreendente. De fato, mesmo quando, como controle, o desafio foi feito com a vacina da influenza (Influvac), apenas algumas linhagens de linfócitos T CD4 reagiram. Empregando a distribuição de Poisson, utilizando o número de linhagens negativas, é possível calcular a frequência de linfócitos T na população inicial que eram reativos para o antígeno. No caso da Influvac, esta frequência foi de 5 e 11 linfócitos T CD4 *naïve* específicos para Influvac por milhão de linfócitos T CD4 *naïve*, nos dois doadores saudáveis.

Figura 14 – Triagem de bibliotecas de linfócitos T CD4 de memória de doadores saudáveis. Proliferação (cpm) e índice de estimulação de linfócitos T CD4 de memória de dois doadores saudáveis (A) e (B) estimulados com monócitos sem antígeno, ou carregados com a vacina de influenza (Influvac), ou com os peptídeos tumorais restritos pelo MHC de classe II (MHC II-t-pep).



Por outro lado, quando linfócitos T CD4 de memória constituíram a população inicial, encontramos, em um dos dois doadores saudáveis, linhagens de linfócitos T reativas para os neoantígenos tumorais (Figura 17), numa frequência de 5 linfócitos T CD4 de memória por milhão. Já se sabe que podem ser encontrados, no sangue de

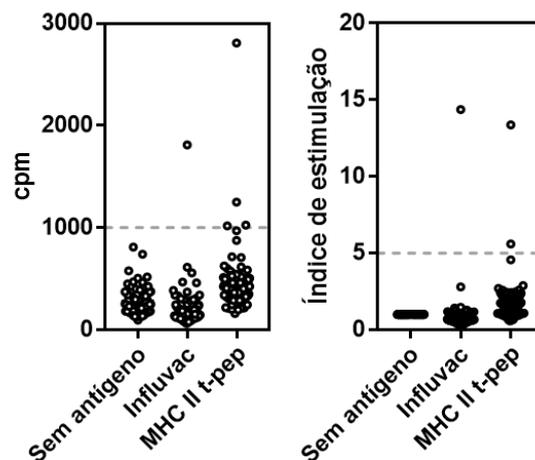
doadores saudáveis, linfócitos T CD8 específicos para neoantígenos de pacientes com câncer, e que, intrigantemente, alguns destes clones de linfócitos T isolados de doadores saudáveis também são capazes de reconhecer o tumor do doente onde o neoantígeno foi identificado, de forma específica (STRONEN et al., 2016).

Em nosso estudo, os linfócitos T CD4 específicos para peptídeos tumorais encontrados no doador saudável estavam no compartimento de memória. No entanto, este resultado tem de ser cuidadosamente interpretado: a compatibilidade entre o HLA dos doadores saudáveis e do paciente não é conhecida, e os peptídeos foram desenhados de modo a se ligar nas moléculas de MHC do doente. Logo, estes linfócitos T poderiam ter reatividade cruzada com um antígeno de algum agente infeccioso, explicando, assim, serem encontrados no compartimento da memória. Todavia, outra possível, porém difícil de provar, explicação para este fenômeno, embasada na teoria da vigilância imunológica, seria que a mesma mutação do paciente poderia ter ocorrido em células dos doadores saudáveis, mas seu sistema imunológico teria sido capaz de eliminar as células mutadas, impedindo-o de desenvolver câncer, e gerando uma resposta de memória ao antígeno mutado. Este assunto será abordado novamente com maior profundidade mais adiante, durante as análises de linfócitos T específicos para lisados de câncer de mama.

Em seguida, realizamos a triagem de bibliotecas geradas com linfócitos T do mesmo indivíduo com carcinoma hepatocelular a partir do qual foram obtidos os neoantígenos. Duas bibliotecas, uma de linfócitos T CD4 de memória do sangue – gerada a partir de 1.000 linfócitos T por poço – e outra contendo células T CD4 de memória de tecido tumoral e não tumoral do doente – geradas a partir de 200 linfócitos T por poço – foram descongeladas e desafiadas com diferentes antígenos apresentados por linfócitos B expandidos. Nenhuma linhagem de linfócitos T das bibliotecas de tecidos foi positiva para qualquer um dos antígenos testados (dados não mostrados). Uma vez que menos de 10.000 linfócitos T intra-tumorais foram utilizados, apenas linfócitos T altamente frequentes poderiam ter sido detectados. Assim, podemos concluir que ou a frequência de linfócitos T específicos para neoantígenos não era elevada no tecido tumoral, ou os linfócitos T reativos não foram capazes de proliferar nas condições do ensaio. No sangue do paciente, não foram encontrados linfócito T reativos para *Salmonella typhimurium* (dados não apresentados) e apenas uma linhagem foi reativa para Influvac (Figura 15). O uso de linfócitos B para realizar a triagem pode ter contribuído para esta baixa reatividade,

uma vez que estas células são APC inferiores a monócitos e DC (APÊNDICE A). Porém, mesmo utilizando linfócitos B como APC, a frequência de linfócitos T reativos para Inluvac foi maior em um doador saudável quando comparado com o doente (107 versus 10 linfócitos T CD4 de memória específicos para Inluvac por milhão). Esta discrepância entre controle e paciente pode ser explicada pelos defeitos sistêmicos aos quais o sistema imune dos indivíduos com câncer pode estar sujeito. Assim, devido à atividade imunossupressora dos tumores, os resultados encontrados na biblioteca do paciente poderiam estar subestimando o número de linfócitos T específicos para cada antígeno.

Figura 15 – Análise da biblioteca de linfócitos T CD4 sanguíneos de um paciente com carcinoma hepatocelular. Proliferação (cpm) e índice de estimulação de linfócitos T CD4 de memória sanguíneos de um paciente com câncer estimulados com linfócitos B sem antígenos exógenos, ou carregados com vacina de influenza (Inluvac) ou, ainda, peptídeos tumorais (MHC II t-pep).



Mesmo com estas limitações técnicas, ainda fomos capazes de encontrar linfócitos T CD4 de memória específicos para neoantígenos no sangue do paciente, com uma frequência calculada de 21 linfócitos T específicos por milhão, portanto, superior à observada no doador saudável. Linfócitos T CD8 específicos para proteínas mutadas já foram encontrados no sangue de indivíduos com câncer utilizando diferentes técnicas (COHEN et al., 2015; GROS et al., 2016). Cohen e coautores utilizaram a marcação com tetrâmero específico, e descobriram que, para a maioria dos antígenos testados, esta era indistinguível do background de marcação inespecífica obtido com o painel. Porém, quando isolados e expandidos, os linfócitos T considerados positivos para a marcação com o tetrâmero tumoral eram capazes de responder especificamente ao neoantígeno tumoral, mostrando que linfócitos T CD8 específicos para neoantígenos podiam ser encontrados em frequência muito baixa no

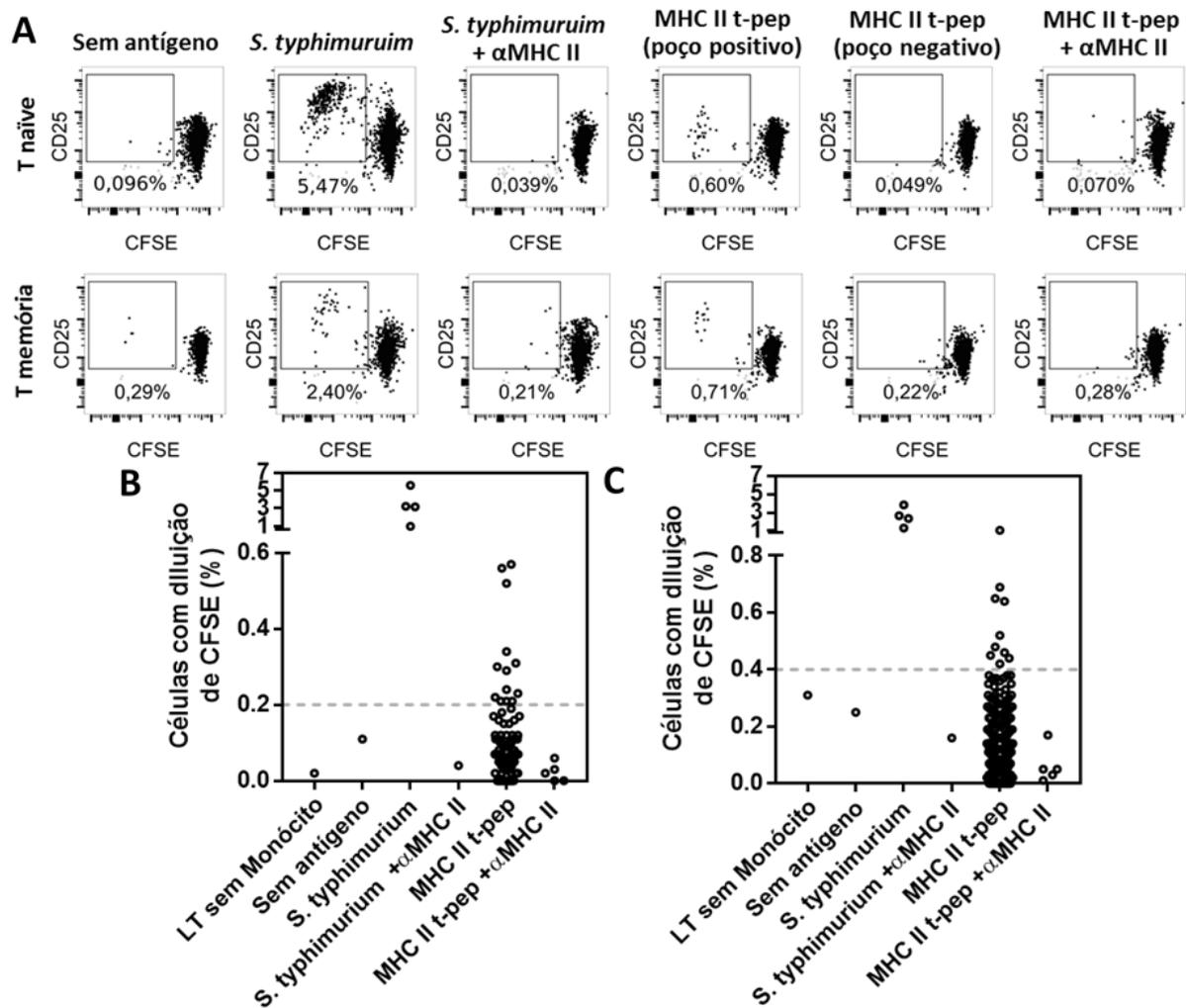
sangue de pacientes (COHEN et al., 2015). Gros e coautores também encontraram raros linfócitos T CD8 específicos para neoantígenos no sangue de indivíduos com melanoma, utilizando a expressão de PD-1 como forma de enriquecer as células T específicas para o tumor (GROS et al., 2016). Ambos os artigos, no entanto, se concentraram em linfócitos T CD8. Relatos sobre linfócitos T CD4 específicos para neoantígenos no sangue de pacientes com câncer são escassos. Os resultados aqui apresentados, portanto, são importantes por demonstrarem a presença de linfócitos T CD4 específicos para antígenos mutados no sangue de indivíduos saudáveis e no de indivíduos com câncer. A importância real destas células CD4 para a resposta imune antitumoral não tem sido suficientemente considerada ou debatida, embora um número crescente de relatos mostre que os linfócitos T CD4 podem desempenhar um importante papel, independente do CD8, no controle do câncer (DOBRZANSKI, 2013; GERLONI; ZANETTI, 2005; HAABETH et al., 2014).

4.1.2 *Estimulação ex vivo de linfócitos T CD4 e CD8 com neoantígenos*

A abordagem de bibliotecas de linfócitos T, apesar de ser muito útil, tem uma limitação quanto ao número de linfócitos T que podem ser rastreados. Embora se possa fazer um número muito grande de linhagens de linfócitos T, o número de APC necessárias para fazer a triagem de todas estas linhagens seria maior do que o que poderíamos obter, mesmo utilizando o método de expansão de linfócitos B. Uma vez que os linfócitos T específicos para o tumor são raros, pode ser muito difícil identificar estas células no contexto das bibliotecas. Além disso, devido ao possível estado de exaustão dos linfócitos T de pacientes com câncer, a expansão necessária para gerar a biblioteca pode gerar a morte destas células (dados não mostrados). Assim, desenvolvemos um novo método a partir do conceito de triagem de bibliotecas de linfócitos T, de modo a adaptar a metodologia para o contexto tumoral. Para isto, ao invés de dividir alguns linfócitos T por poço e expandí-los para gerar as bibliotecas, estimulamos diretamente *ex vivo* todos os linfócitos T na amostra, a uma concentração de 50.000 linfócitos T por poço, e avaliamos cada poço individualmente quanto a proliferação celular por meio de diluição do CFSE. Deste modo, todas os linfócitos T poderiam ser interrogados para os antígenos tumorais e sua análise funcional poderia ser feita por meio do isolamento das células CFSE^{low} presentes em cada poço. Também, a partir do número de poços que não mostraram reação ao antígeno, seria

possível calcular a frequência de linfócitos T específicos para o antígeno, da mesma forma que se faz nas bibliotecas.

Figura 16 – Estimulação *ex vivo* de linfócitos T CD4 com peptídeos tumorais. (A) Gráficos representativos mostrando a frequência de linfócitos T que mostram a diluição de CFSE após a cocultura de linfócitos T CD4 *naïve* e de memória com monócitos carregados com *S. typhimurium* ou MHC II t-pep. (B) Gráfico da porcentagem de células com diluição de CFSE obtida em cada poço da estimulação *ex vivo* de linfócitos T CD4 *naïve*. (C) Gráfico da porcentagem de células com diluição de CFSE obtida em cada poço da estimulação *ex vivo* de linfócitos T de memória total.



Evidentemente, esta técnica para determinar a frequência de linfócitos T reativos contra antígenos só deve funcionar para aqueles contra os quais a frequência seja baixa, uma vez que, se esta for alta, todos os poços plaqueados (com um alto número de linfócitos T) conteriam pelo menos uma célula específica para o antígeno, como aconteceu com a *Salmonella typhimurium* (Figura 16), impedindo a análise da frequência de precursores (que depende do número de poços não reativos para o antígeno). É importante notar que um inconveniente desta técnica é a de que apenas

um antígeno pode ser utilizado por poço, ao contrário da biblioteca, onde, após a expansão inicial, se podem utilizar tantos antígenos quanto desejado para se fazer a análise de um mesmo poço.

Utilizando esta técnica, fomos capazes de encontrar linfócitos T CD4 *naïve* e de memória que proliferaram em resposta aos neoantígenos (Figura 16). A se notar, os "poços positivos" mostraram apenas uma pequena frequência de linfócitos T proliferantes, o que é compreensível, uma vez que se espera que cada poço não contenha mais do que um único linfócito T específico para o antígeno.

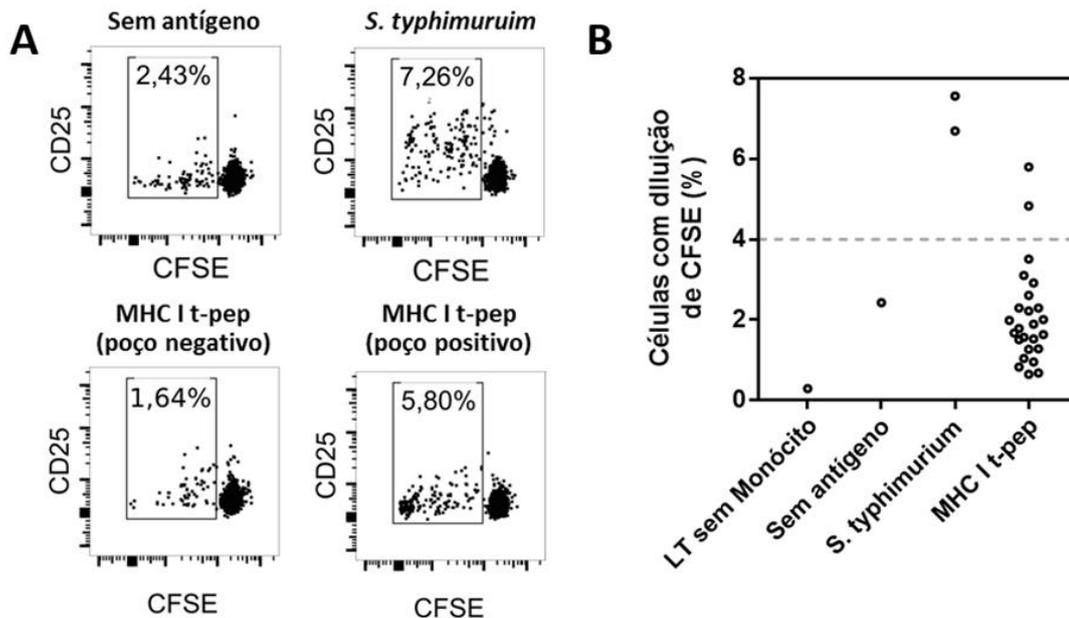
*A baixa frequência das células específicas para antígenos tumorais dificulta a discriminação entre poços positivos e negativos, uma vez que a proliferação de fundo pode facilmente ser mal interpretada como proliferação de linfócitos T específicos para o antígeno. Portanto, para facilitar esta discriminação, nos experimentos que se seguiram com a análise de linfócitos T específicos para Her2 e para lisados, múltiplos poços de linfócitos T foram estimulados com APC sem adição de antígenos exógenos, sendo determinado, como limiar para positividade, o valor da média + 1,96 * (desvio padrão) da porcentagem de células CFSE^{low}CD25⁺ encontrada nestes poços controles.*

A frequência de linfócitos T CD4 de memória reativos para neoantígenos encontrada no doador saudável utilizando esta técnica (0,81 células por milhão) foi menor do que a obtida com a biblioteca de células T (5 células por milhão). Porém, linfócitos T *naïve* reativos para neoantígenos foram encontrados (2,15 células por milhão), o que não ocorreu quando se utilizou a biblioteca. Em teoria, a biblioteca facilitaria a avaliação de linfócitos T *naïve*, uma vez que estes já teriam se transformado em memória pelo processo de geração destas bibliotecas, aumentando a resposta proliferativa destes linfócitos T quando desafiados com o antígeno para o qual são específicos. Ainda assim, o método de estimulação *ex vivo* mostrou-se mais sensível para linfócitos T *naïve* no contexto de tumores, provavelmente devido ao maior número de linfócitos T avaliados (5.400.000), quando comparado com a menor amostra que é avaliada nas bibliotecas (400.000), conforme previamente discutido.

Um experimento de estimulação *ex vivo* foi feito para também avaliar a frequência de linfócitos T CD8 de memória reativos para neoantígenos em um doador

saudável. Neste caso, conforme indicado por nossos resultados, a adição de linfócitos T CD4 como células *feeder* mostrou-se necessária (APÊNDICE B). Sendo assim, foram utilizados linfócitos T CD4 alogeneicos irradiados como células *feeder*. Nestas condições, dois de 25 poços mostraram positividade para peptídeos tumorais restritos pelo MHC de classe I (MHC I t-pep) (Figura 17), o que gera uma frequência calculada de precursores de 1,66 linfócitos T específicos por milhão, perto do obtido para linfócitos T CD4.

Figura 17 – Estimulação *ex vivo* de linfócitos T CD8 de memória com peptídeos tumorais. (A) Gráficos representativos mostrando a frequência de linfócitos T CD8 de memória que mostram a diluição de CFSE após a cocultura com linfócitos T CD4 alogeneicos e monócitos carregados com *S. typhimurium* ou MHC I t-pep. (B) Gráfico da porcentagem de células com diluição de CFSE obtida em cada poço da estimulação *ex vivo* de linfócitos T CD8 de memória.



É possível notar o alto background de proliferação observado neste experimento, que provavelmente foi devido ao uso de linfócitos T CD4 alogeneicos como células *feeder*, que podem ter dado origem a antígenos alogeneicos passíveis de serem apresentados pelas APC, gerando uma proliferação alta mesmo na ausência do antígeno tumoral. Levando este resultado em consideração, os próximos ensaios de estimulação *ex vivo* com Her2 e lisados tumorais foram realizados sem a separação de linfócitos T CD4 e CD8. Deste modo, a especificidade de ambos linfócitos poderia ser determinada no mesmo poço, e a utilização de linfócitos T CD4 alogeneicos para determinação da reatividade dos linfócitos T CD8 poderia ser evitada.

4.2 Frequência dos linfócitos T reativos para Her2

Apesar de muito se saber com relação a presença e frequência de linfócitos T específicos para antígenos tumorais mutados (neoantígenos), pouco se sabe sobre o repertório de linfócitos T que reconhecem antígenos não-mutados, como é o caso do Her2, uma proteína que se encontra superexpressa em cerca de 30% dos tumores de mama do tipo ductal invasivo. Estes são, então, classificados como do subtipo Her2, apresentam comportamento clínico característico e mais agressivo (WITHERBY et al., 2016). Na verdade, a superexpressão deste gene não é exclusiva dos tumores de mama, ocorrendo em diferentes carcinomas (IQBAL; IQBAL, 2014). Deste modo, achamos interessante avaliar a frequência de linfócitos T específicos para essa proteína em doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama com diferentes subtipos.

4.2.1 Marcação de linfócitos T CD8 com multímeros carregando Her2

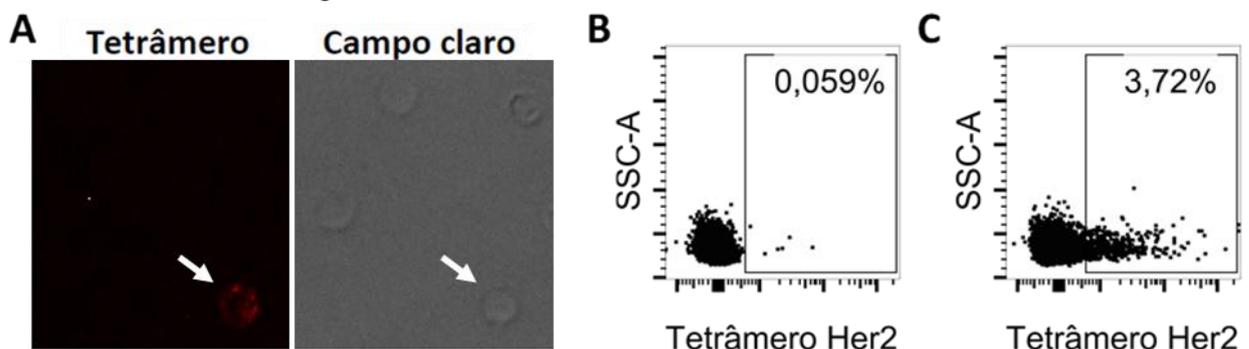
Primeiramente, analisamos a frequência de linfócitos T CD8 capazes de se ligar a um tetrâmero contendo um peptídeo do Her2 em doadores saudáveis e indivíduos com câncer de mama. O tetrâmero escolhido para análise foi o “iTAg MHC Tetramer – HLA-A*0201 Her2/neu Tetramer – KIFGSLAFL – PE”, da empresa MBL international. Este tetrâmero foi escolhido, em detrimento dos outros tipos de multímeros e tetrâmeros de outras empresas, por conter uma mutação na cadeia constante da molécula de MHC de classe I, de modo a impedir a ligação do CD8 ao tetrâmero, diminuindo os problemas de marcação inespecífica, muito comuns nesse tipo de análise. Este tetrâmero comercial se encontra carregado com o peptídeo KIFGSLAFL (também conhecido como E75), que é o peptídeo mais estudado da molécula Her2/neu, havendo, inclusive, ensaios clínicos utilizando tal peptídeo (MITTENDORF et al., 2008).

Em um ensaio piloto com o produto de uma amostra obtida de câmara de leucorredução, fomos capazes de observar, no microscópio de fluorescência, células positivas para o tetrâmero, com marcação de membrana, conforme esperado (Figura 18A). Devido à baixa frequência de linfócitos T específicos para antígenos tumorais, uma etapa de enriquecimento da amostra é sempre indicada para avaliar linfócitos T específicos para antígenos tumorais na ausência de um estímulo (LEGOUX; MOON,

2012). Este enriquecimento é feito utilizando-se esferas magnéticas anti-PE. O PE (ficoeritrina) é o fluorocromo ao qual o tetrâmero está conjugado para permitir que sua ligação com a célula possa ser visualizada por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. Assim, as células que se ligarem ao tetrâmero podem ser separadas das demais por sua ligação a esferas magnéticas recobertas com anticorpos contra o PE. Aquelas ligadas ao tetrâmero ficam retidas em coluna magnética e essa fração, uma vez eluída da coluna, contém uma população enriquecida em linfócitos T tetrâmero-específicos.

De fato, na ausência de enriquecimento, apenas 7 células em 12000 linfócitos T CD8 foram positivas para o tetrâmero (Figura 18B). Após seleção, a porcentagem de células positivas subiu para quase 4% (Figura 18C). Vale ressaltar que a capacidade de enriquecimento da coluna, apesar de ser alta e poder enriquecer em mais de 100 vezes a população de interesse, ainda é limitada (LEGOUX; MOON, 2012). Vale notar também que o processo de enriquecimento pode deixar escapar células positivas para o tetrâmero, tornando importante a leitura no citômetro das duas frações (células retiradas e células não-retidas na coluna) obtidas após a seleção (MOON et al., 2009).

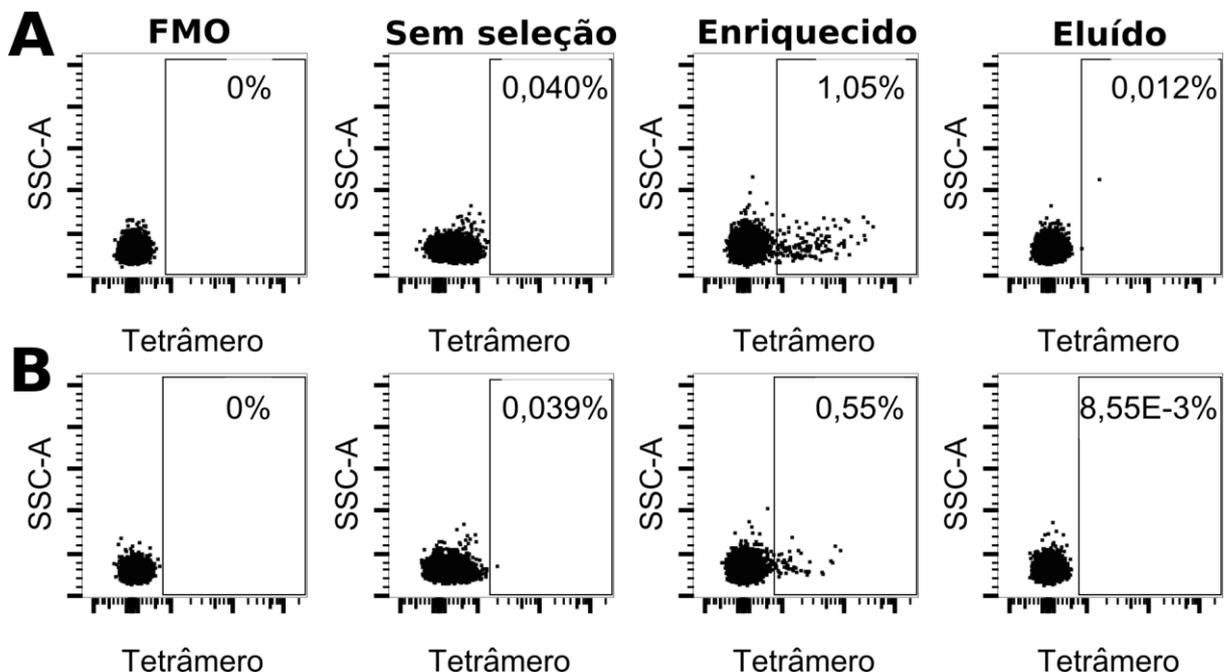
Figura 18 – Análise por tetrâmero em amostra de câmara de leucorredução. (A) Fotos de um linfócito T específico para o tetrâmero visualizado por microscopia de fluorescência. (B) Gráfico da marcação de linfócitos T com o tetrâmero de HLA-A2 com peptídeo do Her2. (C) Gráfico da marcação de linfócitos T com o tetrâmero de HLA-A2 com peptídeo do Her2 conjugado à PE, após enriquecimento da amostra com auxílio de esferas magnéticas anti-PE.



Vale notar que este tetrâmero é composto de quatro moléculas de HLA-A*0201, que é um dos alelos de MHC de classe I mais abundantes entre as diferentes etnias, estando presente, segundo dados de 2014 da REDOME (Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea), em 25% da população de São Paulo (GONZÁLEZ-

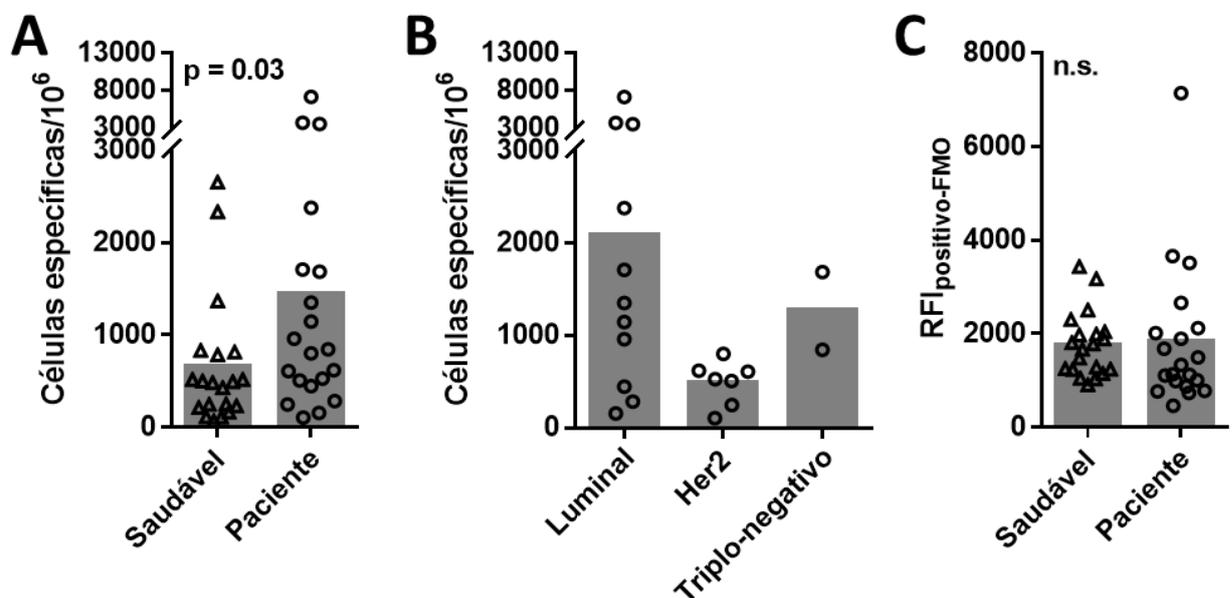
GALARZA et al., 2015). Intrigantemente, um tetrâmero HLA-A2 ainda é capaz de se ligar e marcar células de um doador que não seja positivo para HLA-A2 (TSAI et al., 2004), um fenômeno também observado em nossos experimentos, apesar dessa marcação ter ocorrido em um menor número de células, e com uma menor intensidade (Figura 19). Provavelmente, estes pacientes que apresentam linfócitos T que são capazes de se ligar ao tetrâmero de HLA-A2 apresentam um alelo de HLA semelhante ao HLA-A2, e, portanto, seus linfócitos são capazes de se ligar ao tetrâmero, mas de uma maneira mais fraca, conforme mostrado pela menor intensidade de marcação. Assim, linfócitos T de doadores negativos para HLA-A2 são capazes de se ligar ao tetrâmero, mas devido à possibilidade de interações alogenicas, não somos capazes de fazer inferências sobre a especificidade de tais linfócitos apenas pela sua capacidade de se ligar ao tetrâmero.

Figura 19 – Análise de reatividade com tetrâmeros em doador positivo e negativo para HLA-A2. (A) Marcação com tetrâmeros em linfócitos T CD8 de um paciente HLA-A2 positivo. (B) Marcação com tetrâmeros em linfócitos T CD8 de um paciente HLA-A2 negativo. FMO: células marcadas com o painel exceto com os tetrâmeros (*fluorescence minus one*), usado para determinar o *gate* de positividade. Sem seleção: linfócitos T marcados com o tetrâmero, mas que não passaram pelo processo de seleção e enriquecimento. Enriquecido: amostra de linfócitos T que foi enriquecida para reatividade com o tetrâmero por sua ligação a esferas magnéticas anti-PE. Eluído: linfócitos T que passaram pela coluna de enriquecimento para reatividade com os tetrâmeros, mas não se ligaram à mesma.



Estes experimentos foram, então, utilizados para estabelecer as melhores condições de marcação com o tetrâmero, determinando-se que: (1) apenas amostras de doadores positivos para HLA-A2 seriam utilizadas nas análises; (2) o enriquecimento seria feito em todas as amostras de modo a se obter uma população mais expressiva de linfócitos T específicos para Her2 para análise do fenótipo destas células e; (3) a fração eluída, assim como os resultados obtidos com a utilização de esferas de contagem, seriam empregados para determinar a frequência real de linfócitos T específicos (o cálculo da frequência foi feito utilizando os dados da fração enriquecida e eluída da seleção, conforme explicado na sessão de Material e Métodos).

Figura 20 – Frequência e intensidade de fluorescência de células positivas para o tetrâmero em controles e pacientes. (A) Número de linfócitos T específicos para o tetrâmero de Her2 em doadores saudáveis (n=20) e pacientes com câncer de mama (n=20). (B) Número de linfócitos T específicos para o tetrâmero de Her2 em doentes com tumores dos subtipos Luminal, Her2 ou Triplo-negativo. (C) Intensidade relativa de fluorescência (RFI) da marcação para o tetrâmero nos linfócitos T que são capazes de se ligar ao mesmo em doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama. O RFI foi calculado subtraindo-se da intensidade mediana de fluorescência (MFI) das células positivas para o tetrâmero, o valor de MFI no canal PE obtido no tubo de FMO para o tetrâmero (e, portanto, não marcado para o tetrâmero).



Apesar da grande variação da frequência de linfócitos T específicos para o tetrâmero, pacientes apresentaram, quando comparados aos controles, uma frequência significativamente maior de linfócitos T específicos para Her2 (Figura 20A; frequência de linfócitos T Her2-específicos em doadores saudáveis: 490 ± 706 , n=20,

versus frequência de linfócitos T Her2-específicos em pacientes com câncer de mama: 825 ± 1703 , $n=20$; $p=0,030$). Esta diferença, aparentemente esperada, torna-se surpreendente quando os doentes são estratificados de acordo com seu subtipo de tumor (Figura 20B). Intrigantemente, enquanto indivíduos com tumores do subtipo Luminal são os que apresentam maior quantidade de linfócitos T específicos para Her2, pacientes com tumores que superexpressam Her2 (portanto, do subtipo Her2) apresentaram quantidade significativamente menor de linfócitos específicos para o tetrâmero (frequência de linfócitos T Her2-específicos em pacientes com tumores não-Her2: 1352 ± 1935 , $n=13$, versus frequência de linfócitos T Her2-específicos em pacientes com câncer de mama do subtipo Her2: 529 ± 236 , $n=7$; $p=0,019$). Não houve diferenças significativas quanto a intensidade de marcação para o tetrâmero, que é uma medida indireta da afinidade desses linfócitos (Figura 20C) (WOOLDRIDGE et al., 2009).

Um primeiro estudo utilizando dímeros de HLA-A2 carregados com o mesmo peptídeo aqui estudado mostrou uma frequência de linfócitos T marcados bastante elevada, de até 8% dos linfócitos T CD8, no sangue de pacientes com câncer de mama (WOLL et al., 2004). Por outro lado, outro estudo do mesmo grupo, utilizando os mesmos dímeros, já reporta valores mais próximos dos aqui observados, de 2.200 a 7.200 linfócitos T Her2-específicos por milhão de linfócitos T CD8 (HUEMAN et al., 2007). Apesar de não sermos capazes de explicar tal discrepância, que não é abordada em tais artigos, podemos sugerir algumas possíveis explicações para as diferenças nas porcentagens de linfócitos T Her2-específicos entre estes trabalhos e os aqui obtidos. Ao comparar a marcação de dímeros com o de tetrâmeros para o peptídeo E75 do Her2, o próprio grupo mostrou que a frequência encontrada com os tetrâmeros foi menor (WOLL et al., 2004), o que poderia ser devido à maior marcação inespecífica que é obtida com os dímeros.

Ainda na mesma linha, o tetrâmero utilizado aqui apresenta uma mutação na porção constante do HLA-A2, que impede sua ligação ao CD8. Isto diminui a marcação inespecífica, mas, ao mesmo tempo, restringe a detecção apenas aos clones com maior afinidade de ligação com o complexo peptídeo-MHC (CHOI et al., 2003). Isto pode explicar a discrepância de nossos resultados quando comparado com um trabalho recente utilizando estreptômeros, uma outra formulação de multímeros de MHC (KUZNETSOVA et al., 2019). Neste trabalho, Kuznetsova e colaboradores mostraram que pacientes com câncer de mama do subtipo Her2 apresentavam uma

frequência significativamente maior de linfócitos T capazes de se ligar aos estreptômeros carregando o peptídeo E75 do Her2, quando comparado a indivíduos saudáveis. Assim, é possível que indivíduos com tumores do subtipo Her2 apresentem uma expansão de linfócitos T com baixa afinidade à proteína, mas mantenham a mesma frequência observada em doadores saudáveis de linfócitos T com maior afinidade pelo mesmo peptídeo.

É importante ressaltar que a análise com multímeros é restrita a um único peptídeo da molécula Her2, e não é, necessariamente, representativa da resposta completa contra esta proteína. Para avaliar tal resposta, realizamos experimentos utilizando a proteína recombinante Her2, em protocolos de estimulação *ex vivo*.

4.2.2 *Estimulação ex vivo de linfócitos T CD4 e CD8 com Her2 recombinante*

Visando avaliar a frequência total de linfócitos T CD4 e CD8 capazes de reconhecer a molécula Her2, utilizamos o protocolo de estimulação *ex vivo* delineado de maneira semelhante ao explicado nos experimentos com neoantígenos. Para isto, linfócitos T de doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama foram desafiados com DC carregadas com a proteína recombinante Her2. Células dendríticas foram utilizadas como APC devido a sua capacidade superior de ativar linfócitos T (APÊNDICE A). A proliferação foi avaliada pela diluição do CFSE e expressão de CD25, sendo considerados positivos, os poços com porcentagem de linfócitos T CFSE^{low}CD25⁺ maior do que a média mais 1,96 vezes o desvio padrão da porcentagem de linfócitos T CFSE^{low}CD25⁺ encontrada nos poços estimulados com DC não carregada com nenhum antígeno. Deste modo, um intervalo de confiança de 95% pôde ser construído, considerando-se que a proliferação basal nas amostras segue uma distribuição normal. Em seguida, a frequência de linfócitos T específicos (células/milhão) foi determinada utilizando-se o número de poços negativos e a distribuição de Poisson.

A frequência calculada de linfócitos T reativos para Her2 foi bem menor neste ensaio do que a obtida com a marcação por tetrâmeros (frequência de linfócitos T CD8 específicos para tetrâmero em pacientes: 1443 ± 1703 , $n=20$, versus frequência de linfócitos T CD8 Her2-reativos em pacientes: $28,2 \pm 62,3$, $n=14$; $p<0,0001$). Este resultado pode parecer surpreendente, dado que a frequência de linfócitos T reativos para vários epítomos do mesmo antígeno foi inferior à calculada utilizando um único

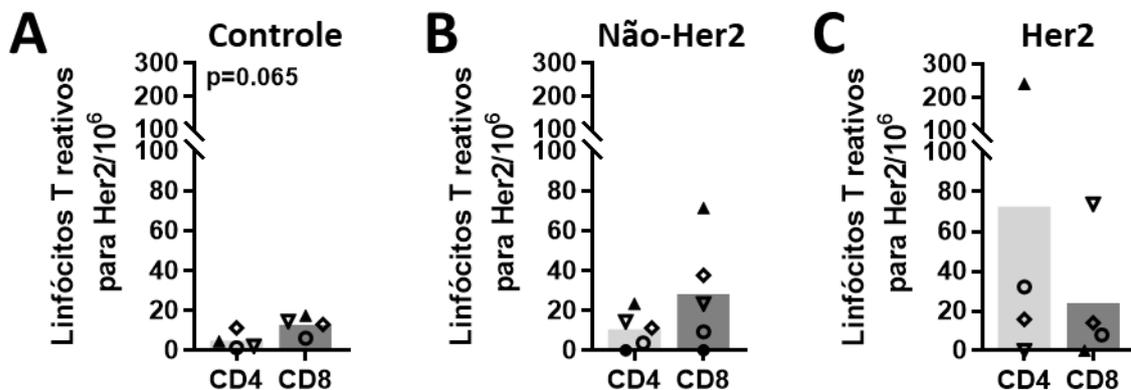
epítopo, mas pode ser decorrente das diferenças essenciais entre os dois métodos. A análise por tetrâmeros releva apenas quais linfócitos T são capazes de se ligar, com estabilidade, ao complexo formado pelo peptídeo com a molécula de MHC, enquanto que a análise *ex vivo* permite determinar quais linfócitos T são capazes de proliferar em resposta ao antígeno. Esta interpretação, aliada aos resultados que obtivemos, indica que a maioria dos linfócitos T que se ligam ao tetrâmero carregado com um peptídeo de Her2 não é capaz de proliferar quando desafiada com APC carregadas com este mesmo antígeno. De fato, isto é coerente com a observação de que apenas uma fração dos linfócitos T capazes de se ligar a um pentâmero específico para melan-A, um antígeno presente em melanócitos e células tumorais de melanoma, foram capazes de proliferar quando desafiados com o mesmo peptídeo contido no pentâmero, no contexto das bibliotecas de linfócitos T (GEIGER et al., 2009). Fatores como a afinidade do linfócito T pelo antígeno e o tempo de interação entre estas células e APC, correlacionados com a avidéz antigênica, estão diretamente relacionados a capacidade proliferativa dos linfócitos T (ROTHOEFT et al., 2006). Apesar da marcação com os tetrâmeros se dever à interação direta destes com o TCR, a frequência de células marcadas costuma ser superior à encontrada com ensaios funcionais de proliferação ou ELISPOT (WEDER et al., 2012). Sendo assim, estudos de ligação com multímeros podem superestimar a frequência de células T capazes de exercer uma função efetora frente a um dado antígeno, o que reforça a necessidade do uso de ensaios alternativos para o estudo de linfócitos T específicos.

De qualquer modo, a frequência de linfócitos T CD4 e CD8 específicos para Her2 em doadores saudáveis foi, de modo geral, mais homogênea e menor do que a encontrada nos pacientes com câncer de mama (Figura 21). Já foi mostrado que a presença de linfócitos T Her2-específicos medido por multímeros no sangue de indivíduos com câncer de mama se correlaciona com a presença de atividade citotóxica, proliferação e produção de IFN- γ por linfócitos T de maneira antígeno-específica (WOLL et al., 2004). Porém, a literatura carece de estudos que façam uma comparação direta entre a frequência de linfócitos T específicos obtida por diferentes técnicas.

Ensaio de ELISPOT mostraram que apenas linfócitos T provenientes do sangue de pacientes com câncer de mama do subtipo Her2 foram capazes de superar a frequência de 12 linfócitos T reativos para o peptídeo E75 por milhão (SOTIROPOULOU et al., 2003). Ao contrário deste estudo e do que observamos com

o uso de tetrâmeros, a frequência de linfócitos T CD8 reativos para Her2 entre doentes com tumores com ou sem superexpressão deste marcador foi parecida quando, aqui, se utilizou o ensaio de estimulação *ex vivo*. Por outro lado, a frequência que foi relatada usando o ELISPOT para interferon-gama (SOTIROPOULOU et al., 2003) foi parecida com a que encontramos usando o nosso ensaio de proliferação. Por outro lado, encontramos uma frequência de linfócitos T CD4 reativos para Her2 maior em indivíduos com tumores do subtipo Her2, embora não estatisticamente significativa. Intrigantemente, a relação entre linfócitos T CD4 e CD8 parece se inverter nos pacientes com tumores Her2: enquanto todos os controles e indivíduos com tumores de mama sem superexpressão de Her2 apresentaram uma frequência maior de linfócitos T CD8 do que de linfócitos T CD4 reativos para Her2, três dos quatro pacientes com tumores Her2 analisados apresentaram uma frequência maior de linfócitos T CD4, e não de linfócitos T CD8, reativos para Her2.

Figura 21 – Estimulação *ex vivo* de linfócitos T com a proteína recombinante Her2. Linfócitos T foram estimulados com DC carregadas com a proteína recombinante Her2, em poços independentes, que após 5 dias foram avaliados por citometria quanto a presença de células com diluição de CFSE e expressão de CD25. A frequência de linfócitos T reativos foi então calculada utilizando a distribuição de Poisson e o número de poços considerados não reativos para o antígeno. (A) Frequência de linfócitos T CD4 e CD8 específicos para Her2 sangue de doadores saudáveis (n=4). (B) Frequência de linfócitos T CD4 e CD8 específicos para Her2 sangue de pacientes com câncer de mama sem superexpressão de Her2 (n=5). (C) Frequência de linfócitos T CD4 e CD8 específicos para Her2 no sangue de pacientes com câncer de mama do subtipo Her2 (n=4). O eixo Y mostra o número de linfócitos T CD4 ou CD8 reativos para Her2 por milhão de células T CD4 ou CD8, respectivamente. Cada símbolo representa um doador diferente.



4.3 Frequência de linfócitos T reativos para tumores de mama

Apesar da análise da presença de linfócitos T capazes de reconhecer certos antígenos tumorais ser possível por meio da marcação com tetrâmeros, uma avaliação mais ampla da frequência de linfócitos T capazes de reagir contra um determinado tumor necessita da utilização de técnicas mais “antígeno-abrangentes”. Estes métodos geralmente consistem na avaliação da citotoxicidade específica ou da produção de citocinas (como a técnica de ELISPOT para IFN- γ) como indicativos da especificidade dos linfócitos T. Apesar de válidos, especialmente para o compartimento de linfócitos T CD8, estas estratégias restringem a avaliação para células com um determinado fenótipo, como a expressão de uma citocina, ou função, como a capacidade de eliminar células tumorais. Assim, visando estimar mais amplamente a frequência de linfócitos T reativos para um determinado tumor, independentemente de uma função específica destas células, utilizamos o ensaio de estimulação *ex vivo* e, como fontes de antígenos, lisados de células tumorais. Os resultados mostrados nesta sessão foram recentemente publicados na revista *Oncoimmunology* (PINHO et al., 2019).

4.3.1 Comparação entre lisados de células de linhagens e amostras primárias

Para avaliar a frequência de linfócitos T reativos contra antígenos tumorais no sangue de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de mama, usamos lisados de células de três linhagens celulares modelo de diferentes subtipos de câncer de mama: MCF-7, uma linhagem celular de câncer de mama luminal; SK-BR-3, uma linhagem celular de câncer de mama com superexpressão de Her2; e MDA-MB-231, uma linhagem celular de câncer da mama triplo-negativo. Os lisados destas linhagens celulares podem ser facilmente gerados e armazenados e, se as frequências de linfócitos T reativas para tumor encontradas com seu uso fossem comparáveis àquelas encontradas em amostras de pacientes, isso eliminaria a necessidade de obtenção de amostras tumorais dos doentes para esta análise.

Fomos capazes de encontrar linfócitos T CD4 e CD8 reativos para pelo menos uma das três linhagens celulares no sangue de todos os doadores saudáveis estudados (Figura 22). A frequência de linfócitos T reativos para as linhagens no sangue de indivíduos com câncer de mama do subtipo luminal foi semelhante à

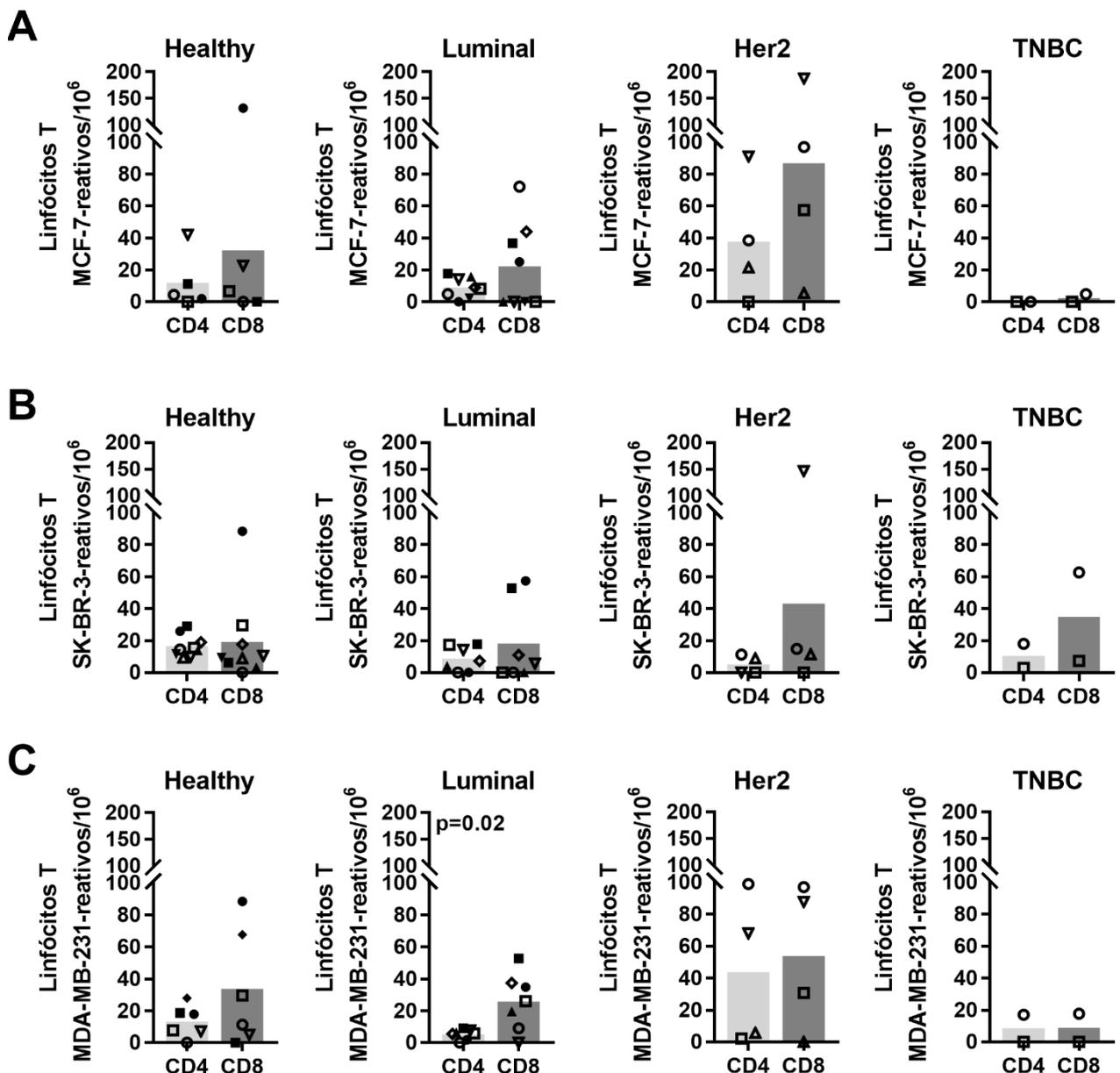
encontrada em doadores saudáveis. Inesperadamente, os pacientes portadores de tumores do subtipo Her2 foram os que apresentaram a maior frequência de linfócitos T reativos para as linhagens de células tumorais, enquanto os indivíduos com câncer de mama triplo-negativo apresentaram as frequências mais baixas. Em metade dos pacientes com tumores luminais, não fomos capazes de detectar linfócitos T CD8 reativos para o MCF-7, a linhagem celular descrita como tendo o mesmo subtipo do tumor do doente. Curiosamente, não houve diferença entre a frequência de linfócitos T reativos para a linhagem celular correspondente ao mesmo subtipo do tumor dos pacientes e as outras linhagens celulares. Em geral, indivíduos saudáveis e doentes com câncer da mama apresentaram, no sague, tendência a ter frequências de linfócitos T CD8 maior do que a frequência de linfócitos T CD4 tumor-reativos. No entanto, essa maior frequência de linfócitos T CD8 foi estatisticamente significativa apenas para pacientes com tumores luminais desafiados com a linhagem celular de tumor triplo-negativo (Figura 22C).

Nós também desafiamos os linfócitos T (de doadores saudáveis e de pacientes) com DC autólogas carregadas com lisados *ex vivo* de tumores obtidos de diferentes amostras de câncer de mama. Indivíduos saudáveis mostraram frequências de linfócitos T tumor-reativos, quando desafiados com lisados tumorais obtidos a partir de amostras *ex vivo*, semelhantes às obtidos contra lisados de linhagens celulares (Figura 23A). Curiosamente, indivíduos com câncer de mama luminal, quando desafiados com lisados provenientes de amostras *ex vivo* de diferentes pacientes, pareciam ter mais linfócitos T CD8 tumor-reativos, do que contra as linhagens celulares (Figura 23B). A mesma tendência de observar maiores frequências de células T tumor-reativas quando os antígenos para o desafio foram obtidos de amostras *ex vivo* estava presente em indivíduos com tumores do subtipo Her2 (Figura 23C), mas, neste caso, a tendência também ocorreu para linfócito T CD4.

Assim, comparando as frequências de linfócitos T tumor-reativos encontradas usando linhagens celulares – que poderiam ser uma boa fonte de antígenos tumorais – com amostras de tumores *ex vivo* obtidas de doentes com câncer de mama, encontramos diferenças significativas. Este fenômeno pode apontar para diferenças essenciais entre linhagens celulares e tumores *in vivo*, uma vez que as células tumorais frescas parecem compartilhar mais vias umas com as outras do que elas compartilham com linhagens de células tumorais (ERTEL et al., 2006). Embora esses dados não sejam definitivos, eles indicam que, quando se pretende estudar o

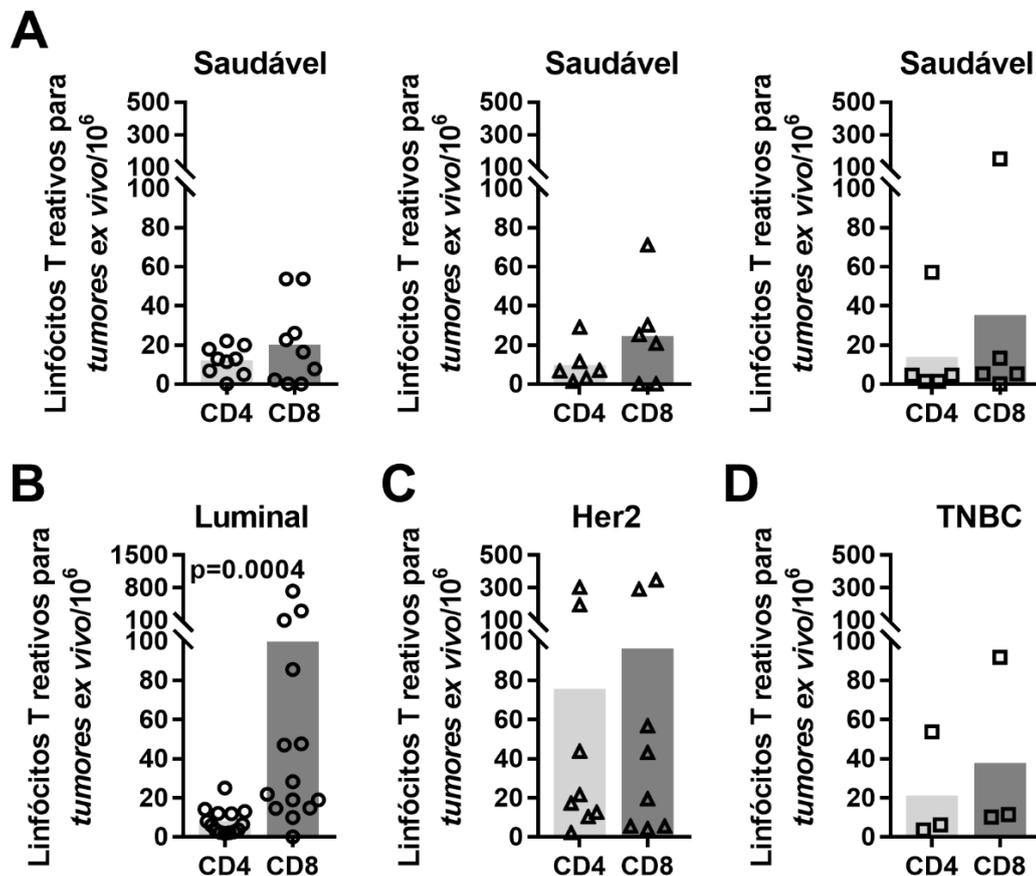
repertório imunológico de um paciente, sem ter uma amostra de tumor autólogo para isso, seria melhor usar outra amostra *ex vivo* ao invés de usar linhagens de células tumorais como fonte de antígenos tumorais.

Figura 22 – Frequência de linfócitos T tumores-reativos contra linhagens celulares no sangue de doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama. (A) Frequência de linfócitos T reativos para MCF-7 no sangue de doadores saudáveis (n=5), pacientes com câncer de mama do subtipo luminal (n=8), Her2 (n=4) ou triplo negativo (n=2). (B) Frequência de linfócitos T reativos para SK-BR-3 no sangue de doadores saudáveis (n = 9), pacientes com câncer de mama do subtipo luminal (n=7), Her2 (n=4) ou triplo negativo (n=2). (C) Frequência de linfócitos T reativos para MDA-MB-231 no sangue de doadores saudáveis (n = 6), pacientes com câncer de mama do subtipo luminal (n=7), Her2 (n=4) ou triplo negativo (n=2). O eixo Y mostra o número de linfócitos T CD4 ou CD8 reativos para os lisados por milhão de células T CD4 ou CD8, respectivamente. O valor p é apresentado apenas em gráficos onde foi encontrada uma diferença significativa. Cada símbolo representa um doador diferente.



Fonte: PINHO et al. 2019.

Figura 23 – Frequência de linfócitos T reativos a lisados de amostras de tumores *ex vivo*, no sangue de doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama. Os indivíduos foram testados contra múltiplas amostras de tumores *ex vivo* escolhidas aleatoriamente, exceto para pacientes triplo-negativos que foram desafiados apenas com o lisado de seus próprios tumores. Os símbolos representam o subtipo das células tumorais utilizadas para gerar o lisado do desafio (círculo = luminal; triângulo = Her2; quadrado = triplo negativo). (A) Frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue de doadores saudáveis capazes de reagir contra lisados de tumores *ex vivo* do subtipo luminal (n=9), Her2 (n=6) ou triplo negativo (n=5). (B) Frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue de pacientes com câncer de mama luminal capazes de reagir contra lisados de tumores *ex vivo* (n=15). (C) Frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue de pacientes com câncer de mama Her2 capazes de reagir contra lisados de tumores *ex vivo* (n=9). (D) Frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue de pacientes com câncer de mama triplo-negativo capazes de reagir contra lisados de tumores *ex vivo* (n=3). O eixo Y mostra o número de linfócitos T CD4 ou CD8 reativos por milhão de células T CD4 ou CD8, respectivamente. O valor p é mostrado apenas onde foi encontrada uma diferença significativa.



Fonte: PINHO et al. 2019.

Curiosamente, os indivíduos com câncer de mama luminal apresentaram frequências significativamente mais altas de linfócitos T CD8 reativas para tumores *ex vivo* do que linfócitos T CD4 tumor-reativos (Figura 23B). Este predomínio de linfócitos T CD8 reativos para os tumores *ex vivo* não foi claramente observado em indivíduos saudáveis nem em pacientes portadores dos outros subtipos de câncer de mama, que parecem ter frequências equivalentes de linfócitos T CD4 e CD8 tumor-reativos.

De modo geral, os pacientes com câncer parecem ter maior frequência de linfócitos T reativos para os tumores *ex vivo* no sangue do que os doadores saudáveis, exceto para os doentes com tumores triplo-negativo (Figura 23D). Pacientes com câncer de mama luminal apresentaram uma forte tendência de ter mais linfócitos T CD8 reativos para os lisados tumorais *ex vivo* do que doadores saudáveis (frequência de linfócitos T CD8 reativos ao tumor *ex vivo* em doadores saudáveis: $25,3 \pm 36,4$, $n=20$, versus frequência de linfócitos T CD8 reativos ao tumor *ex vivo* em pacientes com câncer de mama luminal: $103,0 \pm 196,1$, $n=14$; $p=0,077$). Esta tendência foi mais fraca, mas presente, para os linfócitos T CD4 e CD8 de indivíduos portadores de tumor do subtipo Her2, onde alguns destes tiveram uma frequência de linfócitos T reativos para os lisados *ex vivo* de tumores Her2 de pelo menos duas vezes mais do que as encontradas em doadores saudáveis com o mesmo tipo de lisado.

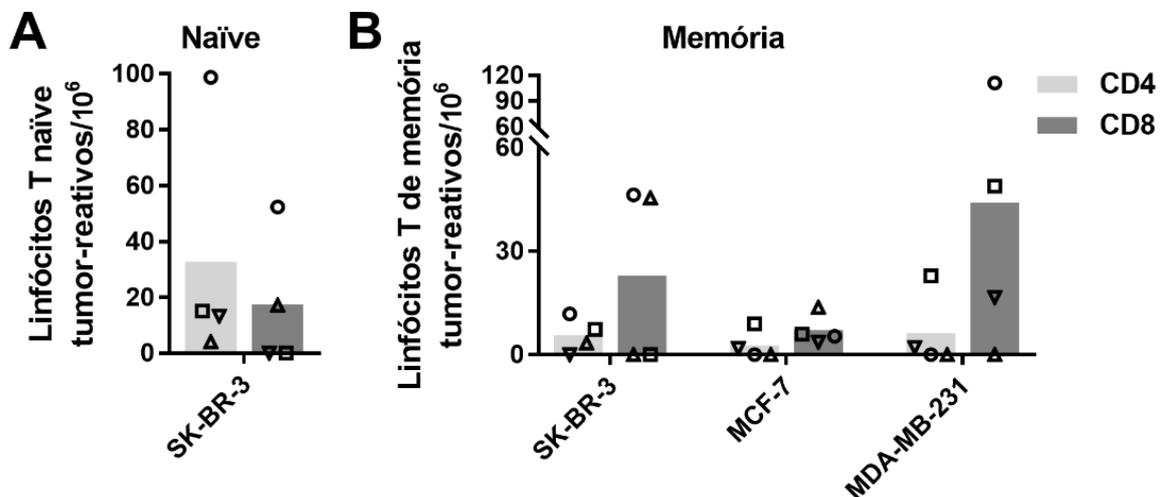
4.3.2 Linfócitos T de memória reativos para tumores em doadores saudáveis

A presença de linfócitos T tumor-reativos em doadores saudáveis é esperada, uma vez que o repertório do TCR é gerado antes e independentemente da exposição ao antígeno. No entanto, na ausência de exposição prévia ao tumor, estes linfócitos T deveriam estar no compartimento de células *naïve*. Para abordar esta questão, avaliamos se os linfócitos T reativos para tumores de mama encontrados no sangue de doadores saudáveis eram linfócitos T *naïve* ou de memória. Para isso, linfócitos T CD3⁺ foram isolados por separação celular acoplada a citometria de fluxo (FACS) em células CD45RA⁺CCR7⁺, correspondendo à população *naïve*, e nas demais, compreendendo todas as subpopulações de linfócitos T de memória. Ambos os linfócitos T *naïve* e de memória foram independentemente cocultivados com DC autólogas carregadas com lisados de células das linhagens tumorais.

Linfócitos T *naïve* reativos para SK-BR-3 foram encontrados em todos os doadores, dentre os linfócitos T CD4, mas apenas em alguns, dentre os linfócitos T CD8 (Figura 24A). No entanto, no compartimento de memória, linfócitos T CD4 e CD8 tumor-reativos foram encontrados no sangue de todos os indivíduos testados, contra pelo menos uma das três linhagens celulares tumorais utilizadas (Figura 24B). Assim, embora possa ser inesperado, indivíduos saudáveis apresentaram linfócitos T de memória tumor-reativos. Em contraste, na literatura, nenhuma célula T de memória para CMV foi encontrada, usando métodos de análise semelhantes, em doadores

soronegativos para CMV (GEIGER et al., 2009), o que aumenta a possibilidade de nosso achado representar, de fato, a presença de células de memória tumor-específicas nestes indivíduos. Também é importante notar que, embora na maioria dos experimentos, lisados alogênicos tenham sido utilizados, a proliferação observada não foi devido a um efeito alogeneico, uma vez que a frequência de linfócitos T reativos para lisados obtidos de PBMC alogeneicas foi muito baixa (Figura 25). Isso, mais uma vez, reforça a hipótese de que a proliferação observada foi devida à presença de linfócitos T específicos para antígenos associados a tumores presentes nos lisados de células tumorais, mas ausentes em PBMC normais. Vale lembrar que também foram encontrados, durante o estágio de pesquisa realizado na Suíça, linfócitos T de memória específicos para neoantígenos nos doadores saudáveis testados (ver 4.1.1).

Figura 24 – Frequência de linfócitos T *naïve* e de memória tumor-reativos no sangue de doadores saudáveis. (A) Número de linfócitos T *naïve* reativos para a linhagem tumoral SK-BR-3 por milhão de células T *naïve*; (B) Número de linfócitos T de memória tumor-reativos contra três linhagens celulares tumorais diferentes por milhão de células T de memória. Os dados foram obtidos de (A) e (B) correspondem ao mesmo conjunto de doadores (n = 4), cada um plotado com um símbolo diferente.

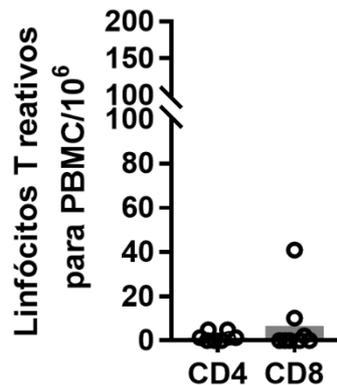


Fonte: PINHO et al. 2019.

A presença de linfócitos T de memória reativos para lisados de linhagens tumorais em indivíduos saudáveis pode ser vista como mais uma evidência para a vigilância imunológica contra o câncer. Esta teoria prediz que o sistema imunológico está constantemente pesquisando e eliminando células que se tornam malignas (EHRlich, 1909) e, se for verdade, essa eliminação deve ser rastreável, na forma de células de memória, como de fato encontramos, não só reativas para lisados de

linhagens tumorais, mas também para neoantígenos. Pode-se argumentar que estes linfócitos T reativos para tumores poderiam ter sido induzidos por reatividade cruzada com antígenos não tumorais e, portanto, não tenham relação com a vigilância contra tumores. Embora não possamos descartar essa hipótese, as tentativas de medir a frequência de linfócitos T com reatividade cruzada mostraram que este é um evento raro (PETROVA; FERRANTE; GORSKI, 2012). Além disso, independentemente do antígeno indutor, os linfócitos T de memória podem adquirir a capacidade de migrar para tecidos não-linfoides (ZHANG; LAKKIS, 2015). Portanto, estes linfócitos T de memória conferem ao sistema a capacidade de patrulhar todo o corpo e reagir na presença de antígenos tumorais.

Figura 25 – Frequência de linfócitos T reativos para lisados controle gerado com células do sangue (PBMC) de doadores normais. Número de linfócitos T CD4 e CD8 no sangue de 7 indivíduos saudáveis e um paciente que foram reativos para dois lisados controles gerados de PBMC diferentes.

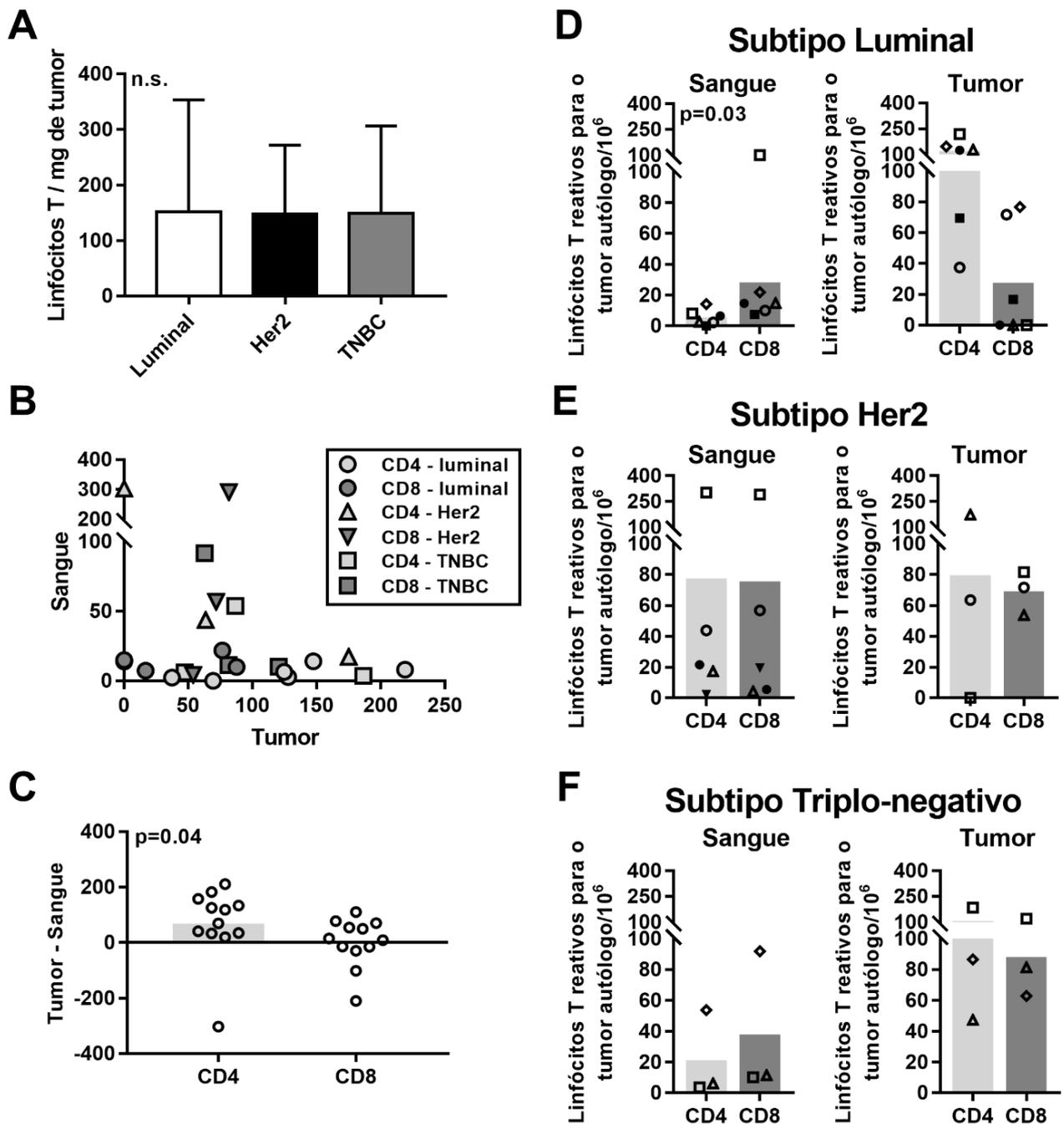


Fonte: PINHO et al. 2019.

4.3.3 Linfócitos T reativos para o tumor do próprio paciente

Por último, avaliamos, nos indivíduos com câncer de mama, a presença e frequência de linfócitos T reativos para o tumor do próprio paciente, tanto no sangue quanto infiltrando o tumor. Para isso, isolamos linfócitos T infiltrantes dos tumores (T-TIL), obtendo quantidades semelhantes de T-TIL por miligrama de tumor, independentemente do subtipo do tumor (Figura 26A). Estes T-TIL foram cocultivados com DC carregadas com lisados tumorais autólogos e a frequência de T-TIL reativos para o tumor foi calculada e comparada com a frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue do mesmo paciente. Surpreendentemente, nenhuma correlação foi encontrada entre as frequências de linfócitos T tumor-reativos encontradas no sangue e no tumor (Figura 26B).

Figura 26 – Linfócitos T reativos ao tumor autólogo de pacientes com câncer de mama no sangue e infiltrando o tumor do paciente. (A) Número de linfócitos T infiltrantes (T-TIL) recuperados por miligrama de tumor. (B) Correlação de linfócitos T reativos ao tumor autólogo no sangue (Sangue) e infiltrado no tumor (Tumor) de cada paciente; cada ponto de dados representa uma subpopulação de linfócitos T de um paciente (CD4 e CD8); os tipos tumorais luminal, Her2 e triplo negativo (TN) são discriminados pelos símbolos, como mostrado no gráfico. (C) Diferença entre a frequência de linfócitos T CD4 e CD8 tumor-reativos presentes no tumor (Tumor) e no sangue (Sangue); cada ponto de dados representa um paciente, independentemente do tipo de tumor (n=12). Frequência de linfócitos T reativos ao tumor autólogo do paciente, no sangue e infiltrando o tumor em (D) indivíduos com câncer de mama luminal (n=6), (E) em pacientes com câncer de mama Her2 (n=3) e (F) em doentes com câncer de mama triplo negativo (n=3). Em (D), (E) e (F), cada símbolo representa um paciente diferente.



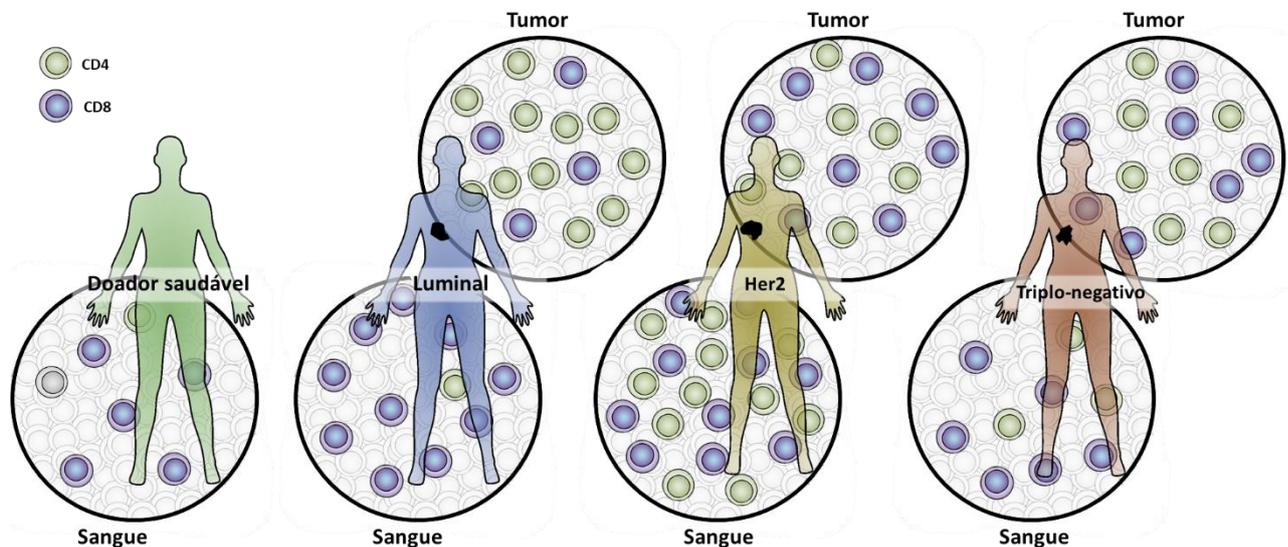
Fonte: PINHO et al. 2019.

Além disso, a maioria dos pacientes, independentemente de seu subtipo de tumor, apresentou uma maior frequência de linfócitos T CD4 tumor-reativos infiltrando o tumor do que no sangue, uma diferença que não ocorreu para os linfócitos T CD8 tumor-reativos (Figura 26C). De fato, enquanto 11 de 14 pacientes tinham mais linfócitos T CD8 tumor-reativos do que linfócitos T CD4 no sangue, o inverso (4 de 12) foi observado entre os T-TIL. Curiosamente, todos os três indivíduos que, no sangue, tinham mais células T CD4 reativas ao tumor do que células T CD8 tumor-reativas tinham tumores do subtipo Her2. Este predomínio de detecção de T CD4 entre os T-TIL pode estar relacionado a uma maior suscetibilidade das células T CD8 aos fatores imunossupressores presentes no tumor. De fato, este possível ambiente imunossupressor seria coerente com a baixa frequência de linfócitos T tumor-reativos entre os T-TIL. Esta frequência nunca foi superior a 300 linfócitos T reativos por milhão, uma frequência muito baixa, mesmo quando consideramos que, durante um evento inflamatório, tanto linfócitos T específicos para o antígeno quanto células de memória não relacionadas ao antígeno migram para os tecidos não-linfoides (CHEN et al., 2005). Esta baixa frequência encontrada poderia ser explicada, se considerarmos que tal ambiente pode impedir que linfócitos T específicos proliferem e, assim, sejam detectados por este ensaio. Ainda assim, há estudos mostrando que a frequência de linfócitos T antitumorais dentro de melanomas foi maior do que de linfócitos T antivacinas (LURQUIN et al., 2005).

Apesar de não termos comparado a frequência de linfócitos T tumor-reativos com linfócitos T com outra especificidade dentro do tumor, fomos capazes de comparar a frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue e no tumor, observando um aumento na frequência dentro do tumor. Pacientes portadores de câncer de mama luminal (Figura 26D) apresentaram uma frequência significativamente maior de linfócitos T CD4 reativos para o tumor entre T-TIL, do que entre linfócitos T CD4 sanguíneos (frequência de linfócitos CD4 T-TIL reativos para tumor: $80,4 \pm 68,8$ versus frequência de linfócitos T CD4 do sangue reativo para tumor: $18,0 \pm 32,1$; $p=0,04$; $n=6$). Este fenômeno, porém, foi dependente do tipo tumoral, pois em indivíduos com tumores do subtipo Her2, esse enriquecimento de células específicas contra o tumor não foi observado (Figura 26E). Pacientes portadores de tumor triplo-negativos parecem ter enriquecimento para as células T CD4 e CD8 tumor-reativas dentro do tumor, quando comparado com o sangue, uma diferença, porém, que não foi estatisticamente significativa (Figura 26F).

Dentre os diferentes subtipos de câncer de mama, o triplo-negativo é considerado o mais imunogênico, devido a sua maior frequência de mutações, maior expressão de antígenos câncer/testículo (CTA, do inglês, “*cancer/testis antigens*”) e maior infiltrado imunológico (LIU et al., 2018). Inesperadamente, porém, pacientes com câncer de mama triplo-negativo apresentaram, no sangue, as menores frequências de células T reativas para o tumor. A presença de linfócitos T tumor-reativos no sangue, no entanto, pode não refletir com precisão o microambiente tumoral. Nossos dados apontam para essa falta de correlação entre a frequência de linfócitos T reativos para tumor encontrados no sangue e a infiltração do tumor de doentes com câncer de mama e, enquanto no sangue de pacientes com câncer de mama triplo-negativo estas células eram menos frequentes, infiltrando o tumor elas foram detectadas em frequências semelhantes às dos indivíduos com tumores do subtipo Her2. Assim, embora modelos de camundongos tenham mostrado imunidade antitumoral sistêmica e coordenada após a imunoterapia (SPITZER et al., 2017), mostramos aqui que, em humanos, as frequências circulantes e locais de linfócitos T reativos para tumores T podem diferir significativamente (Figura 27). Portanto, os dados de imunidade antitumoral no sangue devem ser cuidadosamente considerados antes de serem extrapolados como representativos das condições encontradas dentro do tumor.

Figura 27 – Representação do número de linfócitos T reativos para tumores de mama. Esquema do número médio de linfócito T reativos para tumores de mama, no sangue de doadores saudáveis e no sangue e tumor pacientes com câncer de mama dos subtipos Luminal, Her2 e Triplo-negativo. Cada célula CD4 (verde) ou CD8 (azul) indicada nos círculos representa a presença de uma célula específica por 100.000 linfócitos T CD4 ou CD8, respectivamente.



4.4 *Frequência de linfócitos T reativos para glioblastoma multiforme*

O glioblastoma multiforme (GBM) é uma neoplasia extremamente agressiva que, mesmo com os recentes avanços terapêuticos, ainda leva a maioria dos pacientes à morte, em um curto espaço de tempo após o diagnóstico (FERNANDES et al., 2017). Em vista desse cenário, nosso laboratório implementou um estudo clínico de fase II para tratamento, com vacina de híbridos de células dendríticas e células tumorais, de indivíduos com GBM. Os doentes incluídos neste estudo, ainda em fase inicial, têm sido monitorados imunologicamente. Assim, fomos capazes de avaliar a frequência de linfócitos T reativos para o tumor do próprio paciente no momento da cirurgia e durante o tratamento imunoterapêutico.

4.4.1 *Frequência de linfócitos T reativos para GBM*

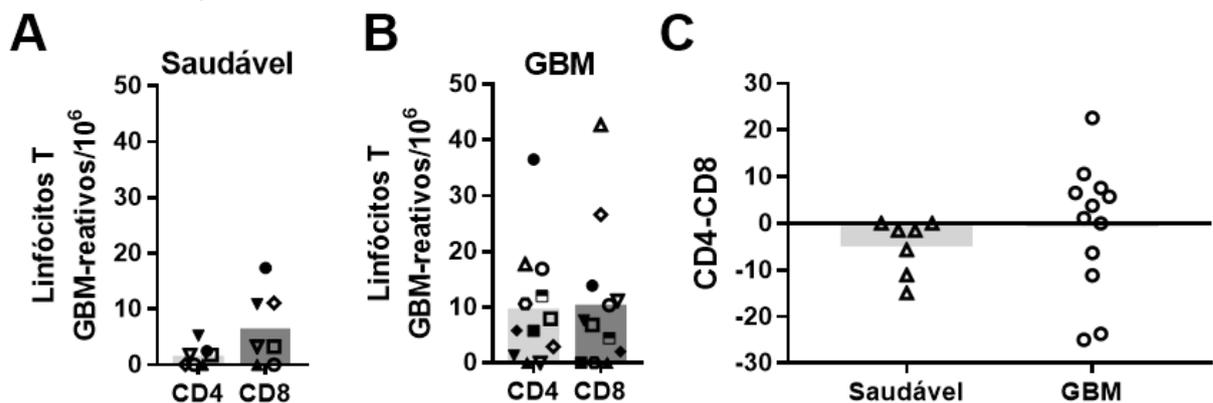
Linfócitos T do sangue dos indivíduos com GBM coletado logo antes do procedimento cirúrgico para retirada do tumor primário foram isolados e avaliados, por meio da técnica de estimulação *ex vivo*, quanto a frequência de células reativas para o tumor do próprio paciente. Para isso, DC carregadas com lisados das células tumorais do próprio doente foram utilizadas para desafiar os linfócitos T. A frequência de linfócitos T específicos para o tumor foi então calculada utilizando a distribuição de Poisson, e o número de poços negativos dentre as dez replicatas independentes analisadas.

Primeiramente, o ensaio foi realizado em doadores saudáveis, visando avaliar a frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue destes controles. A frequência de linfócitos T CD4 e CD8 reativos para lisados de GBM nos doadores saudáveis foi bastante baixa, com a maior frequência detectada sendo de 11 linfócitos T CD8 GBM-reativos no sangue de um dos controles (Figura 28A).

Nos 12 pacientes estudados, a frequência média de linfócitos T CD4 tumor-reativos e de linfócitos T CD8 reativos ficou em torno de 10 linfócitos T específicos por milhão (Figura 28B). Em três pacientes, não fomos capazes de detectar linfócitos T tumor-específicos de um dos subtipos – CD4 ou CD8 – no sangue, e em um paciente não foi encontrado linfócitos T GBM-reativos de nenhum dos dois subtipos. Esta baixa frequência de linfócitos T tumor-específicos no sangue de indivíduos com GBM pode

ser reflexo direto da biologia do tumor, mas também da medicação a qual os doentes estão submetidos no momento da coleta. O GBM apresenta uma evidente capacidade supressora, que afeta os linfócitos T tanto local quanto sistemicamente (WORONIECKA et al., 2018), o que pode ter atrapalhado a detecção das células específicas. Além disso, pacientes com GBM são rotineiramente submetidos a tratamento com corticosteróides, visando diminuir o edema cerebral causado pela neoplasia e pelo processo cirúrgico (DIETRICH et al., 2011). Os indivíduos analisados neste estudo estavam, de fato, utilizando dexametasona, um potente anti-inflamatório esteroidal. Além de controlar a inflamação, a dexametasona é capaz de agir diretamente sobre os linfócitos T, por meio da diminuição da expressão do complexo CD3/TCR em sua membrana (MIGLIORATI et al., 1997), por indução de aumento da expressão de PD-1 e por causar apoptose nos linfócitos T ativados (XING et al., 2015). Assim, é preciso considerar que, além dos efeitos imunossupressores do GBM, também a dexametasona tenha atrapalhado a detecção de linfócitos T específicos pelo nosso ensaio.

Figura 28 – Frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue de controles e pacientes. (A) Frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue de dois doadores saudáveis capazes de reagir contra lisados de GBM de pacientes (*ex vivo*) (n=7). (B) Frequência de linfócitos T no sangue de pacientes com glioblastoma multiforme capazes de reagir contra lisados gerados com o tumor autólogo do paciente (n=12). (C) Diferença entre a frequência de linfócitos T CD4 e CD8 GBM-reativos presentes no sangue de indivíduos saudáveis e pacientes com glioblastoma multiforme. Em (A) e (B) cada símbolo representa um indivíduo diferente.



Ao contrário dos pacientes com tumores de mama, os indivíduos com GBM não apresentaram uma frequência maior de linfócitos T CD8 do que CD4 tumor-específicos no sangue. Na verdade, houve uma grande variação entre os doentes com GBM, alguns apresentando uma frequência maior de linfócitos T CD4 GBM-

específicos, outros com uma frequência maior de linfócitos T CD8 GBM-específicos, e ainda outros com uma frequência similar dos dois tipos de linfócitos. Na média, os pacientes apresentaram a mesma frequência de linfócitos T CD4 e CD8 tumor-específicos (Figura 28C).

Tabela 2 – Frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue versus infiltrando o tumor de um paciente. Número de linfócitos T CD4 e CD8 reativos para GBM por milhão de linfócitos T CD4 e CD8, respectivamente, no sangue de um indivíduo diagnosticado com glioblastoma multiforme, comparado com o encontrado dentre os T-TIL.

	Linfócitos T CD4 GBM-reativos	Linfócitos T CD8 GBM-reativos
Sangue	2,9	26,6
Tumor	67,4	0

Fomos capazes de analisar, em um indivíduo portador de GBM, a frequência de linfócitos T tumor-reativos infiltrando o tumor (T-TIL). Assim como nos pacientes com câncer de mama, a frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue deste doente foi diferente da encontrada dentro do tumor, havendo, se alguma, uma correlação negativa entre os dois compartimentos (Tabela 4). A relação entre a frequência de linfócitos T CD4 e CD8 se inverteu nos dois compartimentos: no sangue a frequência de linfócitos T CD8 tumor-reativos foi superior do que a de linfócitos T CD4 tumor-reativos, ao contrário do que foi observado no infiltrado tumoral. Novamente, estes dados confirmam o cuidado que se deve ter na interpretação de dados sanguíneos, como representativo do microambiente tumoral.

4.4.2 *Evolução da frequência de linfócitos T reativos para GBM*

Já se sabe que o efeito da retirada do tumor no sistema imune pode ser bastante relevante, podendo inclusive melhorar o estado supressor das DC derivadas de monócitos do sangue de tais pacientes (CLAVIJO-SALOMON et al., 2015). Para avaliar se a remoção tumoral era capaz de alterar a frequência de linfócitos T GBM-reativos em nossa coorte de pacientes, comparamos a frequência obtida logo antes da cirurgia (Figura 28B), com a frequência calculada após um mês da remoção cirúrgica do tumor (Figura 29). Os pacientes avaliados após a remoção cirúrgica

apresentaram uma frequência média de linfócitos T reativos menor do que a obtida antes da remoção cirúrgica. A análise dos dois momentos no mesmo paciente só foi possível para um dos doentes estudados, e revelou, novamente, que, se existe de fato algum efeito da cirurgia na frequência de linfócitos T específicos, esta é no sentido de uma redução, e não um aumento (Tabela 3).

Figura 29 –Frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue de pacientes, após a remoção do tumor. Frequência de linfócitos T capazes de reagir contra lisados autólogos, no sangue de pacientes um mês após a cirurgia de remoção do glioblastoma multiforme (n=4).

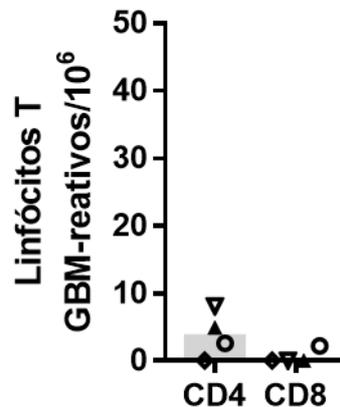


Tabela 3 – Frequência de linfócitos T GBM-reativos antes e após cirurgia no sangue de um paciente. Número de linfócitos T CD4 e CD8 reativos para GBM por milhão de linfócitos T CD4 e CD8, respectivamente, no sangue de um indivíduo diagnosticado com glioblastoma multiforme, logo antes do procedimento cirúrgico e um mês após a remoção do tumor.

	Linfócitos T CD4 GBM-reativos	Linfócitos T CD8 GBM-reativos
Pré-cirurgia	5,8	2,0
Pós-cirurgia	4,9	0

É importante lembrar que ao contrário do que ocorre em outros tumores, os pacientes com GBM recebem altas doses de dexametasona após a cirurgia, o que pode explicar os resultados aqui obtidos. Um estudo brasileiro mostrou que, por exemplo, após 4 semanas da cirurgia para remoção de tumores gástricos, a proporção de linfócitos T CD4 e CD8 no sangue destes pacientes não se alterava (BARBIERI et al., 2003). O mesmo estudo indicou, porém, uma tendência de menor proliferação com o mitógeno concanavalina A de linfócitos T obtidos após a cirurgia. Mais intrigante ainda é o estudo que mostra que a cirurgia pode ser capaz, em camundongos, de

atenuar a resposta específica a TAA, mesmo sem que haja a remoção tumoral (ANANTH et al., 2016). Este relato, que corrobora o que foi observado nos pacientes com GBM, indica que o estresse cirúrgico pode, por si só, modular negativamente e de maneira significativa a resposta imune. Neste estudo experimental, também foi mostrado que a cirurgia abolia o efeito protetivo de uma vacina com o TAA estudado. Assim, como próximo passo, avaliamos o que ocorria com a frequência de linfócitos T GBM-reativos após tratamento imunoterapêutico dos pacientes.

Assim, coletou-se o sangue de pacientes que foram submetidos à vacinação com híbridos de células dendríticas e células tumorais, após diferentes doses de vacinação, logo antes do recebimento da dose seguinte, o que ocorreu com 4 semanas de intervalo. Acompanhar a evolução do repertório de linfócitos T capazes de reagir contra o tumor do próprio doente durante tratamento tem uma importância única para desvendar a cinética de resposta à vacinação, além de abrir a possibilidade de correlacionar esta cinética com a resposta clínica do paciente. Assim, os linfócitos T obtidos do sangue colhido em diferentes tempos foram desafiados com DC carregadas com o lisado tumoral do próprio indivíduo, sendo a frequência de linfócitos T tumor-reativos calculada conforme descrito anteriormente.

Intrigantemente, os dois pacientes avaliados tiveram cinéticas de resposta diferentes, e respostas clínicas também opostas. A frequência de linfócitos T CD8 tumor-reativos no primeiro doente se manteve constante após a primeira dose de vacinação (10,38 células reativas por milhão antes da cirurgia e 10,41 células reativas por milhão 1 mês após a primeira dose da vacina). A frequência de linfócitos T CD4 tumor-reativos, porém, se alterou bastante, passando de 16,89 células tumor-reativas por milhão antes da cirurgia, para níveis não detectáveis (0 células tumor-reativas por milhão) após a primeira dose. Infelizmente, o paciente veio a falecer logo depois de receber a segunda dose da vacina, impedindo a continuação da análise.

Por outro lado, o segundo paciente avaliado, quando do início da vacinação, se encontrava em sua terceira cirurgia para remoção do tumor recidivado, e iria entrar em tratamento paliativo, não fosse pela sua inclusão no protocolo clínico de vacinação. Antes do início da vacinação, e após a remoção cirúrgica, não foram encontrados linfócitos T CD8 e CD4 tumor-reativos no sangue do doente. Após a segunda dose da vacina, porém, o paciente apresentou linfócitos T CD4 tumor-reativos em uma frequência de 15,28 linfócitos por milhão, mas não foram detectados linfócitos T CD8 reativos para o tumor. Intrigantemente, após a terceira dose da

vacina, foram encontrados tanto linfócitos T CD4 quanto linfócitos T CD8 tumor-reativos, sendo a frequência dos linfócitos T CD4 maior após a terceira dose do que após a segunda dose de vacinação (20,57 linfócitos T CD4 tumor-reativos; 5,83 linfócitos T CD8 tumor-reativos). Até o momento do depósito desta tese, este paciente se encontrava com quadro estável, tendo tomado 7 doses de vacina.

Apesar de serem apenas dois pacientes, estes resultados são capazes de mostrar a importância do monitoramento imunológico dos indivíduos com tumores. Eles indicam que o aumento *in vivo* da frequência de linfócitos T tumor-reativos é possível após vacinação, e que este aumento pode vir a ser um bom indicativo de resposta clínica ao tratamento vacinal. Diversos estudos mostram um aumento de linfócitos T específicos para antígenos tumorais em indivíduos vacinados, especialmente no compartimento de células CD8, por meio da técnica de tetrâmeros (CARRENO et al., 2015; LEE et al., 1999a). Porém, este aumento de linfócitos T específicos para antígenos tumorais após vacinação pode não se correlacionar com uma resposta clínica dos pacientes (ROSENBERG et al., 2005; SLEZAK et al., 2010).

Geralmente a análise da frequência de linfócitos T reativos para tumores nos indivíduos vacinados é realizada no sangue, e, conforme nossos dados e a literatura tem indicado, essa maior frequência de células específicas no sangue pode não se refletir em um maior número de linfócitos T específicos infiltrando o tumor. De fato, estudos indicam que os linfócitos T reativos para tumores gerados por vacinação podem ficar retidos no sítio vacinal, ou no sangue, sem migrar eficientemente para o sítio tumoral (HAILEMICHAEL; OVERWIJK, 2014). Além de restrições migratórias, a falta de correlação entre o aumento de linfócitos T específicos e a resposta terapêutica pode, também, ser devida ao tipo de resposta dos linfócitos T primados. Um estudo em camundongos mostrou que, após vacinação, existe a possibilidade de haver expansão concomitante de linfócitos T anti e pró-tumorais (ZHOU; DRAKE; LEVITSKY, 2006). No caso do modelo testado, a resposta reguladora superou a resposta efetora, ilustrando a possibilidade de que a vacinação pode ter um efeito maléfico na resposta imune antitumoral. Assim sendo, a avaliação da frequência de linfócitos T reativos para tumores pode não ser suficiente para sozinha, determinar o desfecho do tratamento. O fenótipo e função adquirido por tais linfócitos T são, também, características relevantes para prever o efeito do tratamento imunoterapêutico em pacientes com câncer.

4.5 Comparação entre as frequências de linfócitos T reativos encontradas

Tabela 4 – Frequência sanguínea de linfócitos T específicos para diferentes antígenos. Frequência de linfócitos T CD4 ou CD8 específicos para diferentes antígenos (Her2/neu; neoantígenos; lisado tumoral) por milhão no sangue de doadores saudáveis e pacientes com câncer, seguido, em parênteses, do número de doadores interrogados e a técnica utilizada (TET: tetrâmero; BIB: biblioteca de linfócitos T; EX: estimulação ex vivo). Nos experimentos onde houve a análise separada dos linfócitos T *naïve* e memória, são mostrados os valores separados da frequência de linfócitos reativos por milhão de cada um dos dois subtipos de linfócitos T.

Indivíduo/Antígeno		Linfócitos T CD8	Linfócitos T CD4
Doador Saudável	<i>Her2/neu</i>	657,5 (n=20; TET) 12,89 (n=4; EX)	4,88 (n=4, EX)
	<i>Neoantígenos (carcinoma hepatocelular)</i>	1,66 (n=1; EX)	0 <i>naïve</i> / 2,5 memória (n=2; BIB) 2,15 <i>naïve</i> / 0,81 memória (n=1; EX)
	<i>Lisado tumoral</i>	MCF-7: 32,27 (n=5; EX) SK-BR-3: 19,33 (n=9; EX) MDA-MB-231: 33,69 (n=6; EX) Lisados mama: 25,34 (n=10; EX) Lisados GBM: 6,56 (n=7; EX)	MCF-7: 11,96 (n=9; EX) SK-BR-3: 16,53 (n=6; EX) MDA-MB-231: 13,2 (n=5; EX) Lisados mama: 11,83 (n=20; EX) Lisados GBM: 1,59 (n=7; EX)
Paciente com carcinoma hepatocelular	<i>Neoantígenos (carcinoma hepatocelular)</i>	-	21 memória (n=1; BIB)
Pacientes com câncer de mama	<i>Her2/neu</i>	1443 (n=20; TET) 26,43 (n=9; EX)	38,12 (n=9; EX)
	<i>Lisado tumoral</i>	MCF-7: 37,92 (n=14; EX) SK-BR-3: 28,42 (n=13; EX) MDA-MB-231: 31,77 (n=13; EX) Lisados mama: 93,16 (n=25; EX)	MCF-7: 15,97 (n=14; EX) SK-BR-3: 7,85 (n=13; EX) MDA-MB-231: 17,59 (n=13; EX) Lisados mama: 31,34 (n=25; EX)
Pacientes com GBM	<i>Lisado tumoral</i>	Lisados GBM: 10,47 (n=12; EX)	Lisados GBM: 9,79 (n=12; EX)

Considerando a análise de frequência de linfócitos T reativos para tumores, neste trabalho, fomos capazes de identificar linfócitos T específicos para diferentes tipos de antígenos tumorais, utilizando uma variedade de técnicas (Tabela 4). Ao comparar os resultados de frequência obtidos com as diferentes técnicas e antígenos, porém, algumas considerações sobre a comparação de tais resultados merecem ser mencionadas.

4.5.1 *Frequência de linfócitos T tumor-reativos utilizando diferentes técnicas*

É possível notar que, apesar de ser, dentre as técnicas utilizadas, a que mais restringe a análise de repertório, a marcação com tetrâmeros foi, intrigantemente, a que revelou a maior frequência de linfócitos T específicos. Com esta técnica, por exemplo, foi encontrado um valor 10 vezes superior de linfócitos T específicos para um único peptídeo do Her2, do que o encontrado com o ensaio *ex vivo* utilizando o lisado tumoral, que tem o potencial de apresentar diversos peptídeos de diferentes antígenos presentes em um tumor. Além disso, a frequência encontrada com o tetrâmero com um único peptídeo da proteína também foi significativamente maior do que a frequência encontrada utilizando a proteína inteira no ensaio *ex vivo*.

Por ser a única técnica que não utiliza respostas efectoras dos linfócitos T para determinar a especificidade, podemos concluir que, provavelmente, o potencial de reconhecimento de antígenos tumorais pelo sistema imune é superior à resposta proliferativa destes linfócitos T. Assim, é provável que muitos dos linfócitos T que são capazes de se ligar a moléculas de MHC apresentando peptídeos provenientes de antígenos tumorais, não são capazes de proliferar quando recebem tal sinal, conforme indicado em estudos com a proteína melan-A (GEIGER et al., 2009). Esse efeito pode ser tanto devido a uma possível baixa afinidade pelo antígeno, quanto por uma regulação de resposta, que pode ocorrer dada à similaridade/identidade destes antígenos com antígenos próprios. Logo, a frequência de linfócitos T que se ligam a um determinado multímero pode não indicar corretamente a quantidade de linfócitos T capazes de gerar uma resposta efetora contra o antígeno estudado. Assim sendo, para avaliar a resposta imune gerada para um determinado antígeno, ensaios funcionais podem vir a ser mais informativos, e, portanto, desejáveis.

Neste trabalho, utilizamos principalmente a proliferação como indício de especificidade, uma vez que, deste modo, permitimos o reconhecimento de linfócitos

T específicos que apresentem diferentes funções efetoras. Para tanto, utilizamos o ensaio de biblioteca de linfócitos T, desenvolvido no laboratório da Dr^a. Federica Sallusto (GEIGER et al., 2009), e o ensaio de estimulação *ex vivo* de linfócitos T, criado a partir da variação do método de bibliotecas, com o intuito de aumentar a detecção de linfócitos T tumor-reativos. De fato, estas modificações, que incluem uma maior quantidade de linfócitos T a serem avaliados, se mostraram fundamentais para a detecção de linfócitos T reativos para neoantígenos em doadores saudáveis (Tabela 4). Sendo assim, o método de estimulação *ex vivo* foi o escolhido para se realizarem as análises com lisados tumorais.

É verdade que a técnica de estimulação *ex vivo*, que se baseia na proliferação de células T para detectar especificidade, não detectará células não-proliferativas, um fenômeno que pode afetar células com menor capacidade proliferativas, como os linfócitos T reguladores. Vale lembrar que a diluição de CFSE pode ser detectada mesmo na presença de poucos ciclos de proliferação dos linfócitos T, podendo ser suficiente para detectar até mesmo células com pouca proliferação. Essa mesma limitação pode, no entanto, contribuir para apontar diferenças no ambiente imunossupressor dos tumores e a sensibilidade das células T a ele. Em pacientes com tumores do tipo luminal, a frequência de CD8 T-TIL foi claramente menor do que a de CD4 T-TIL, em uma correlação inversa com a encontrada no sangue, o que não aconteceu com indivíduos com os outros subtipos de câncer de mama. Poderia isso apontar para um contexto de supressão imunológica diferente entre os subtipos de câncer de mama e/ou para diferenças de susceptibilidade a supressão pelas células CD4 e CD8 infiltrantes? De qualquer modo, esta restrição do ensaio em detectar apenas linfócitos T proliferantes apresenta um ponto positivo, uma vez que essas seriam as células respondendo mais prontamente aos desafios antigênicos e, assim, moldando a evolução da doença nos pacientes.

4.5.2 *Frequência de linfócitos reativos para diferentes antígenos tumorais*

Com os dados obtidos neste estudo, somos capazes de inferir sobre a proporção da resposta imune antitumoral que pode ser atribuída a diferentes tipos de antígenos tumorais. Podemos perceber que, utilizando a técnica de estimulação *ex vivo*, linfócitos T Her2-reativos foram encontrados em uma frequência superior a linfócitos T reativos para o pool de neoantígenos, nos doadores saudáveis avaliados.

Este resultado intrigante vai contra o senso comum de que o reconhecimento de peptídeos diferentes dos encontrados no corpo do próprio indivíduo deveria ser maior do que aquele obtido com proteínas próprias. Porém, é importante lembrar que, durante a seleção do repertório de linfócitos T, apenas serão capazes de se tornar linfócitos T maduros, os precursores capazes de interagir com as moléculas de MHC apresentando peptídeos próprios (JAMESON; HOGQUIST; BEVAN, 1995). Sendo assim, a maior frequência de linfócitos T reativos para Her2 pode ser devida a tal efeito. Estudos da afinidade de tais linfócitos T se fazem necessários, porém, para dar maior embasamento a esta teoria, uma vez que, se este for o caso, os linfócitos T Her2-reativos deveriam apresentar uma afinidade inferior aos reativos para neoantígenos. Além disso, comparações, em pacientes com câncer, da frequência de linfócitos T reativos para neoantígenos e para TAA são urgentemente necessárias para determinar que tipos de antígeno são mais representado no repertório de linfócitos T tumor-reativos, e qual destes é, de fato, o que apresenta maior capacidade de gerar uma resposta imune efetora.

Podemos também comparar a frequência de linfócitos T Her2-reativos com a frequência total de linfócitos T tumor-reativos em doadores e pacientes. Como esperado, a frequência de linfócitos T reativos para Her2 foi inferior à obtida com lisados tumorais nos doadores saudáveis. Apesar do lisado tumoral conter uma grande variedade de proteínas, porém, essa diferença foi de apenas cerca de metade. Intrigantemente, essa diferença foi ainda menor quando comparado a resposta ao Her2 e ao lisado nos pacientes com câncer. É importante lembrar que, por causa da maior variedade proteica no lisado, é esperado que a concentração final de cada proteína individualmente no lisado seja bastante reduzida. Assim, enquanto o estímulo com Her2 é feito carregando as DC com 4 µg/mL da proteína recombinante, a estimulação com lisado é feita com 10 µg/mL de proteína total, que fará com que a concentração de Her2 seja bastante inferior ao utilizado com a proteína recombinante. Sabe-se que a resposta do linfócito T depende de sua afinidade e da concentração de antígeno que está sendo apresentado, e que este só irá proliferar se as APC forem carregadas com antígeno suficiente (CAMPION et al., 2014). Assim, é possível que a estimulação com lisado seja capaz de induzir apenas a proliferação de linfócitos T com alta afinidade para as proteínas do tumor, uma vez que estes seriam capazes de proliferar mesmo com uma concentração mais baixa do antígeno. Logo, conclui-se que, para uma melhor determinação da porcentagem de linfócitos T tumor-reativos

capazes de reconhecer uma dada proteína, o melhor a se fazer seria a avaliação da frequência de linfócitos reativos para a proteína dentre os linfócitos T tumor-reativos.

4.5.3 *Frequência de linfócitos tumor-reativos entre diferentes tipos tumorais*

Poucos são os relatos na literatura que avaliam amplamente a frequência de células T capazes de reconhecer um tumor e, de acordo com nosso conhecimento, nenhum deles se refere a tumores de mama ou GBM. Os dados mais abundantes referem-se à frequência de linfócitos T citotóxicos CD8 (CTL) específicos para o melanoma. Há estudos que indicam que a frequência de linfócitos T específicos para antígenos tumorais no melanoma é maior do que em outros tumores, uma característica frequentemente associada à sua alta carga mutacional (ALEXANDROV et al., 2013). Estudos utilizando diferentes técnicas mostraram que a frequência de linfócitos T CD8 reativos ao melanoma no sangue de pacientes pode variar entre 15 a 1.000 células T por milhão, estando mais frequentemente em torno de 200 CTL por milhão (GERMEAU et al., 2005; MAZZOCCHI et al., 1994). Nossos dados mostram que a frequência de células T CD8 reativas ao tumor em sangue de indivíduos com câncer de mama chega a 800 por milhão, mas mais frequentemente é cerca de cinco a dez vezes menor que a média de 200 por milhão encontrada em doentes com melanoma. Pacientes com GBM, por outro lado, apresentam, no sangue, uma média ainda menor de linfócitos T CD8 específicos contra o tumor, com média de 12 linfócitos T CD8 tumor-reativos por milhão, e nunca superior a 60 células por milhão. A literatura carece de dados sobre a frequência de linfócitos T CD4 reativos ao tumor, mas nossos dados mostram que essas células estão presentes no sangue de pacientes em uma frequência igual à observada para os linfócitos T CD8, nos indivíduos com GBM ou com tumores de mama do subtipo Her2 e triplo-negativo, sendo menor apenas nos doentes com tumores de mama do subtipo luminal.

Intrigantemente, tumores de mama e o GBM apresentam uma carga mutacional parecida, sendo um ou outro reportado como tendo a maior quantidade de mutações, dependendo do estudo (ALEXANDROV et al., 2013; WANG; LI, 2019). Deste modo, a carga mutacional não parece ser a causa de tal variação na frequência dos linfócitos T tumor-reativos dentre os pacientes com as duas doenças. O contexto imune parece prevalecer neste caso. A maior parte dos GBM apresenta um perfil de depleção linfocitária, com um perfil imunossupressor intratumoral evidente, o que não acontece

para os tumores de mama (NDUOM; WELLER; HEIMBERGER, 2015; THORSSON et al., 2018). Além disso, os indivíduos com GBM frequentemente são tratados com dexametasona, que, sendo capaz de diminuir a proliferação dos linfócitos T circulantes, pode ter um impacto negativo na detecção dos linfócitos T específicos (MIGLIORATI et al., 1997). Assim, a menor frequência de linfócitos T tumor-específicos nos indivíduos com GBM quando comparada a encontrada em indivíduos com tumores de mama, não é surpreendente. De fato, um estudo de vacinação recente mostrou que apenas aqueles pacientes que não estavam sob tratamento com dexametasona foram capazes de gerar um aumento no número de linfócitos T tumor-específicos após vacinação (KESKIN et al., 2019). A avaliação da resposta imune na ausência da dexametasona seria desejável, mas, infelizmente, não é possível na situação clínica em que os pacientes se encontram. Vale notar que observamos um aumento na frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue de um paciente recebendo vacina de híbridos de células tumorais, mesmo este estando sob tratamento com a dexametasona.

Algumas das diferenças encontradas nos indivíduos com câncer também puderam ser encontradas em indivíduos saudáveis, como a menor frequência de linfócitos T GBM-reativos quando comparado com a frequência de linfócitos T reativos para tumores de mama. Todavia, conforme esperado, esta frequência foi sempre menor do que a observada nos doentes. Esta resposta presente nos controles também apresentou um viés para o compartimento CD8, que nem sempre foi observado nos pacientes. Considerando o possível papel de imunovigilância destes linfócitos T presentes nos doadores saudáveis, a predominância de CD8 seria interessante do ponto de vista da resposta efetora desejada.

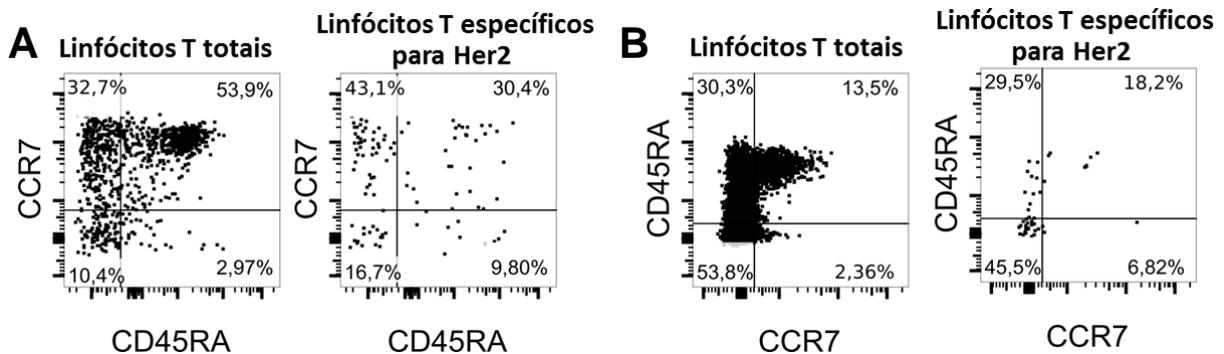
4.6 Fenótipo funcional dos linfócitos T reativos para Her2

A determinação do fenótipo dos linfócitos T reativos para tumores é tão importante quanto a inferência de sua frequência no sangue dos pacientes, uma vez que estes podem adquirir tanto funções antitumorais quanto pró-tumorais ou, ainda, nem sequer terem se diferenciado em linfócitos T efetores e de memória com capacidade de exercer uma função imune. Para avaliar tal fenótipo nos linfócitos T tumor-reativos, diversas estratégias foram utilizadas, sendo descritas a partir deste ponto. Começamos a análise com os linfócitos T específicos para uma única proteína, o Her2, antes de expandir esta análise para os linfócitos T reativos para todas as proteínas presentes nos lisados tumorais. Para isso, avaliou-se, dentre os linfócitos T CD8 capazes de se ligar ao tetrâmero carregado com peptídeo do Her2, a porcentagem destes que apresentavam fenótipo de linfócitos T *naïve*, e dos diferentes subtipos de memória. Em seguida, linfócitos T Her2-reativos recuperados após ensaio de proliferação com DC carregadas com a proteína Her2 foram avaliados quanto a sua capacidade citotóxica frente as linhagens tumorais, e seu padrão de secreção de citocinas.

4.6.1 Fenótipo *naïve*/memória de linfócitos T CD8 tetrâmero-positivos

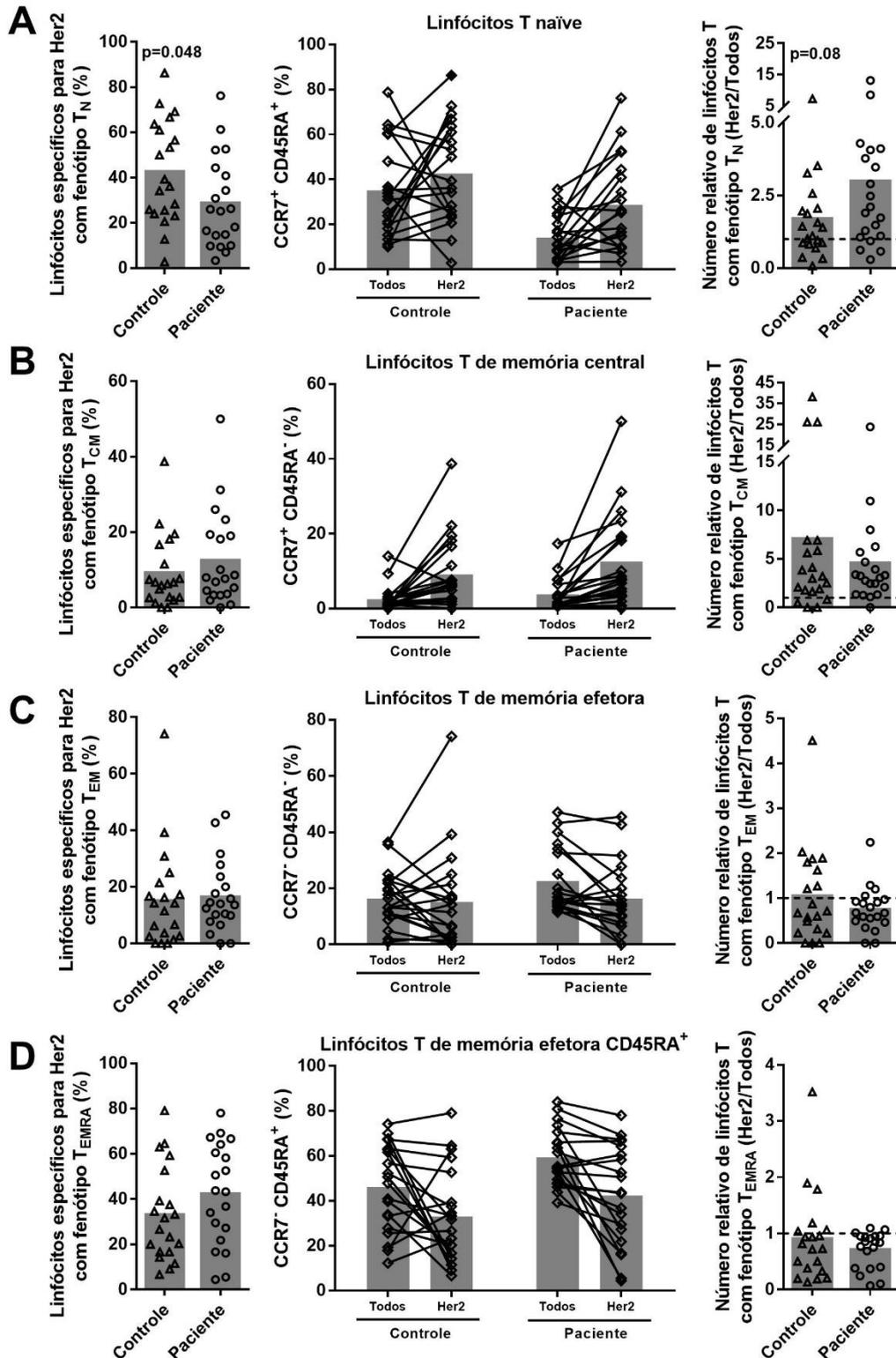
A expressão das proteínas CCR7 e CD45RA foi avaliada dentre os linfócitos T CD8 tetrâmero-positivos em controles e pacientes, visando determinar a porcentagem de células com fenótipo de células *naïve* (T_N ; CCR7⁺CD45RA⁺), e dos diferentes subtipos de memória: memória central (T_{CM} ; CCR7⁺CD45RA⁻), memória efetora (T_{EM} ; CCR7⁻CD45RA⁻) e memória efetora positiva para CD45RA (T_{EMRA} ; CCR7⁻CD45RA⁺) (Figura 30). Linfócitos T de memória efetora são responsáveis por patrulhar os tecidos, enquanto os de memória central, com sua expressão de CCR7, um receptor de quimiocinas presente nos linfonodos, apresenta um padrão de circulação similar aos linfócitos T *naïve* (SALLUSTO et al., 1999). Por outro lado, os linfócitos T_{EMRA} , presentes em uma frequência significativa apenas dentre os linfócitos T CD8, são associados à diferenciação terminal destes (MAHNKE et al., 2013). Acredita-se que estes são linfócitos T de memória em repouso, que ao encontrarem seu antígeno perdem a expressão de CD45RA, voltando a expressar essa molécula se não encontram novamente o antígeno por algumas semanas (CARRASCO et al., 2006).

Figura 30 – Gráficos representativos do fenótipo dos linfócitos T específicos para o tetrâmero. (A) Gráficos da expressão de CD45RA e CCR7 nos linfócitos T totais e específicos para Her2 em um doador saudável. (B) Gráficos da expressão de CD45RA e CCR7 nos linfócitos T totais e específicos para Her2 em um paciente com câncer de mama.



Intrigantemente, ao comparar a porcentagem de linfócitos T *naïve* específicos para o tetrâmero entre controles e pacientes foi possível encontrar uma diferença significativa (Figura 31). Ao analisar, dentre os linfócitos T específicos, a porcentagem com cada fenótipo, porém, é importante levar em conta as diferenças que podem ser encontradas nos linfócitos T presentes no sangue de indivíduos com câncer. Pacientes com câncer de mama, por exemplo, apresentam uma menor quantidade de linfócitos T *naïve* circulantes do que doadores saudáveis, mesmo quando seus tumores ainda estão em estágios iniciais, além de uma maior quantidade de linfócitos CD8 T_{EMRA} (HUEMAN et al., 2007; POSCHKE et al., 2012). Sendo assim, a diferença encontrada na proporção de linfócitos T tetrâmero-positivos com fenótipo *naïve* pode ser devida à menor quantidade de linfócitos T *naïve* totais (independentemente de sua especificidade) no paciente com câncer, e não devido à especificidade do antígeno. De fato, ao se realizar uma análise relativa, os pacientes apresentam uma tendência de apresentar um maior número relativo de linfócitos T Her2-específicos *naïve*, quando comparados aos controles. Ou seja, no paciente parece existir um mecanismo de seleção para que os linfócitos T específicos para Her2 no sangue tenham um fenótipo mais *naïve* do que quando comparado aos linfócitos T com outra especificidade. Esta possível seleção, que não foi diferente entre indivíduos com tumores de mama de diferentes subtipos, poderia ser explicada ou por uma maior migração destas células específicas para o tecido – provavelmente tumoral – ou por algum mecanismo supressor exercido pelo tumor que impediria a diferenciação destes linfócitos T.

Figura 31 – Fenótipo naíve/memória das células específicas para o tetrâmero. (A) Linfócitos T CD8 com fenótipo naíve (T_N ; $CCR7^+CD45RA^+$). (B) Linfócitos T CD8 com fenótipo de memória central (T_{CM} ; $CCR7^+CD45RA^-$). (C) Linfócitos T CD8 com fenótipo de memória efetora (T_{EM} ; $CCR7^-CD45RA^-$). (D) Linfócitos T CD8 com fenótipo de memória efetora positiva para CD45RA (T_{EMRA} ; $CCR7^-CD45RA^+$). O gráfico da esquerda mostra a porcentagem das células positivas para o tetrâmero com cada um dos fenótipos. O gráfico do meio compara, em cada indivíduo, a porcentagem dos linfócitos T totais (Todos) ou específicos para Her2 (Her2) com cada fenótipo. O gráfico da direita mostra a relação entre a frequência de linfócitos T Her2-reativos e totais com um dado fenótipo.



De modo geral, os linfócitos T específicos para Her2 apresentaram uma proporção maior de células com fenótipo *naïve* e de memória central do que a encontrada no repertório total do mesmo indivíduo (Figura 31). Dado que o antígeno analisado é um antígeno próprio, sem mutações, é de se esperar que este seja reconhecido por linfócitos com um fenótipo mais frequentemente *naïve* do que o encontrado entre os linfócitos T com outras especificidades. É válido ressaltar também que foram encontrados linfócitos T de memória Her2-específicos nos indivíduos saudáveis. Avaliando-se em conjunto com os dados dos linfócitos T reativos para neoantígenos e para linhagens de câncer de mama, podemos inferir que este parece ser um fenômeno comum, que acontece com linfócitos T reativos tanto para antígenos associados, quanto específicos para tumores.

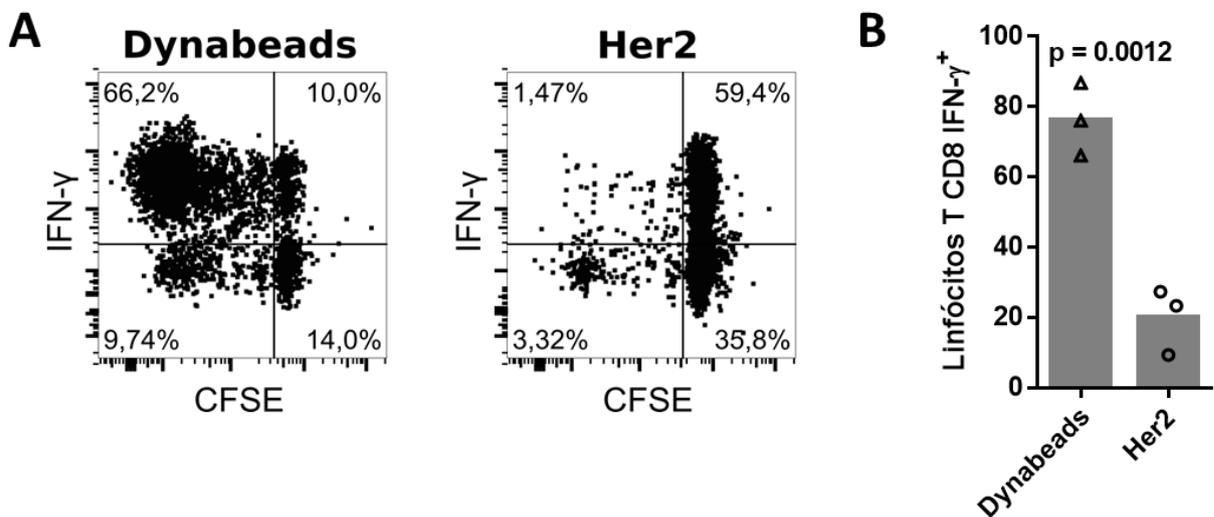
4.6.2 *Função dos linfócitos T CD8 reativos para Her2*

Como mostrado anteriormente, linfócitos T CD8 reativos para Her2 podem ser encontrados no sangue de controles e pacientes, sendo que, alguns destes, apresentam fenótipo de linfócitos T de memória. Para saber se tais linfócitos eram funcionais, analisamos a capacidade destes de produzir IFN- γ e exercer citotoxicidade de maneira antígeno-específica.

Primeiramente, a avaliação da secreção de IFN- γ foi avaliada nos linfócitos T CD8 do sangue de três indivíduos saudáveis. Para isso, estes linfócitos foram estimulados, como controle positivo, com esferas recobertas de anticorpos contra CD3 e CD25 (dynabeads), ou com a proteína Her2 recombinante apresentada por células dendríticas autólogas. As culturas foram estimuladas por 12 dias, sendo os últimos 7 na presença de IL-2 (50U/mL), para aumentar a quantidade de células reativas. Os linfócitos T foram, então, estimulados com PMA, ionomicina e brefeldina por 16 horas, sendo, então, submetidos à marcação intracelular com anticorpo contra IFN- γ . A porcentagem de células produtoras de IFN- γ dentre aquelas que sofreram proliferação e, portanto, com diluição de CFSE, foi calculada. Conforme esperado, a grande maioria linfócitos T ativados com as dynabeads foi capaz de produzir IFN- γ (Figura 32). A frequência de linfócitos T CD8 positivos para IFN- γ dentre aqueles Her2-reativos foi significativamente menor do que a encontrada com a estimulação com dynabeads, apesar de ainda serem encontrados linfócitos T Her2-reativos capazes de secretar IFN- γ . Logo, uma vez que nem todos os linfócitos T Her2-reativos são

capazes de secretar IFN- γ , a frequência de células específicas para Her2 que poderia ser calculada utilizando ELISPOT, conforme descrito na literatura (SOTIROPOULOU et al., 2003) é, muito provavelmente, subestimada. De fato, um estudo comparando diferentes técnicas mostrou que a menor frequência de linfócitos T específicos era aquela determinada por ELISPOT (HOBEIKA et al., 2005).

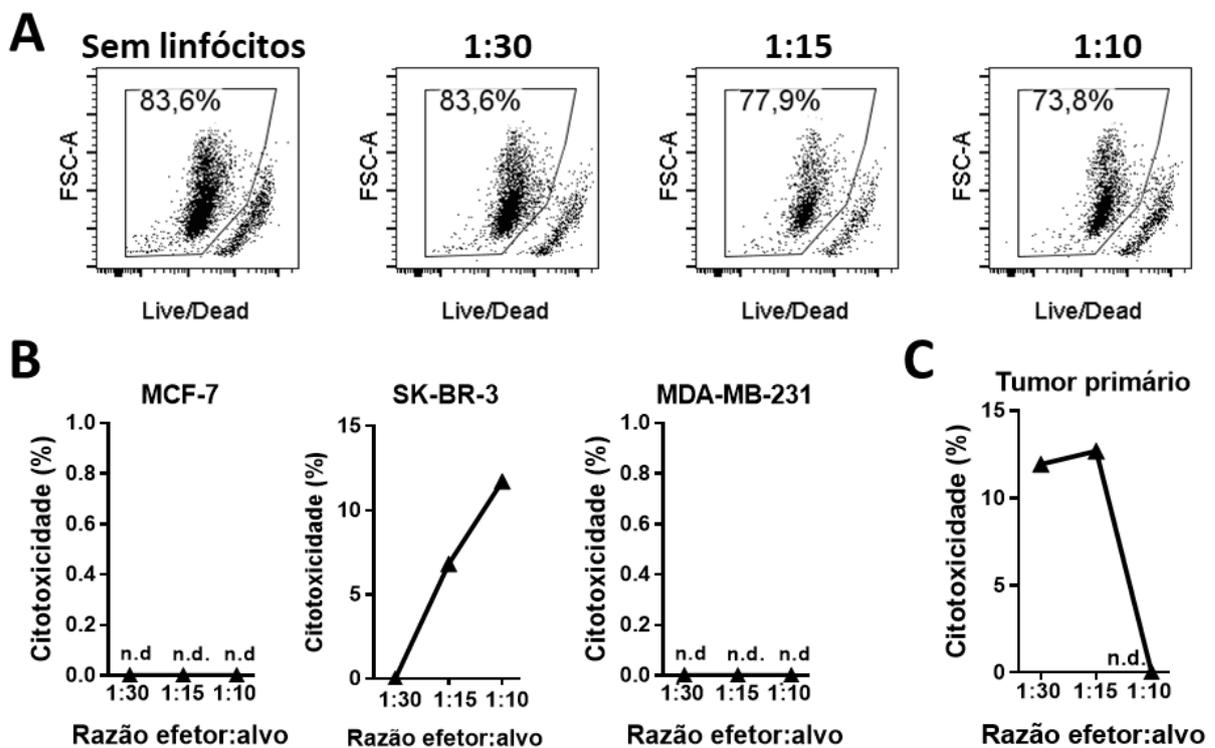
Figura 32 – Expressão de IFN- γ por linfócitos T CD8 Her2-reativos. (A) Gráficos representativos da marcação com CFSE e produção de IFN- γ em linfócitos T estimulados com dynabeads (esferas recobertas de anticorpos contra CD3 e CD28) ou com DC autólogas carregadas com a proteína Her2 recombinante. (B) Frequência de linfócitos T produtores de IFN- γ dentre os linfócitos T CFSE^{low} que foram estimulados com dynabeads ou Her2.



Além da produção de IFN- γ , linfócitos T CD8 são reconhecidos por sua potencial capacidade citolítica. Para testar se linfócitos T Her2-reativos eram capazes de eliminar especificamente células tumorais com superexpressão de Her2, um ensaio de citotoxicidade com células das três linhagens celulares além de células do tumor do paciente foi realizado. Para isso, linfócitos T Her2-reativos de um paciente com tumor de mama do subtipo Her2 foram selecionados, expandidos, e cocultivados, em diferentes proporções, com células tumorais marcadas com CFSE. Após incubação, as células foram marcadas com o corante de viabilidade Live/Dead (Thermo Fisher Scientific) e avaliadas por citometria de fluxo (Figura 33A). Conforme esperado, os linfócitos T Her2-reativos foram capazes de induzir a morte de células da linhagem SK-BR-3 – que superexpressa Her2 – mas não das outras duas linhagens (Figura 33B). Estes linfócitos T também foram capazes de matar células obtidas do tumor do próprio paciente testado, apesar de não ter apresentado uma dose-resposta como a

obtida com a SK-BR-3 (Figura 33C). Assim, os linfócitos T Her2-reativos deste paciente parecem ser capazes de induzir a morte de células tumorais que apresentam superexpressão de Her2.

Figura 33 – Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 Her2-reativos. (A) Gráficos mostrando a porcentagem de células positivas para CFSE (células tumorais) vivas, na ausência de linfócitos T CD8 Her2-reativos, ou presença destes nas razões de 1 célula efetora (linfócitos T) para 30, 15 ou 10 células SK-BR-3. (B) Porcentagem de citotoxicidade de células da linhagem MCF-7, SK-BR-3 e MDA-MB-231, quando na presença de diferentes quantidades de linfócitos T CD8 Her2-reativos. (C) Citotoxicidade de células tumorais obtidas do tumor do próprio paciente, quando na presença de diferentes quantidades de linfócitos T CD8 Her2-reativos. n.d: não detectado.



Mesmo sendo um antígeno próprio, a literatura e os dados de frequência obtidos neste trabalho mostram que o sistema imune de indivíduos saudáveis e de pacientes com câncer contém linfócitos T Her2-específicos (HUEMAN et al., 2007; WOLL et al., 2004). Além disso, já foi mostrado que a vacinação, tanto com a proteína quanto com o peptídeo do Her2, é capaz de aumentar a frequência de linfócitos T CD8 Her2-específicos (BROSSART et al., 2000; CLIFTON et al., 2016). Diversos grupos já reportaram a capacidade de tais linfócitos T de produzir IFN- γ e gerar respostas citotóxicas (BROSSART et al., 2000; RENTZSCH et al., 2003; SOTIROPOULOU et al., 2003), da mesma forma como aqui relatado. Porém, um trabalho antigo mas

elegante de Zaks e Rosenberg mostrou que os linfócitos T Her2-específicos gerados após vacinação com o peptídeo E75, só eram capazes de induzir citotoxicidade e produzir IFN- γ frente a linhagens pulsadas com o peptídeo, mesmo quando o desafio era feito com linhagens que superexpressavam Her2, como a linhagem SK-BR-3, também utilizada neste trabalho (ZAKS; ROSENBERG, 1998). Em contrapartida, Lin e colaboradores mostraram que linfócitos T Her2-específicos de doadores saudáveis, quando ativados com células carregadas com a proteína Her2 inteira, foram capazes de induzir a morte de células de linhagens que superexpressavam Her2 (SK-BR-3 e MDA-MB-453), mas não de linhagens com expressão basal dessa molécula (MCF-7, MDA-MB-231) (LIN et al., 2012).

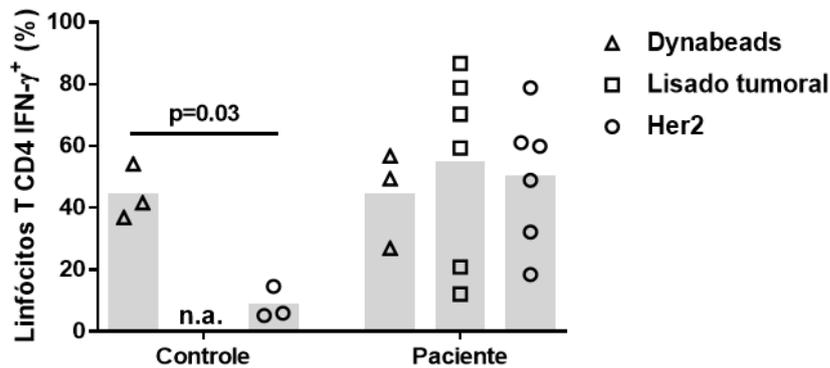
Estes resultados indicam que, apesar de serem capazes de ser possível uma resposta efetora por parte dos linfócitos T CD8 Her2-específicos, sua resposta pode depender da forma como foram primados e da maneira como o antígeno lhes é apresentado. Talvez os linfócitos T reativos para o peptídeo E75 induzidos pela vacinação com tal molécula no trabalho liderado por Rosenberg necessitassem de uma maior quantidade de moléculas de MHC apresentando o peptídeo na superfície das células alvo, e, por isto, apenas a superexpressão de Her2 nas células não seria o suficiente para tal ativação. Por outro lado, a ativação com a proteína inteira, conforme mostrado em nosso trabalho e por Lin e colaboradores, poderia gerar a ativação de linfócitos T Her2-específicos com capacidade de reconhecer e eliminar células superexpressando esta molécula.

De qualquer modo, estes estudos, aliados aos nossos dados, indicam que a superexpressão é necessária para que uma resposta ocorra, e, portanto, células de tecidos saudáveis, com expressão basal dessa molécula, não se tornariam alvo da resposta efetora de tais linfócitos T, demonstrando um controle fino do sistema imune. Vale notar que também já foi descrito que linfócitos T CD4 Her2-específicos também só foram capazes de produzir IFN- γ e até eliminar células de linhagens celulares, quando estas superexpressavam tal molécula (DATTA et al., 2015). Se, de fato, os linfócitos T Her2-específicos, CD4 e CD8, reagem apenas às células com uma alta expressão de Her2, o limiar de expressão necessário para ativação desta resposta deve ser melhor estudado e determinado. Assim, as vacinas contendo Her2 em sua formulação poderiam ser direcionadas apenas aos pacientes cujos tumores apresentem expressão acima do limiar determinado e que, portanto, poderiam se beneficiar de tal estratégia.

4.6.3 Padrão de secreção de citocinas por linfócitos T CD4 Her2-reativos

Linfócitos T CD4 também podem exercer um papel importante na resposta imune ao câncer. Visando avaliar se aqueles reativos para Her2 eram capazes de secretar IFN- γ , realizamos um ensaio de marcação intracelular para esta citocina. Para isso, os linfócitos T Her2-reativos (CFSE^{low}CD25⁺), obtidos após cocultura com DC carregadas com a proteína Her2 recombinante, foram isolados por FACS e expandidos para se obter uma quantidade suficiente de células. Após expansão, os linfócitos T foram cultivados com PMA, ionomicina e brefeldina e, após 16 horas, foram marcados para a presença de citocinas intracelulares.

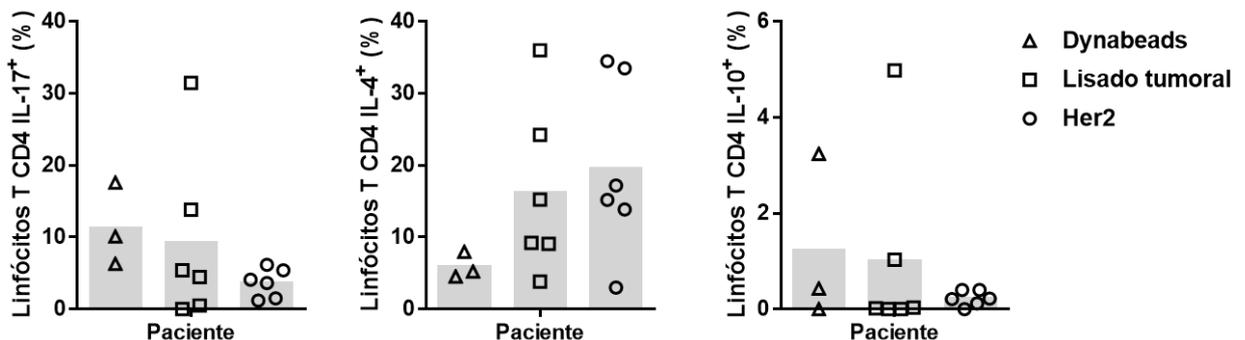
Figura 34 – Proporção de linfócitos T CD4 Her2-reativos capazes de produzir IFN- γ . Porcentagem de linfócitos T ativados com dynabeads, reativos para lisados tumorais, ou Her2-reativos, no sangue de indivíduos controle ou com câncer de mama, produtores de IFN- γ . A produção desta citocina foi avaliada por marcação intracelular após ativação PMA, ionomicina e brefeldina. n.a.: não analisado.



Igualmente ao observado com o compartimento de CD8, linfócitos T CD4 Her2-reativos de doadores saudáveis apresentaram uma expressão significativamente menor de IFN- γ do que os linfócitos T ativados com dynabeads (Figura 34). Linfócitos T CD4 Her2-reativos de pacientes com câncer de mama, porém, apresentam a mesma capacidade de produzir IFN- γ do que a observada em linfócitos T ativados por dynabeads ou reativos para antígenos tumorais que não necessariamente o Her2 (antígenos presentes em lisados de células tumorais dos doentes). Isto indica que, pelo menos no que diz respeito à produção de IFN- γ , a resposta imune contra Her2 parece ser mais eficiente nos pacientes do que nos controles. De fato, dentre os seis pacientes testados, os dois com maior frequência de linfócitos T Her2-reativos capazes de secretar IFN- γ eram os que apresentavam tumores que superexpressam Her2. Surpreendentemente, porém, o efeito contrário foi descrito na literatura, onde

pacientes com tumores de mama do subtipo Her2 apresentaram uma menor frequência de linfócitos T CD4 Her2-reativos sanguíneos capazes de secretar IFN- γ , conforme medido por ELISPOT em PBMC estimuladas com peptídeos de Her2 restritos pelo MHC de classe II (DATTA et al., 2015). Uma possível explicação para tal discrepância seria a de um possível viés imunossupressor presente nestas células, que os próprios autores descartam como sendo a causa da baixa reatividade nos pacientes, quando mostram que a ativação com antiCD3/CD28 (dynabeads) é igual entre os doentes. Intrigantemente, Datta e colaboradores também mostram que esta baixa resposta obtida no ELISPOT pode ser revertida, quando os pacientes foram submetidos à vacinação com DC pulsadas com Her2. Este dado pode explicar a discrepância entre a frequência obtida no artigo e aqui encontrada: em nosso ensaio, os linfócitos T CD4 Her2-reativos são obtidos por estimulação com DC carregadas com a proteína Her2, que são então isolados e inespecificamente expandidos, o que ativa ainda mais os linfócitos T, antes da realização do ensaio.

Figura 35 – Proporção de linfócitos T CD4 Her2-reativos capazes de produzir IL-17, IL-4 e IL-10. Porcentagem de linfócitos T ativados com dynabeads, reativos para lisados tumorais, ou Her2-reativos, no sangue de pacientes com câncer de mama, capazes de produzir as citocinas IL-17, IL-4 e IL-10. A produção destas citocinas foi avaliada por análise intracelular, após o tratamento das células com PMA, ionomicina e brefeldina.



Por outro lado, também avaliamos a expressão de outras citocinas características de linfócitos T helper – IL-17 de linfócitos Th17, IL-4 de linfócitos Th2 e IL-10 de linfócitos T reguladores – não sendo observadas diferenças significativas entre os linfócitos T Her2-reativos e os linfócitos reativos para lisados tumorais dos pacientes. Deste modo, podemos inferir que a resposta para este antígeno não difere da resposta total contra o câncer montada pelos linfócitos T dos pacientes. O padrão de resposta aqui observado será discutido a frente, quando forem analisados o padrão de resposta dos linfócitos T CD4 reativos para lisados tumorais.

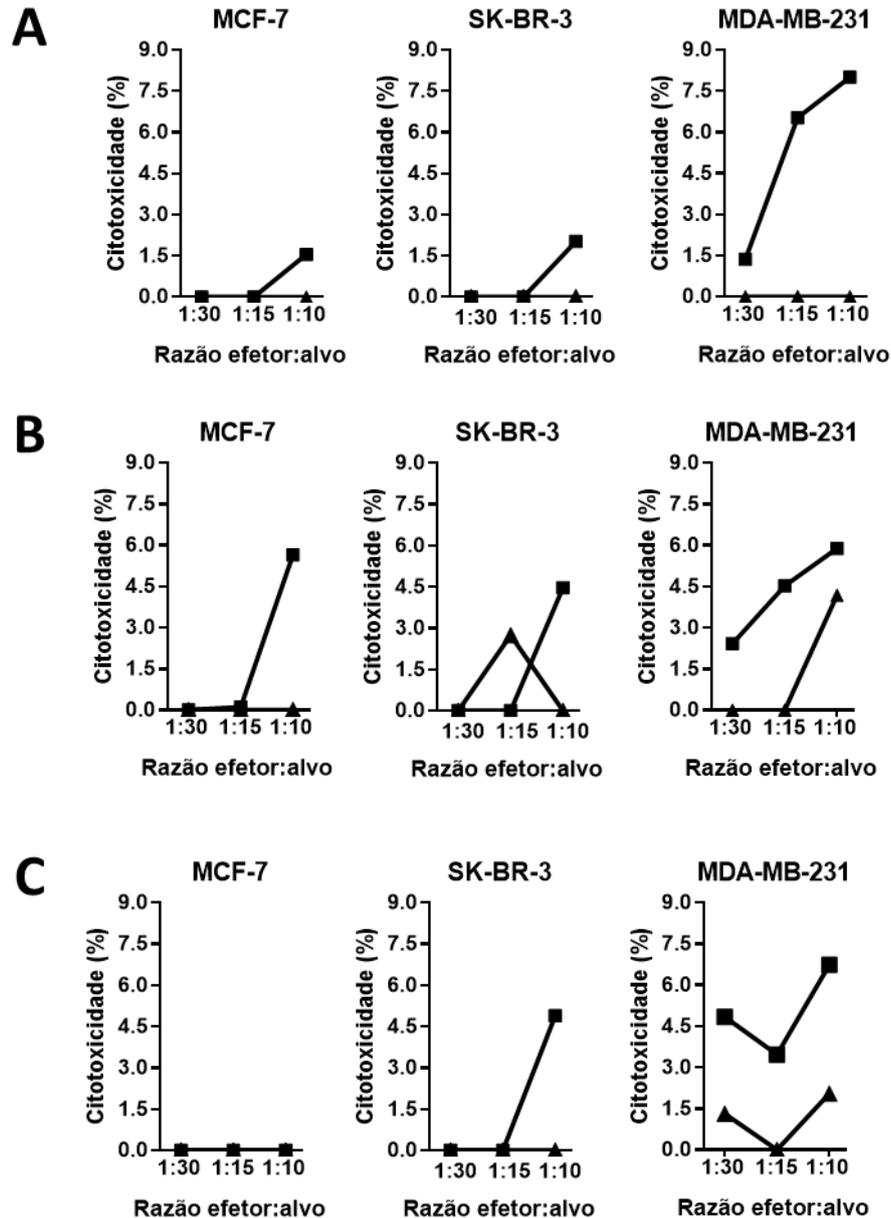
4.7 Características dos linfócitos T CD8 reativos para tumores de mama

Linfócitos T CD8 são frequentemente reconhecidos por sua capacidade citolítica, e, no contexto tumoral, sua habilidade de reconhecer e eliminar especificamente células transformadas. Os linfócitos T CD8 reativos para os lisados de tumores de mama encontrados foram, então, avaliados quanto a sua capacidade citotóxica e fenótipo, que mostraram um possível desvio na função efetora de tais células. Assim, avaliamos a possibilidade de tais células apresentarem uma função supressora, que é a muito tempo conhecida, mas, geralmente, subestimada e ignorada pela literatura.

4.7.1 Capacidade citotóxica de linfócitos T CD8 reativos para câncer de mama

Avaliamos, utilizando o ensaio de citotoxicidade descrito anteriormente, a capacidade de linfócitos T CD8 do sangue de dois indivíduos com câncer de mama de lisarem células das linhagens celulares modelo. Para isso, foram isolados e expandidos linfócitos T CD8 reativos para cada uma das linhagens, que foram então cultivados em diferentes proporções na presença destas mesmas linhagens. Ao contrário do observado com os linfócitos T CD8 reativos para Her2, não houve um efeito de citotoxicidade dose-resposta claro pelos linfócitos T reativos para lisados tumorais (Figura 36). Mais do que isso, os linfócitos T reativos para linhagens não foram, de modo geral, capazes de eliminar preferencialmente as células das linhagens para os quais estes eram específicos. Além de apresentarem uma capacidade citolítica reduzida, em algumas situações onde não foi detectado citotoxicidade, os linfócitos T foram capazes de, na verdade, aumentar a viabilidade das células na cultura, ao invés de diminuir (dados não mostrados). Como a citotoxicidade é um evento que depende da interação entre o TCR do linfócito T e o complexo peptídeo-MHC das células tumorais (JANEWAY JR et al., 2001), e o ensaio foi feito com linfócitos de um indivíduo e células de linhagens que pertencem a outros pacientes, os efeitos aqui observados podem ser decorrentes das diferenças nos alelos de MHC dos indivíduos envolvidos. Assim, um ensaio com linfócitos T e células tumorais autólogas foi realizado, para melhor medir o potencial citotóxico destes linfócitos T CD8 tumor-reativos.

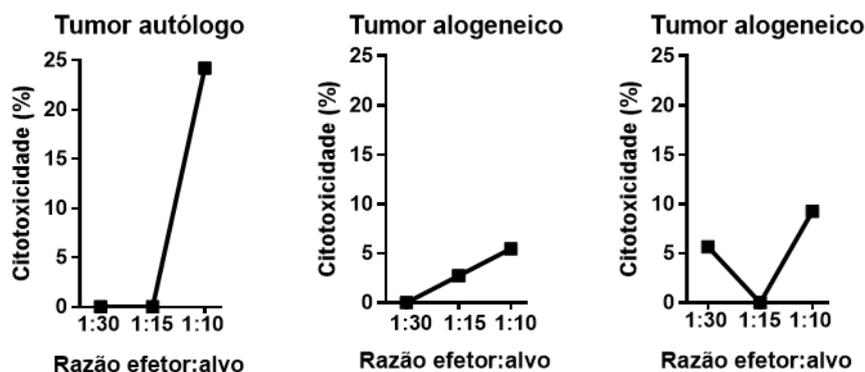
Figura 36 – Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 reativos para linhagens tumorais de mama. Percentagem de citotoxicidade de células das linhagens MCF-7, SK-BR-3 e MDA-MB-231, quando na presença de diferentes quantidades de linfócitos T CD8 tumor-reativos obtidos de dois pacientes com câncer de mama (distinguidos pelos símbolos quadrado e triângulo). (A) Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 reativos para MCF-7. (B) Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 reativos para SK-BR-3. (C) Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 reativos para MDA-MB-231.



Mesmo em uma configuração autóloga, os linfócitos T reativos para tumores de mama só foram capazes de matar as células tumorais na maior razão efetor:alvo testada (Figura 37). Nesta mesma razão de células efetores e células alvo, estes linfócitos T também foram capazes de eliminar células primárias provenientes de dois

outros indivíduos com câncer de mama do mesmo subtipo (luminal), mas com uma menor eficiência.

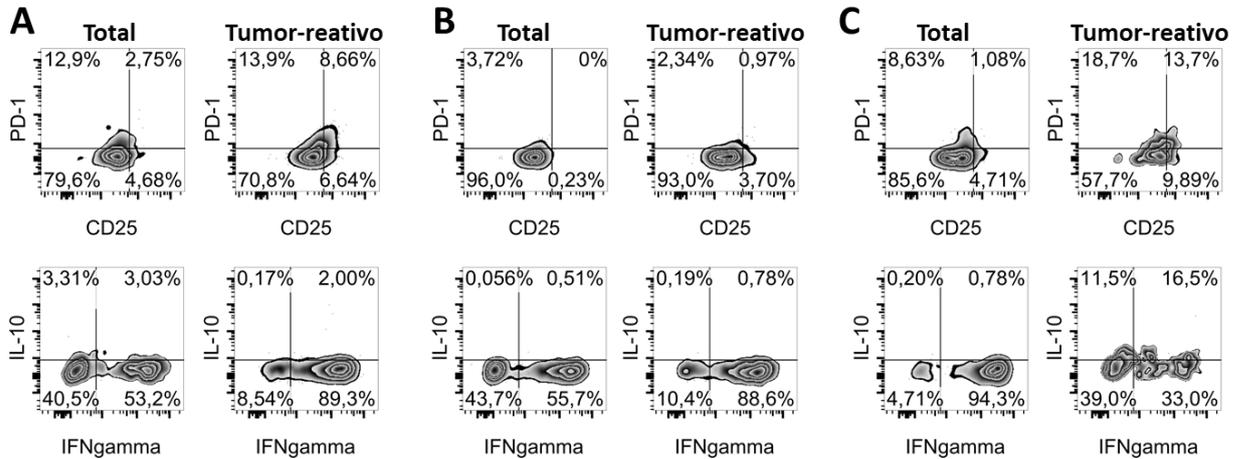
Figura 37 – Citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8 reativos para o lisado tumoral autólogo de um paciente. Porcentagem de citotoxicidade de células tumorais primárias, quando na presença de diferentes quantidades de linfócitos T CD8 tumor-reativos. Linfócitos T CD8 reativos para o tumor autólogo do paciente foram obtidos e utilizados para desafiar células tumorais tanto autólogas (esquerda) quanto alogeneicas (meio e direita). Todos os tumores utilizados eram do subtipo luminal.



É importante ressaltar que a razão entre a quantidade de linfócitos T e de células tumorais plaqueada nestes ensaios foi inferior à geralmente utilizada na literatura, de mais de uma célula efetora para cada célula alvo (WONDERLICH et al., 2006). Na maioria dos casos o ensaio é realizado sem a purificação dos linfócitos T específicos para o alvo, o que justifica tal razão elevada. Como em nosso ensaio é feito a seleção das células reativas, uma proporção como a que utilizamos deveria ser suficiente para detectar a capacidade citotóxica destas células, como, de fato, detectamos para os linfócitos T CD8 Her2-reativos. Logo, a baixa citotoxicidade observada pode indicar que os linfócitos T CD8 reativos para câncer de mama encontrados apresentam uma baixa capacidade citotóxica.

Em busca de uma possível explicação para a baixa citotoxicidade observada, avaliamos a expressão da molécula inibitória PD-1 por estes linfócitos T, assim como sua capacidade de produzir as citocinas IFN- γ e IL-10 (Figura 38). Os linfócitos T tumor-reativos do sangue de um doador saudável expressaram níveis de PD-1 maiores do que o encontrado no sangue do paciente. Este fenômeno pode vir a ser um reflexo da similaridade que os antígenos tumorais têm de proteínas próprias. Por outro lado, porém, os linfócitos T CD8 tumor-reativos, do sangue do paciente e do controle, expressaram mais IFN- γ do que os linfócitos T ativados com dynabeads, ao contrário do observado com os linfócitos T reativos para Her2.

Figura 38 – Fenótipo dos linfócitos T CD8 reativos para tumor de mama de um paciente. Expressão de PD-1, CD25, IL-10 e IFN- γ por linfócitos T totais e tumor-reativos. (A) Linfócitos T do sangue de um doador saudável. (B) Linfócitos T do sangue de um indivíduo com câncer de mama. (C) Linfócitos T-TIL do mesmo paciente.



Conforme esperávamos, os linfócitos T CD8 tumor-reativos presentes no tumor do paciente apresentaram um perfil mais associado à perda de sua função efetora, com menor produção de IFN- γ , maior secreção de IL-10, além de alta expressão de PD-1, presente em mais de 30% destas células. Como estas características não foram encontradas nas células tumor-reativas presentes no sangue, é provável que estas tenham sido adquiridas ao adentrar no tumor, e não durante o processo de *priming*, uma vez que a migração seletiva de linfócitos T com estas características parece uma explicação bastante improvável. Considerando o microambiente supressor que já foi descrito no câncer de mama (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015), a possível mudança de fenótipo ao adentrar neste microambiente não seria surpreendente. De fato, a expressão de PD-1 que encontramos nos linfócitos T infiltrantes de mama (dados não mostrados) é comparável ao que já foi encontrado em pacientes com melanoma, cujos tumores apresentam um microambiente bastante desfavorável à ativação linfocitária (EGELSTON et al., 2018). Porém, Egelston e colaboradores mostraram que estes linfócitos T CD8 presentes no câncer de mama, apesar de sua expressão de PD-1, retêm sua capacidade de produzir citocinas, como IFN- γ , quando ativados com PMA e ionomicina. De fato, o mesmo fenômeno foi observado por nós neste paciente, uma vez que a grande maioria de seus linfócitos T infiltrantes foram capazes de produzir tal citocina com o mesmo estímulo. O que observamos, todavia, é que o mesmo não é verdade quando se consideram apenas os linfócitos T infiltrantes que são reativos ao tumor, que, como mostramos anteriormente, parecem ser a minoria

dentre os T-TIL. Os mesmos autores também mostraram que os T-TIL retiveram sua capacidade citotóxica mas, novamente, essa não foi medida de uma maneira tumor específica, sendo utilizado anticorpos bi-específicos para engajar todos os linfócitos T, independente de sua especificidade, contra o alvo desejado. Assim sendo, apesar destes linfócitos T infiltrantes não apresentarem defeitos gerais, nossos resultados indicam que aqueles tumor-específicos podem apresentar alterações de função.

4.7.2 *Possível viés supressor de células T CD8 reativas para câncer de mama*

Linfócitos T CD8 podem apresentar um papel supressor da resposta, apesar deste ser geralmente esquecido pela literatura (WALLER et al., 2006). Esta função, que também foi observada em linfócitos T CD8 específicos para antígenos tumorais (OLSON et al., 2012), poderia atrapalhar uma resposta imune antitumoral protetora (JARNICKI et al., 2006). Assim, experimentos foram feitos visando analisar um possível perfil supressor dos linfócitos T CD8 reativos para câncer de mama. Primeiramente, um ensaio piloto foi realizado, cocultivando linfócitos T CD4 marcados com CFSE com linfócitos T CD8 que marcados com CTV (Figura 39A). Este ensaio foi realizado com linfócitos T CD8 positivos ou negativos para CD103, uma vez que esta molécula já foi correlacionada com o fenótipo supressor de células CD8 em humanos (USS et al., 2006). De fato, linfócitos T CD8 que expressavam CD103, mas não os que eram negativos para esse marcador, foram capazes de diminuir, de maneira dose-dependente, a proliferação de linfócitos T CD8 (Figura 39B e C).

Em seguida, uma vez que a expressão de CD103 se mostrou relevante para o fenótipo supressor, avaliamos a expressão deste nos linfócitos T CD8 do sangue e infiltrantes do tumor, encontrando uma expressão maior deste marcador dentre os linfócitos T CD8 infiltrando o tumor (Figura 40). O CD103 é uma integrina capaz de se ligar a E-caderinas expressas por células epiteliais, levando à retenção destes nos tecidos epiteliais (CEPEK et al., 1994). Linfócitos T positivos para CD103 podem ser encontrados principalmente no compartimento epitelial de tumores de mama (WANG et al., 2016). Devido à sua função, a expressão de CD103 nos linfócitos T infiltrantes de mama, conforme encontramos, seria esperada. Por outro lado, em camundongos, linfócitos T CD4 positivos para Foxp3 parecem expressar altos níveis de CD103 (ANZ et al., 2011).

Figura 39 – Ensaio de citotoxicidade com linfócitos T CD103 positivos ou negativos. (A) Diluição da marcação de CFSE e CTV na cocultura de linfócitos T CD4 e CD8, após estes terem sido marcados com CFSE e CTV, respectivamente, e cultivados na presença de dynabeads por três dias. (B) Porcentagem de proliferação de linfócitos T CD4 na presença de linfócitos T CD8 positivos para CD103 em diferentes razões. (C) Porcentagem de proliferação de linfócitos T CD4 na presença de linfócitos T CD8 negativos para CD103 em diferentes razões.

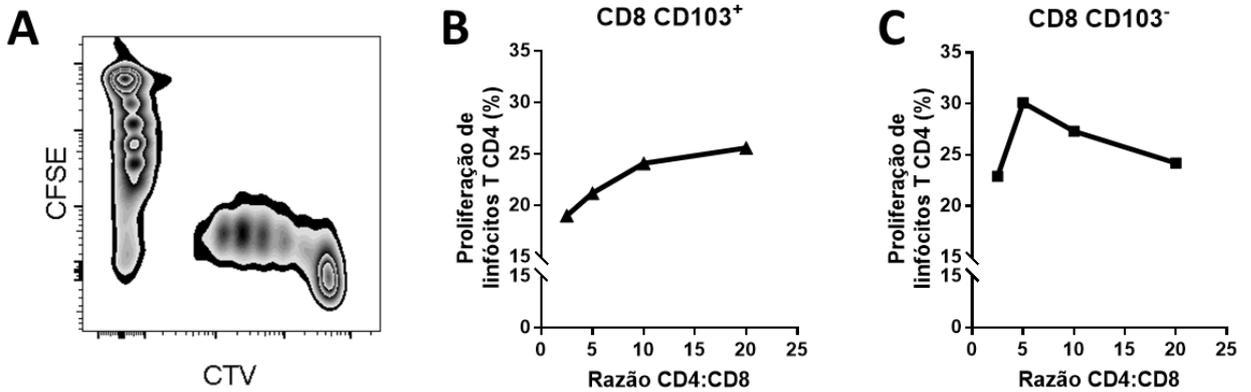
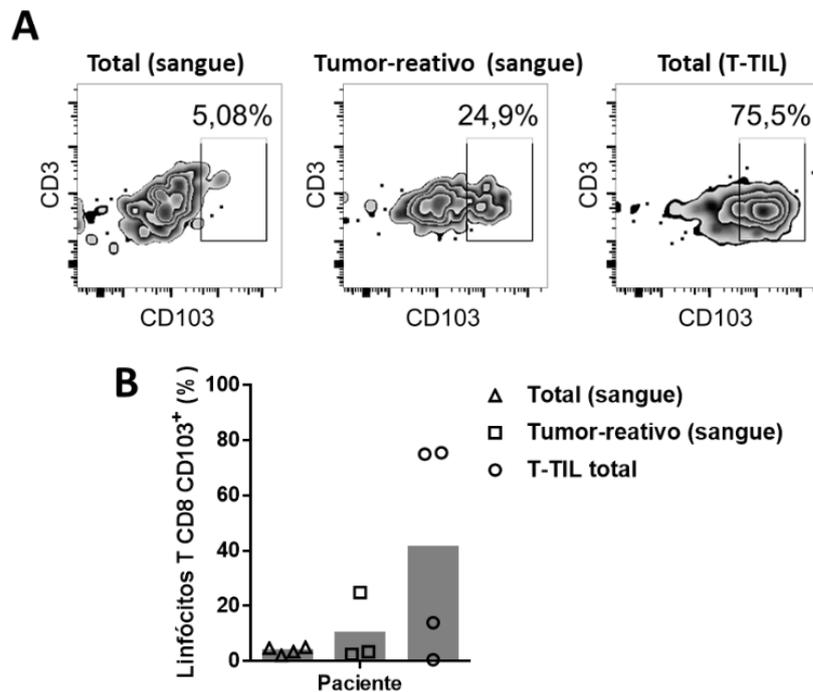


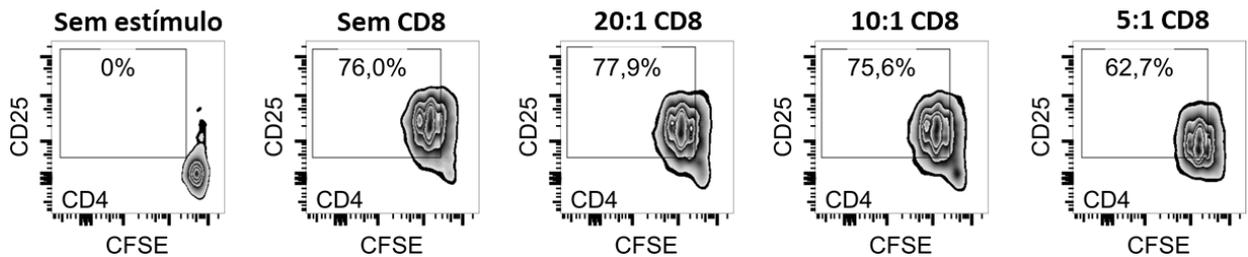
Figura 40 – Expressão de CD103 por linfócitos T CD8 de pacientes com câncer de mama. (A) Gráficos representativos da expressão de CD103 em linfócitos T totais do sangue, linfócitos T tumor-reativos no sangue e linfócitos T totais infiltrando o tumor (T-TIL). (B) Porcentagem de linfócitos T totais ou reativos para tumor que apresentaram expressão de CD103.



Para verificar se, de fato, os linfócitos T CD8 tumor-reativos que expressavam CD103 eram capazes de exercer uma função supressora, realizamos um ensaio supressor com um paciente que apresentava expressão de CD103 por seus linfócitos T tumor-reativos do sangue. Neste ensaio, fomos capazes de observar uma redução

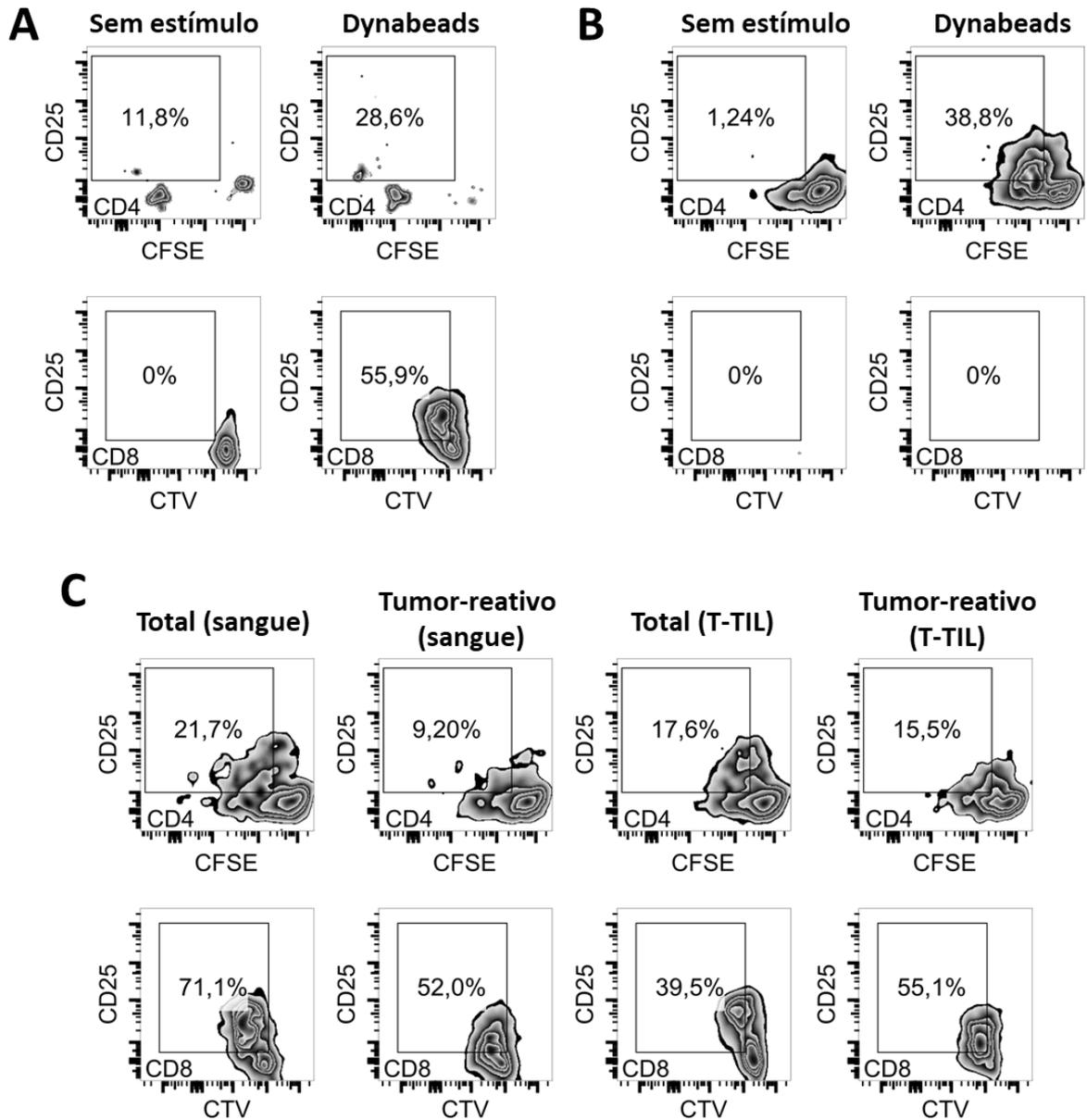
modesta na proliferação dos linfócitos T CD4, ao utilizar a maior proporção testada de linfócitos T CD8 para linfócitos T CD4 (1:5) (Figura 41). Visando confirmar tais resultados, um segundo experimento foi realizado, desta vez com uma proporção maior de linfócitos T CD8 para linfócitos T CD4 (1:1), com linfócitos T tanto sanguíneos quanto infiltrantes do tumor, que eram ou não reativos para o tumor de um paciente. Nesta proporção, todos os quatro tipos de linfócitos T CD8 foram capazes de suprimir, de maneira mais relevante, a proliferação dos linfócitos T CD4 (Figura 42). Os linfócitos T CD8 tumor-reativos do sangue foram, dentre as populações avaliadas, os com maior capacidade supressora.

Figura 41 – Proliferação de linfócitos T CD4 na presença de linfócitos T CD8 reativos para câncer de mama. Expressão de CD25 e diluição de CFSE em linfócitos T CD4 de um paciente na ausência de estímulo, ou estimulados com dynabeads. Estes, por sua vez, foram cultivados na ausência de linfócitos T CD4 (sem CD8), ou na presença de linfócitos T CD8 tumor-reativos do sangue do paciente, em diferentes proporções.



Estes dados indicam que linfócitos T CD8 tumor-reativos em câncer de mama podem apresentar um fenótipo supressor, mas, este, não poderia ser explicado apenas pela expressão de CD103 em sua membrana. Diversos marcadores – CD28, CD45RA CD122, CTLA-4, CD122, entre outros – já foram associados ao fenótipo de linfócitos T CD8 reguladores, porém, estes parecem dizer mais sobre o estado de diferenciação destas células do que, de fato, sobre sua função (BÉZIE; ANEGON; GUILLONNEAU, 2018; USS et al., 2006). Assim como para linfócitos T CD4, populações distintas de linfócitos T CD8 supressores têm sido caracterizadas em humanos (XU et al., 2016). Porém, a distinção fenotípica e funcional entre os diferentes subtipos ainda necessita de mais estudos. Os dados aqui mostrados, apesar de não definitivos, reitera a importância de um estudo mais aprofundado de células CD8 com funções reguladoras, para que haja um melhor entendimento do real papel destas células na resposta imune contra o câncer.

Figura 42 – Supressão da proliferação de linfócitos T CD4 por linfócitos T CD8 de um paciente com câncer de mama. (A) Proliferação de linfócitos T CD8 purificados, na ausência ou presença de estímulo com dynabeads. (B) Proliferação de linfócitos T CD4 purificados, na ausência ou presença de estímulo com dynabeads. (C) Proliferação de linfócitos T CD4 estimulados com dynabeads, na presença de linfócitos T CD8 na proporção de 1:1. Foram utilizados linfócitos T CD8 total e tumor-reativos obtidos do sangue e do tumor de um paciente com câncer de mama.



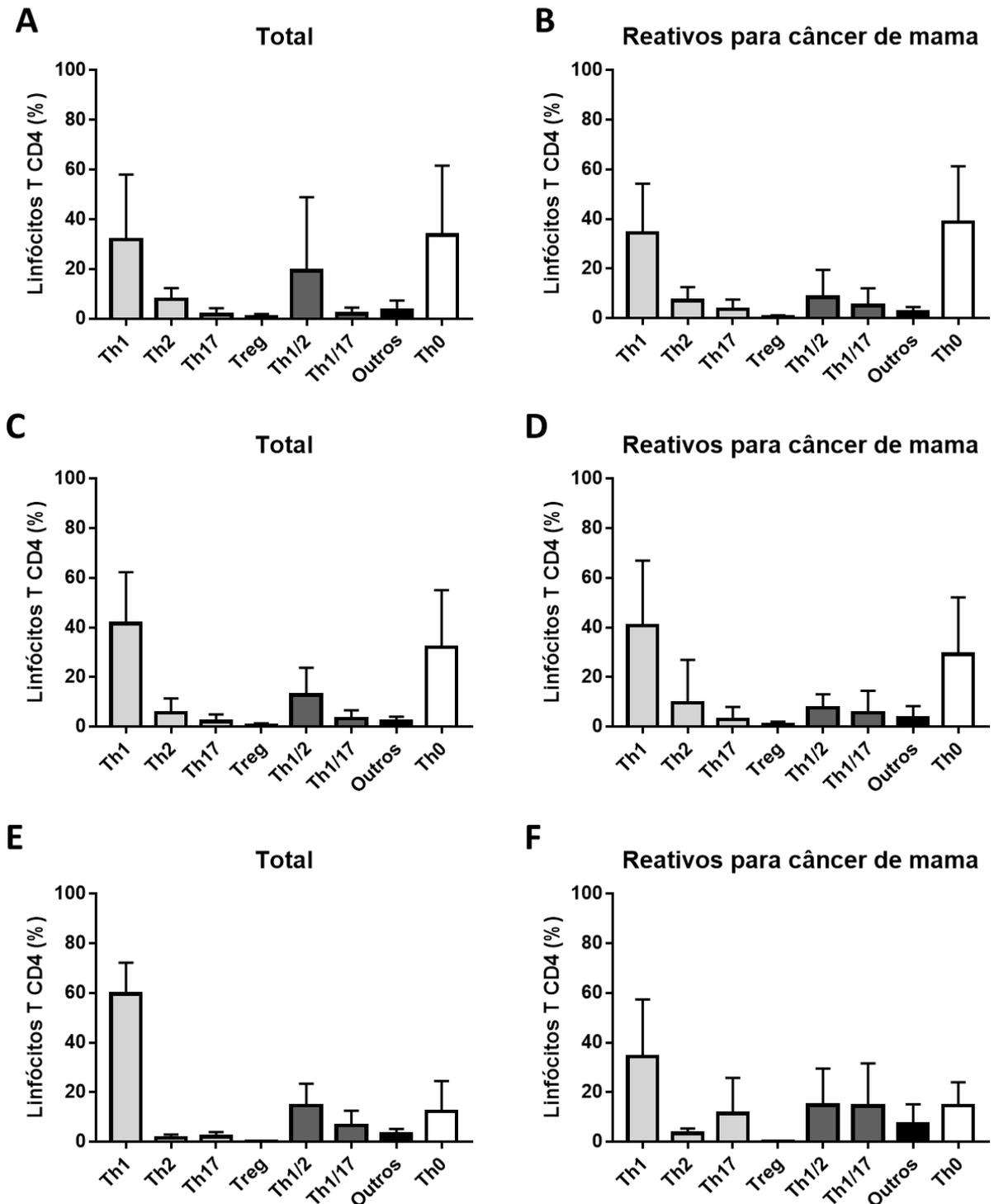
4.8 Função dos linfócitos T CD4 reativos para tumores de mama

Linfócitos T CD4 reativos para tumores de mama foram encontrados, com diferentes frequências, entre indivíduos com e sem tumores de mama. A determinação da função destes na resposta imune ao câncer foi avaliada utilizando diferentes estratégias. Primeiramente, os linfócitos T CD4 foram avaliados quanto ao padrão de secreção de citocinas, para determinar a porcentagem de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg dentre estas células. A estabilidade de tal fenótipo T *helper* nas células reativas para tumores foi avaliada ao nível de célula única, utilizando-se clones de linfócitos T CD4 tumor-reativos obtidos dos pacientes. Por fim, estudos foram feitos visando avaliar a função destes linfócitos T CD4, por meio da avaliação de seu fenótipo de membrana e de ensaios realizados com os sobrenadantes destas células, realizando-se, também, estudos de correlação entre a presença destas células e neutrófilos no tumor.

4.8.1 Secreção de citocinas por células T CD4 reativas para câncer de mama

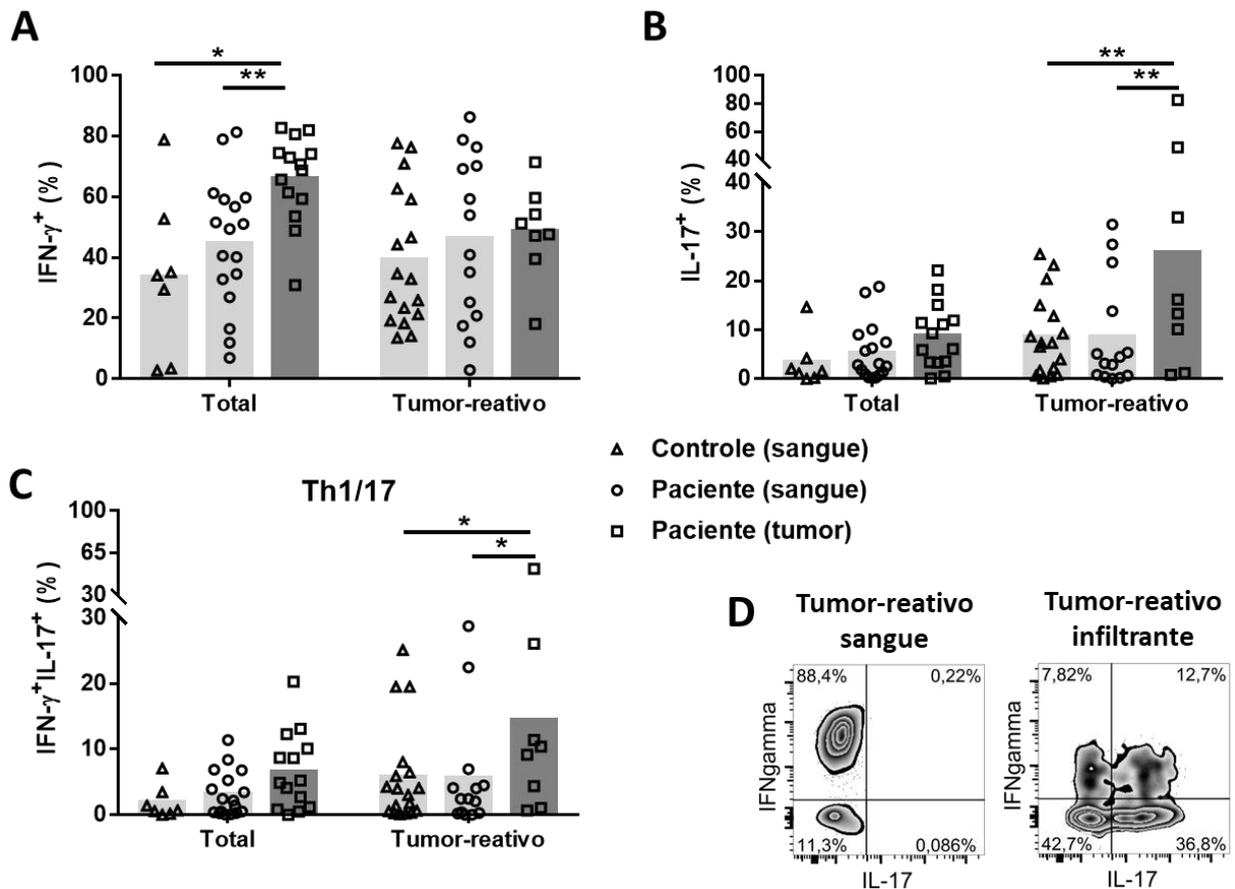
No intuito de determinar o padrão de resposta dos linfócitos T CD4 tumor-reativos encontrados em controles e pacientes, o perfil de secreção destes foi avaliado por citometria de fluxo, por meio da marcação intracelular com anticorpos específicos para as citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 (ver Figura 12). Para isso, as células que proliferaram na presença de DC carregadas com lisados tumorais (CFSE^{low}CD25⁺) foram purificadas, expandidas (com PBMC alogeneicas e PHA), e tratadas com PMA e ionomicina, e brefeldina. O padrão de produção de citocinas por linfócitos T reativos para tumores de mama foi comparado com o obtido com as células que proliferaram após ativação com antiCD3/CD28 (dynabeds). As células assim obtidas apresentam múltiplas especificidades, e, portanto, permitem inferir o padrão de citocinas que se obteria ao submeter todos os linfócitos T de um indivíduo aos processos de ativação, separação e expansão, necessários para esta análise. A porcentagem de linfócitos T com os diferentes perfis analisados foi calculada por meio da análise booleana da expressão das quatro citocinas estudadas.

Figura 43 – Perfil dos linfócitos T CD4 reativos para câncer de mama. Porcentagem de linfócitos T CD4, em doadores saudáveis e pacientes com câncer de mama, com fenótipo Th1 (IFN- γ^+), Th2 (IL-4 $^+$), Th17 (IL-17 $^+$), Treg (IL-10 $^+$), Th1/2 (IFN- γ^+ IL-4 $^+$), Th1/17 (IFN- γ^+ IL-17 $^+$), com outros perfis, ou Th0 (IFN- γ^- IL-4 $^-$ IL-17 $^-$ IL-10 $^-$). Linfócitos T totais são aqueles que apresentaram fenótipo CFSE low CD25 $^+$ após ativação com dynabeads. Linfócitos T reativos para câncer de mama foram aqueles que apresentaram fenótipo CFSE low CD25 $^+$ após cocultura com DC carregadas com lisados tumorais. (A) Linfócitos T totais no sangue de indivíduos controles (n=7). (B) Linfócitos tumor-reativos no sangue de indivíduos controles (n=8). (C) Linfócitos T totais no sangue de doentes com câncer de mama (n=17). (D) Linfócitos tumor-reativos no sangue dos doentes (n=14). (E) Linfócitos T totais no tumor dos pacientes (n=14). (F) Linfócitos tumor-reativos infiltrando tumores de mama (n=8).



Nos doadores saudáveis, o perfil de citocinas produzido pelos linfócitos T CD4 reativos para tumores de mama foi bastante similar ao obtido dentre os linfócitos T totais presentes no sangue desses indivíduos (Figura 43). Ademais, linfócitos T CD4 do sangue dos doentes apresentaram um fenótipo parecido ao encontrado nos doadores saudáveis, o que também foi observado dentre os linfócitos T tumor-reativos sanguíneos. Juntos, estes dados indicam que a presença do tumor de mama não foi suficiente para causar mudanças significativas nas células sanguíneas.

Figura 44 – Padrão Th1/Th17 dentre linfócitos T específicos para câncer de mama. (A) Porcentagem de linfócitos T totais ou tumor-reativos capazes de secretar IFN- γ . (B) Porcentagem de linfócitos T totais ou tumor-reativos capazes de secretar IL-17. (C) Porcentagem de linfócitos T totais ou tumor-reativos com fenótipo Th1/17, ou seja, duplo produtores de IFN- γ e IL-17. (D) Gráfico representativo da expressão de IFN- γ e IL-17 por linfócitos T tumor-reativos presentes no sangue e infiltrantes de um tumor de mama.



Ao analisar os linfócitos T infiltrantes do tumor, porém, diversas diferenças significativas foram encontradas, principalmente com relação às citocinas IFN- γ e IL-17. A porcentagem de linfócitos T produtores de IFN- γ dentre os T-TIL foi significativamente maior ao encontrado no sangue tanto dos pacientes, quanto dos

doadores saudáveis, o que não aconteceu quando se analisou apenas os linfócitos T reativos para o tumor (Figura 44A). Por outro lado, aqueles capazes de reagir contra antígenos tumorais presentes no tumor dos pacientes apresentaram maior capacidade de produzir IL-17 (Figura 44B). A presença de linfócitos Th17 em câncer de mama já foi descrita, sendo relacionada tanto a um papel anti quanto pró-tumoral (THIBAUDIN et al., 2016; YANG et al., 2012). Ao analisar a expressão combinada das citocinas IFN- γ e IL-17 nos linfócitos T, observamos um aumento significativo de linfócitos Th1/17, duplo produtores destas citocinas, dentre os linfócitos T tumor-reativos infiltrando o tumor dos doentes (Figura 44C). A estabilidade destas células Th1/17, assim como sua possível função no câncer de mama, serão discutidas adiante.

4.8.2 *Perfil helper de clones de linfócitos T reativos para câncer de mama*

A partir dos linfócitos T tumor-reativos de pacientes isolados por FACS, fomos capazes de gerar populações de clones de linfócitos T por meio da diluição limitante e expansão com PBMC irradiadas e PHA. Intrigantemente, os clones assim gerados nem sempre apresentavam um fenótipo único de células *helper* (Figura 45). Alguns destes clones apresentaram uma população de células não-polarizadas, o que provavelmente indica uma perda da capacidade funcional destas células. Este fenótipo Th0 foi mais frequentemente encontrado nos linfócitos T isolados do sangue (Figura 46). Por outro lado, clones com células Th1/17 sempre apresentaram, junto, uma porcentagem de linfócitos Th1. Há muito se sabe da existência, em humanos, de clones de linfócitos T capazes de expressar mais de uma citocina característica de subtipos *helper* distintos (Th1 e Th2) (MEYAARD et al., 1994). De fato, hoje sabe-se que um único clone de linfócitos T CD4 é capaz de dar origem a células com fenótipos distintos, gerando populações clonais heterogêneas (BECATTINI et al., 2015). Além disso, linfócitos T *helper* apresentam alta plasticidade, podendo modificar seu fenótipo com o tempo (GEGINAT et al., 2014). Linfócitos Th17 específicos para a proteína MAGE, por exemplo, podem se converter progressivamente em linfócitos Th1/17 *in vivo* (HAMAI et al., 2012). Na verdade, linfócitos Th17 podem perder completamente sua capacidade de produzir IL-17, se tornando produtoras apenas de IFN- γ , tornando-se células ex-Th17 (linfócitos Th1 não-clássicos), que são funcionalmente distintas de células Th17 e de células Th1 (BASDEO et al., 2017).

Figura 45 – Exemplos de expressão de IFN- γ e IL-17 por clones de linfócitos T obtidos de pacientes com câncer de mama. Gráficos da expressão de IFN- γ e IL-17 obtidos de clones diferentes, sendo alguns majoritariamente produtores de IFN- γ , e outros com populações mistas não produtoras de IFN- γ ou produtoras de ambas as citocinas.

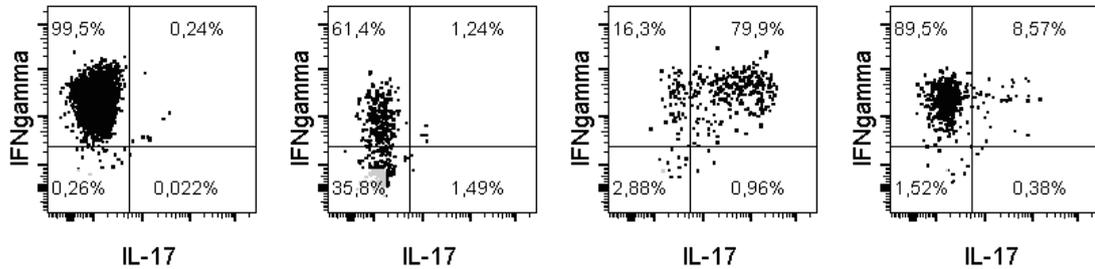
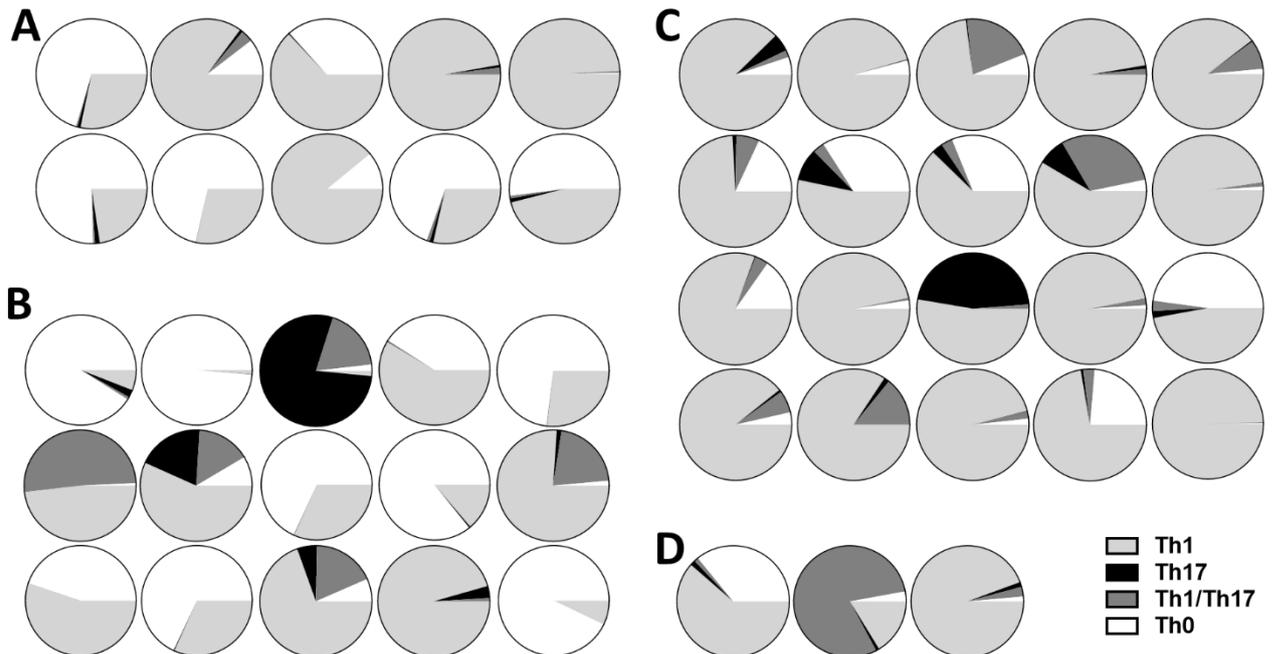


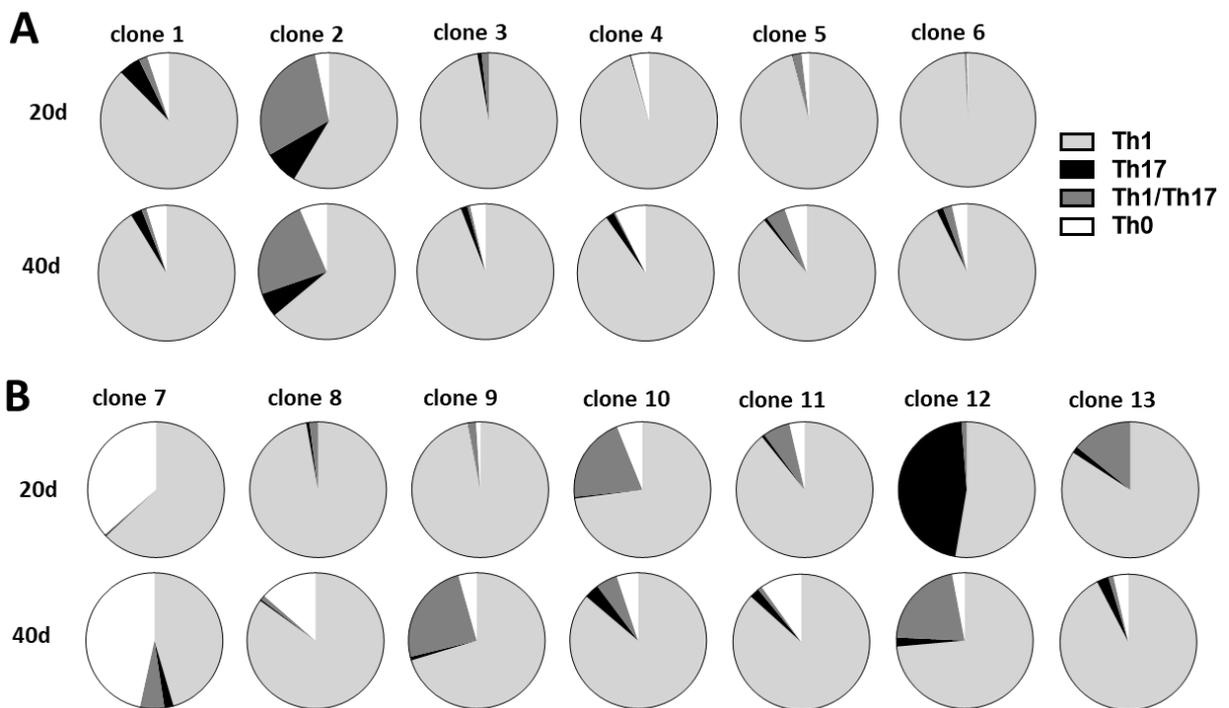
Figura 46 – Fenótipo Th1/Th17 de clones de linfócitos T obtidos de pacientes com câncer de mama. Gráficos mostrando a proporção de células de cada população clonal que expressavam IFN- γ (Th1), IL-17 (Th2), as duas (Th1/17) ou nenhuma (não-polarizado) das duas citocinas. (A) Clones de linfócitos T provenientes de linfócitos T totais do sangue de pacientes. (B) Clones de linfócitos T provenientes de linfócitos T tumor-específicos do sangue de pacientes. (C) Clones de linfócitos T provenientes de linfócitos T totais infiltrando o tumor de pacientes. (D) Clones de linfócitos T provenientes de linfócitos T tumor-reativos infiltrando o tumor de pacientes.



Assim, visando avaliar a estabilidade do fenótipo das populações clonais, e se aquelas com fenótipo produtor de IL-17 perdiam tal capacidade com o tempo, os linfócitos T foram reestimulados por mais 20 dias com PBMC alogeneicas e PHA, sendo avaliados novamente quanto a sua capacidade de produzir citocinas ao término da expansão. Dentre os clones com células suficientes para refazer a análise, muitos apresentaram um fenótipo bastante similar ao obtido anteriormente (Figura 47). De modo geral, observou-se um aumento de células não-polarizadas após a segunda

estimulação, principalmente dentre aqueles clones que já apresentavam uma população inicial de células com tal fenótipo. Isso sugere uma perda funcional das células, o que vai ao encontro dos dados de menor proliferação dos linfócitos T após expansão *in vitro* (APÊNDICE B). Este fenômeno, que já era esperado, indica que estas células podem estar sofrendo de exaustão devido ao longo tempo de cultivo e múltiplas estimulações, e reitera a importância de realização dos ensaios funcionais com células com o menor tempo de cultura possível, afim de sermos capazes de avaliar sua capacidade funcional.

Figura 47 – Análise temporal do fenótipo Th1/Th17 de clones de linfócitos T. A expressão de IFN- γ e IL-17 foi realizada em clones de linfócitos T após uma (gráfico superior) ou duas (gráfico inferior) estimulações inespecíficas de 20 dias com PBMC alogeneicas e PHA. (A) Clones que apresentaram perfil de resposta semelhante após a segunda estimulação (B) Clones que apresentaram algumas diferenças quanto ao seu padrão de secreção de citocinas.



Por outro lado, não observamos uma clara tendência dos clones com populações Th1/17 de se transformarem em Th1. Pelo contrário, o clone 9, que era majoritariamente Th1, por exemplo, passou a ter, após a segunda estimulação, mais de 20% de suas células com fenótipo Th1/17. O clone 2, que apresentava uma população mista, por outro lado, manteve praticamente a mesma proporção de células Th1, Th17 e Th1/17 (Figura 47). Assim, ao contrário do descrito na literatura, os clones aqui obtidos apresentaram expressão relativamente estável de IL-17, e de IFN- γ .

4.8.3 *Possível função supressora de linfócitos T reativos para câncer de mama*

Conforme discutido anteriormente, a função de linfócitos Th1/17 no câncer ainda é pouco elucidada. Uma vez que estes foram encontrados em maior frequência dentre os linfócitos T reativos para tumores de mama que estavam presentes dentro do tumor dos pacientes, um estudo das possíveis funções destas células foi realizado. Primeiramente, avaliamos o possível papel na resposta imune ao câncer da produção de IFN- γ por estas células. Esta citocina já foi associada a papéis antagônicos na resposta imune antitumoral (MANDAI et al., 2016). Um papel pró-tumoral que pode ser exercido por IFN- γ é o de induzir a expressão da molécula reguladora PD-L1 nas células tumorais. Em tumores de mama, a expressão de PD-L1, apesar de relativamente baixa, se correlaciona com a presença de linfócitos T citotóxicos (ALI et al., 2015), e linhagens de mama são capazes de aumentar a expressão de PD-L1 quando tratadas com IFN- γ recombinante (SOLIMAN; KHALIL; ANTONIA, 2014). Assim, avaliamos se o IFN- γ presente no sobrenadante dos linfócitos T tumor-reativos ativados poderia aumentar a expressão de PD-L1 nas células tumorais de mama.

Para isso, linfócitos T totais ou tumor-reativos foram ativados ou não com dynabeads, sendo seu sobrenadante coletado após 72 horas e adicionado a cultura de células tumorais. O sobrenadante de linfócitos T específicos e não específicos para tumores foi capaz de aumentar a expressão de PD-L1 em células da linhagem MCF-7, assim como a adição de IFN- γ a estas células (Figura 48A). Este aumento foi maior quando o sobrenadante utilizado veio de linfócitos T ativados com dynabeads. Este aumento também foi observado em células primárias tratadas com sobrenadante dos linfócitos T autólogos (Figura 48B) e em células da linhagem MCF-7 tratada com o sobrenadante de cultura de clones de linfócitos T (Figura 48C). Ainda, esta expressão de PD-L1 foi significativamente reduzida quando as células MCF-7 eram tratadas com sobrenadantes de linfócitos T que haviam sido depletados de IFN- γ por meio da ligação deste em placas recobertas de anticorpos contra esta citocina (Figura 48D). Logo, linfócitos T CD4 tumor-reativos dos pacientes foram capazes de induzir um aumento de PD-L1 nas células tumorais, sendo parte deste aumento dependente da secreção de IFN- γ por estas células. Linfócitos T não-específicos também tiveram o mesmo efeito, uma vez que estas também foram capazes de produzir tal citocina quando ativados.

Figura 48 – Expressão de PD-L1 por células tumorais tratadas com sobrenadante de linfócitos T CD4. (A) Porcentagem de expressão de PD-L1 em células MCF-7 tratadas com IFN- γ recombinante (n=4), ou sobrenadante de linfócitos T de pacientes, ativados ou não com dynabeads. Sobrenadante de linfócitos T total (n=5) e tumor-específicos (n=5) do sangue, assim como T-TIL total (n=4) e tumor-infiltrante (n=2), foram utilizados. (B) Expressão de PD-L1 de células de tumores primários tratados com sobrenadantes de linfócitos T relativa às células que não receberam o sobrenadante. (C) Expressão de PD-L1 em células MCF-7 tratadas com sobrenadante de clones de linfócitos T total (n=14) e tumor-específicos (n=12) do sangue, assim como clones de T-TIL total (n=27) e tumor-infiltrante (n=3). (D) Expressão de PD-L1 em células MCF-7 tratadas com sobrenadante de linfócitos T ativados previamente incubados em placas recobertas de anticorpos de isotipo controle (IgG) ou de anticorpos específicos para IFN- γ , e, portanto, gerando sobrenadantes depletados de tais citocinas. A expressão foi calculada relativamente ao encontrado em células MCF-7 não tratadas com sobrenadante de linfócitos T.

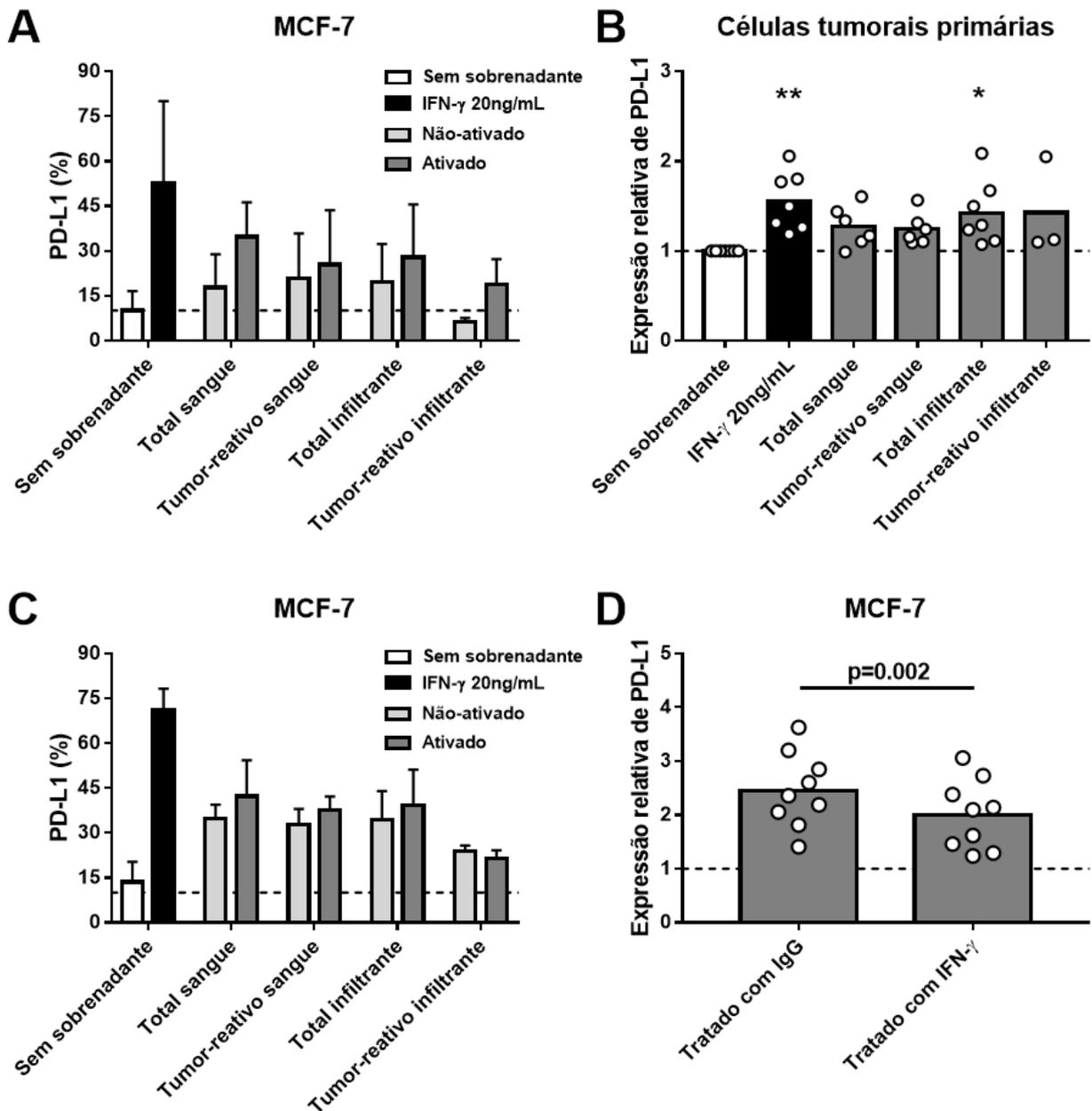
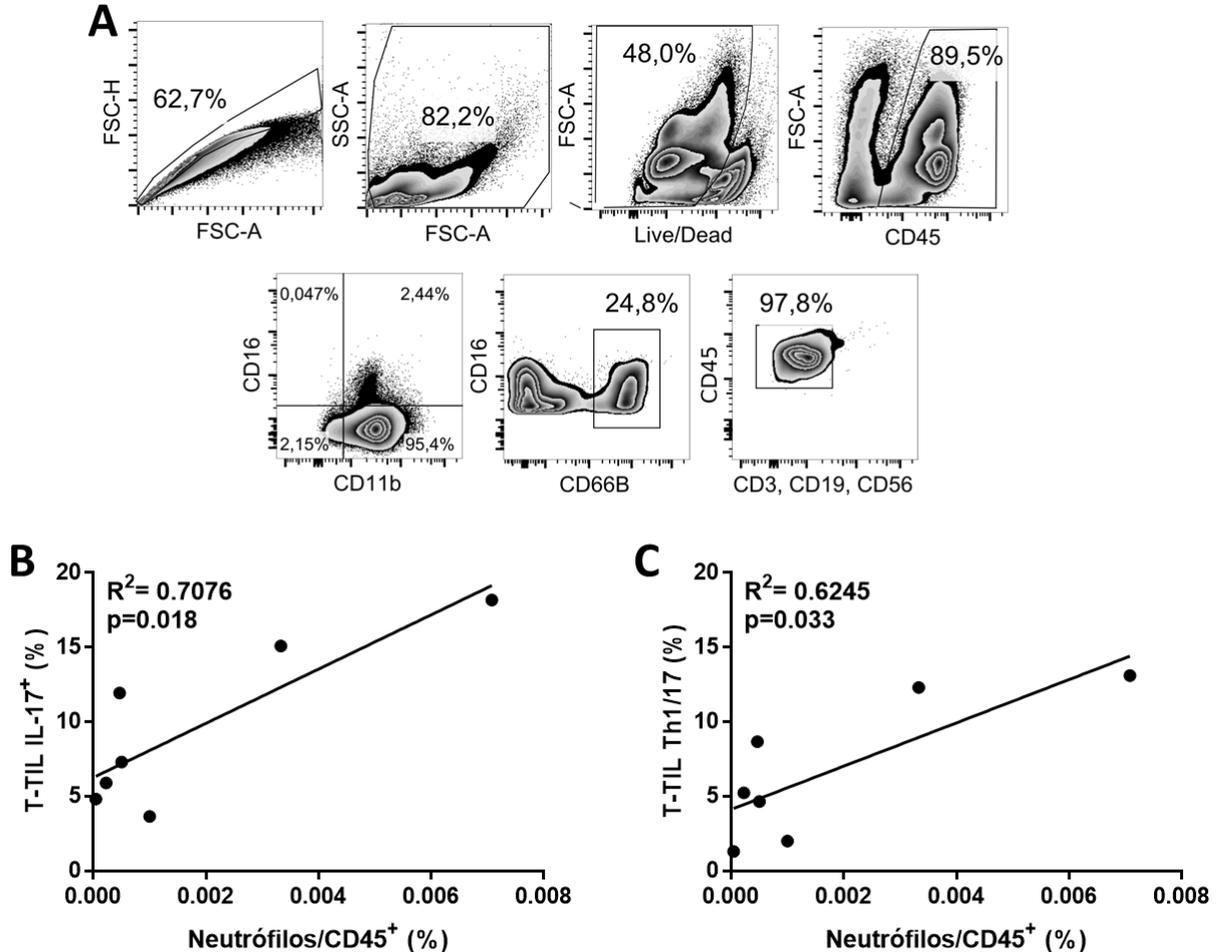


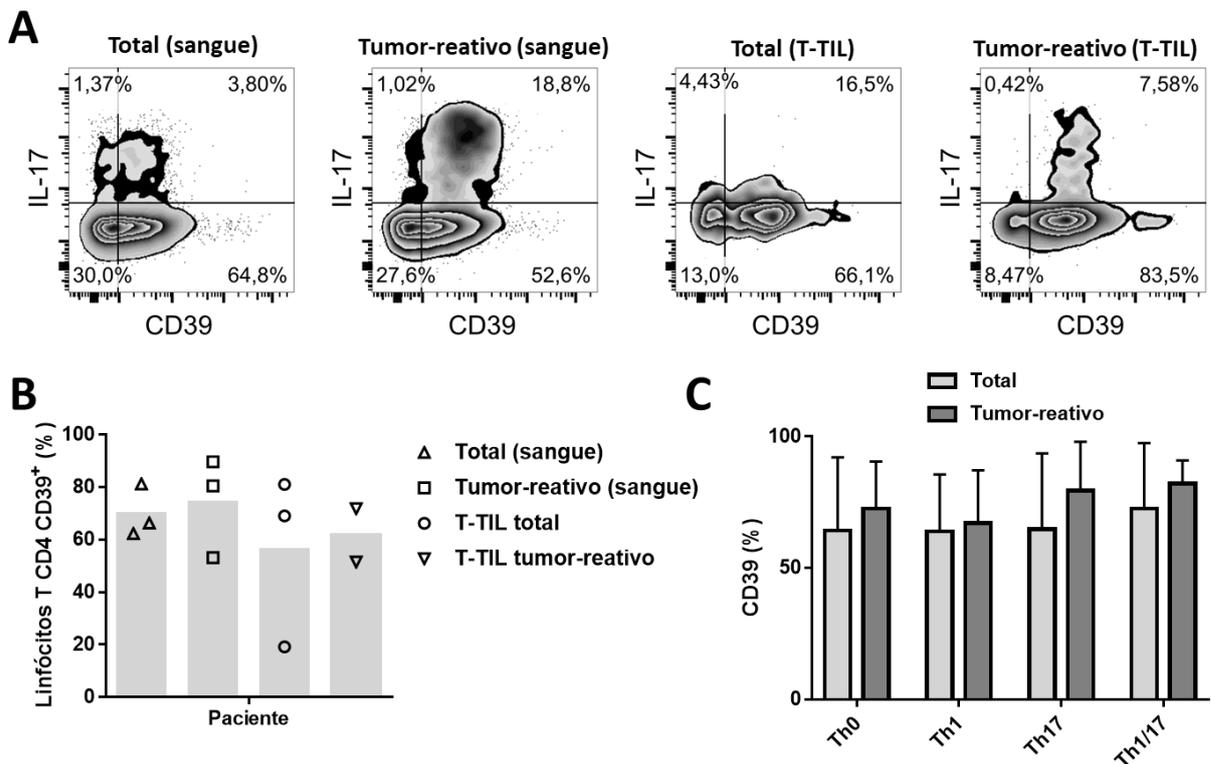
Figura 49 – Correlação entre a presença de neutrófilos infiltrantes do tumor e linfócitos Th1/17. (A) Estratégia de análise da presença de neutrófilos dentre as células presentes na suspensão obtida da digestão de tumores de mama. (B) Correlação entre a porcentagem de neutrófilos dentre o infiltrado imune (CD45) e a porcentagem de linfócitos T expressando IL-17 dentro do tumor. (C) Correlação entre a porcentagem de neutrófilos dentre o infiltrado imune (CD45) e a porcentagem de linfócitos Th1/17 dentro do tumor.



Em seguida, avaliamos a possível função da citocina IL-17 produzida pelas células Th1/17 e Th17 nos tumores de mama. Já se sabe que, em modelos de camundongo, a presença da citocina IL-17 em câncer de mama é capaz de recrutar neutrófilos pró-tumorais para o microambiente do tumor, o que auxilia na progressão da doença (BENEVIDES et al., 2015). O mesmo trabalho, realizado por cientistas brasileiros, também mostra a correlação entre a presença de IL-17 em tumores de pacientes com câncer de mama, e um pior prognóstico destes doentes. Portanto, avaliamos se haveria alguma correlação entre a presença de linfócitos T produtores de IL-17 no tumor, e a presença de neutrófilos infiltrantes. Para isso, a suspensão de células obtidas após a digestão do tumor foi avaliada por citometria de fluxo para a presença de neutrófilos (CD11b⁺CD16⁺CD66b⁺). De fato, a presença de linfócitos T

totais produtores de IL-17, e de linfócitos Th1/17 se correlacionou positivamente com a porcentagem de neutrófilos dentre o infiltrado imune presente no tumor dos pacientes com câncer (Figura 49).

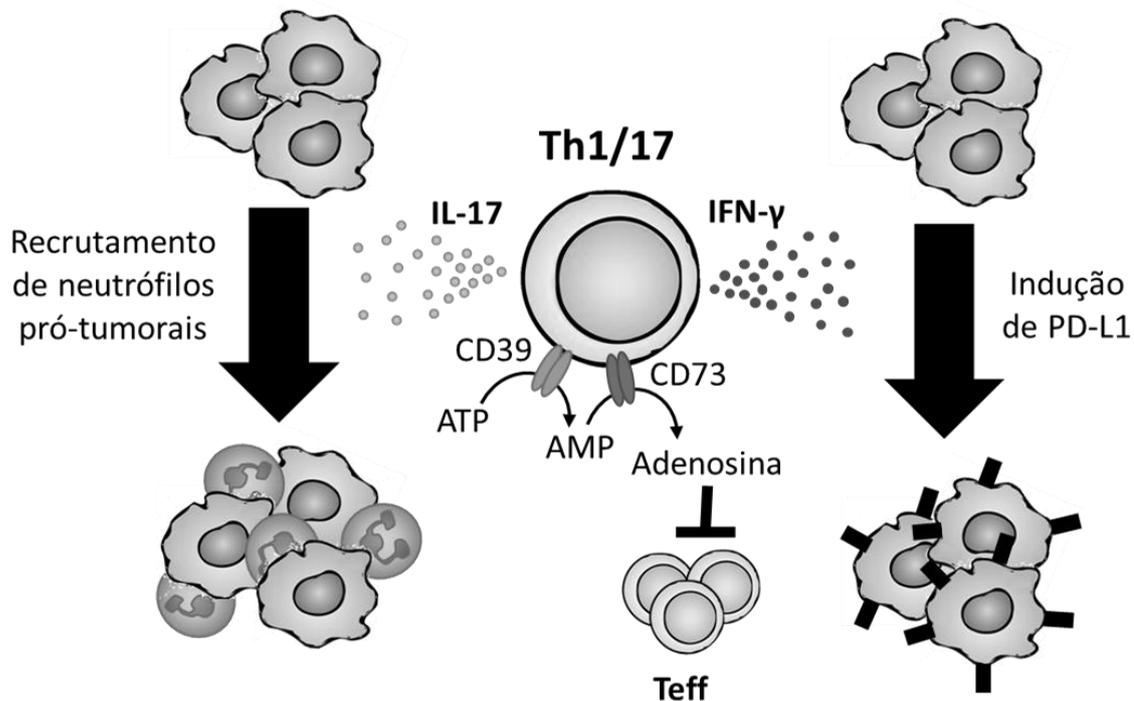
Figura 50 – Expressão de CD39 por linfócitos T reativos para tumores de mama. (A) Gráficos representativos entre a expressão de CD39 e IL-17 de linfócitos T tumor-reativos ou totais do sangue ou infiltrantes de um paciente com câncer de mama. (B) Porcentagem de linfócitos T capazes de expressar CD39, dentre aqueles reativou ou não para o tumor dos pacientes. (C) Expressão de CD39 pelas subpopulações Th0 (IFN- γ /IL-17⁻), Th1, Th17 e Th1/17 de linfócitos T totais (n=6) e tumor-reativos (n=4) do sangue e tumor de pacientes com câncer de mama.



Por fim, também avaliamos a expressão da ectonucleotidase CD39 dentre os linfócitos T reativos para tumores de três pacientes com câncer de mamas. Isto foi feito pois já foi descrito que, em tumores de mama, parece existir um acúmulo de linfócitos Th17 que expressam CD39 e CD73, que parecem ser capazes de exercer funções supressoras dependentes de adenosina (THIBAUDIN et al., 2016). Intrigantemente, todos os linfócitos T CD4 avaliados apresentaram uma alta expressão de CD39, independente de sua especificidade ser tumoral ou não (Figura 50). De fato, mesmo quando avaliamos cada população (Th0, Th1, Th17 e Th17) separadamente, não fomos capazes de encontrar uma população capaz de expressar mais CD39 do que as outras, ainda que pareça existir uma tendência de maior

expressão de CD39 pelos linfócitos Th17 e Th1/17 tumor-reativos, quando comparado aos Th17 ou Th1/17 com todas as especificidades. Estes dados indicam que linfócitos T CD4 de pacientes podem apresentar uma capacidade supressora dependente de CD39, mas esta parece não depender da especificidade destes linfócitos, nem de seu padrão de produção de citocinas.

Figura 51 – Esquema com as possíveis funções supressoras exercidas por linfócitos Th1/17 em câncer de mama. A produção de IFN- γ poderia induzir a expressão da molécula supressora PD-L1 por células tumorais, enquanto a produção de IL-17 pode induzir o recrutamento de neutrófilos pró-tumorais. Por outro lado, estas células também apresentaram expressão de CD39, que é capaz de clivar o ATP, por uma via que pode culminar na formação de adenosina, que apresenta capacidade de suprimir linfócitos T efetores.



Assim, fomos capazes de mostrar que os linfócitos Th1/17 tumor-reativos que foram encontrados nos pacientes com câncer de mama podem vir a exercer funções supressoras por três vias diferentes, ainda que estas não sejam restritas aos linfócitos Th1/17, ou a linfócitos T reativos ao tumor: a indução de PD-L1 em células tumorais relacionada à sua capacidade de produzir IFN- γ ; o recrutamento de neutrófilos pró-tumorais via produção de IL-17; e a supressão de linfócitos T efetores por meio da clivagem de ATP em adenosina, que apresenta funções supressoras (Figura 51).

4.9 Citocinas produzidas por linfócitos T CD4 reativos para glioblastoma

Como discutido anteriormente, fomos capazes de encontrar, tanto em indivíduos saudáveis como pacientes com glioblastoma multiforme, linfócitos T GBM-reativos. Além disso, essa frequência aumentou em um paciente sendo tratado com uma vacina terapêutica de híbridos de células dendríticas e células tumorais. Em vista disso, a avaliação da função de tais linfócitos se torna importante para inferir o papel (pró- ou antitumoral) que estes poderiam estar exercendo no contexto tumoral. Logo, avaliamos a capacidade de produção de citocinas características de alguns subtipos de linfócitos T helper – Th1, Th2, Th17 e Treg – pelos linfócitos T GBM-reativos encontrados no sangue dos doentes, e se esta era alterada após cirurgia e intervenção imunoterapêutica.

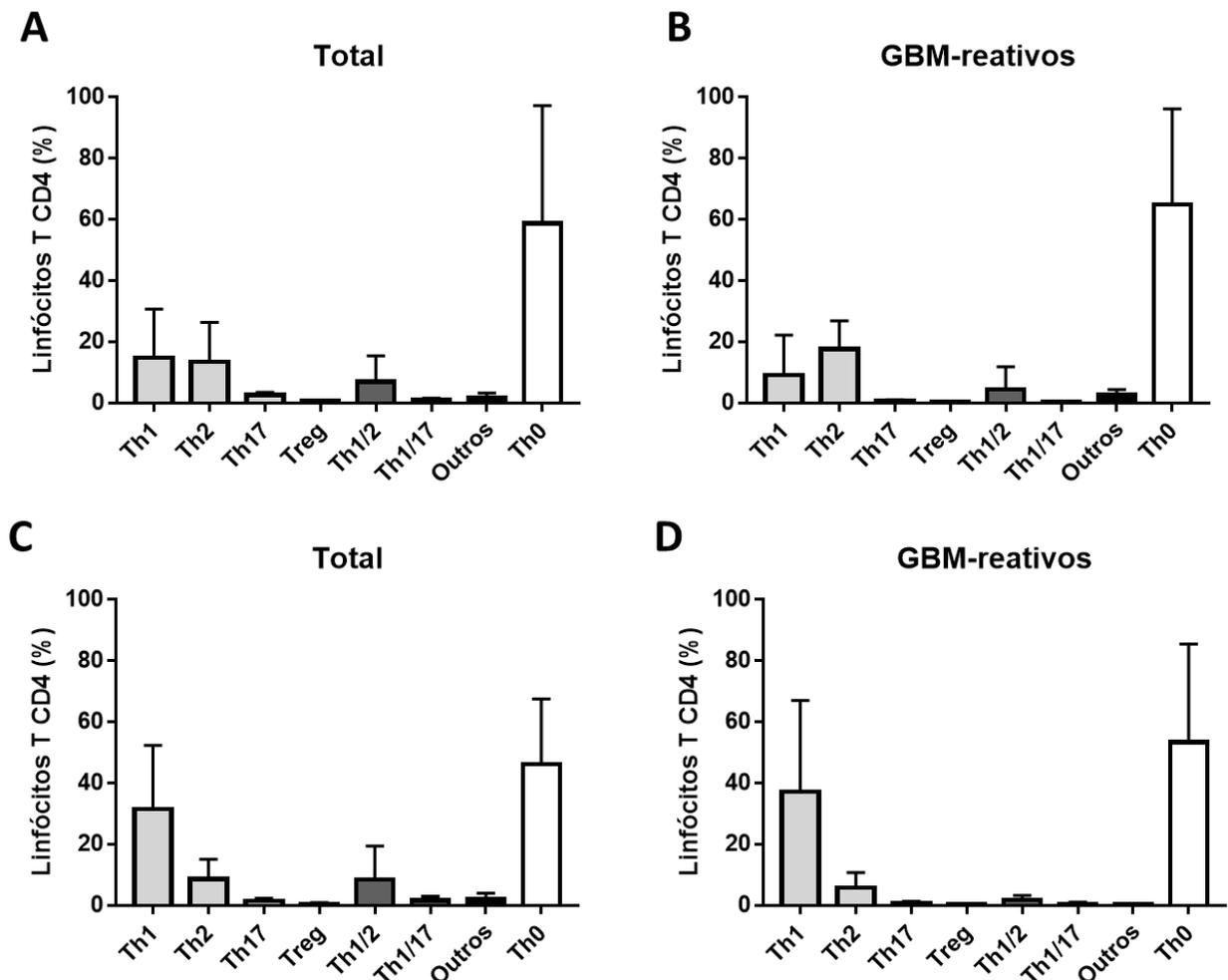
4.9.1 Padrão de produção de citocinas por linfócitos T GBM-reativos

Visando avaliar a produção de citocinas nos linfócitos T GBM-reativos, estes foram purificados por FACS (CFSE^{low}CD25⁺), expandidos com PBMC alogeneicas e PHA, e avaliados quanto a sua capacidade de produzir IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17. A porcentagem de células produtoras de cada citocina foi determinada por marcação intracelular, após tratamento destas células com PMA, ionomicina e brefeldina por 16 horas. Primeiramente, tal análise foi realizada em doadores saudáveis (Figura 52). Em doadores saudáveis, o perfil de linfócitos T *helper* encontrado nas células GBM-reativas foi bastante similar ao encontrado nos linfócitos T ativados com dynabeads, que não apresentam uma especificidade única (Figura 52A e B). Este fenômeno, que também foi encontrado utilizando-se lisados de tumores de mama, conforme mostrado anteriormente, indica que os linfócitos T tumor-reativos encontrados nos doadores saudáveis não apresentam um desvio preferencial para a produção de uma determinada citocina.

Além disso, assim como descrito para os pacientes com câncer de mama, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os linfócitos T presentes no sangue dos indivíduos saudáveis e nos indivíduos com glioblastoma multiforme estudados (Figura 52A e C), reiterando a ideia de que a presença de um tumor não é suficiente para desviar de maneira clara a resposta sistêmica de todos os linfócitos T CD4. Contrariamente, pacientes com glioblastoma parecem apresentar uma menor

concentração de IL-12 e maior concentração de IL-10 circulante (KUMAR et al., 2006). Nossos dados indicam que este efeito tumoral sistêmico, porém, deve ser causado por mudança na secreção destas citocinas por outras células, que não pelos linfócitos T CD4.

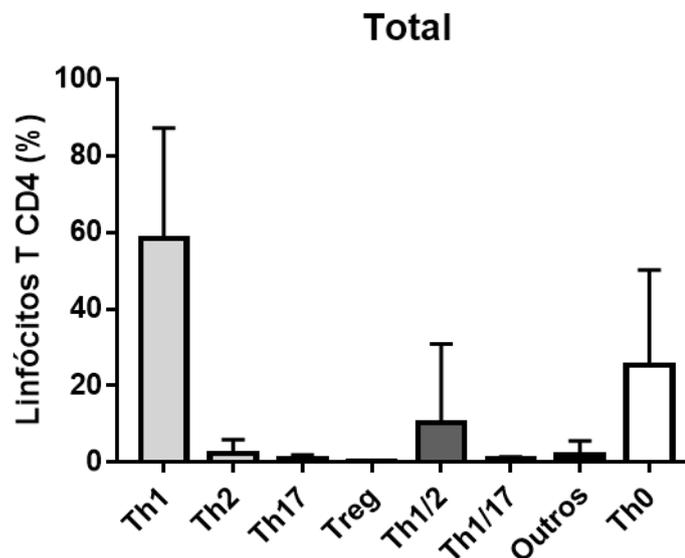
Figura 52 – Perfil dos linfócitos T CD4 GBM-reativos no sangue. Porcentagem de linfócitos T CD4, no sangue de doadores saudáveis e pacientes com GBM, com fenótipo Th1 (IFN- γ^+), Th2 (IL-4 $^+$), Th17 (IL-17 $^+$), Treg (IL-10 $^+$), Th1/2 (IFN- γ^+ IL-4 $^+$), Th1/17 (IFN- γ^+ IL-17 $^+$), com outros perfis, ou Th0 (IFN- γ^- IL-4 $^-$ IL-17 $^-$ IL-10 $^-$). Linfócitos T totais são aqueles que apresentaram fenótipo CFSE low CD25 $^+$ após ativação com dynabeads. Linfócitos T GBM-reativos foram aqueles que apresentaram fenótipo CFSE low CD25 $^+$ após cocultura com DC carregadas com lisado tumoral de pacientes. (A) Linfócitos T totais no sangue de indivíduos controles (n=2). (B) Linfócitos GBM-reativos no sangue de indivíduos controles (n=3). (C) Linfócitos T totais no sangue de pacientes com glioblastoma multiforme (n=11). (D) Linfócitos GBM-reativos no sangue de pacientes com glioblastoma multiforme (n=7).



Por outro lado, os linfócitos T GBM-reativos dos doentes apresentaram diferenças significativas quando comparado aos linfócitos T totais dos mesmos pacientes, como, por exemplo, uma menor porcentagem de linfócitos T CD4 com

fenótipo Th1/2 (porcentagem de linfócitos T CD4 totais com fenótipo Th1/2: $8,5 \pm 11,0$, $n=11$, versus porcentagem de linfócitos T CD4 GBM2-reativos com fenótipo Th1/2: $1,8 \pm 1,4$, $n=6$; $p=0,015$). Na verdade, nos doentes, os linfócitos T CD4 GBM-reativos parecem estar mais polarizados para o perfil Th1, do que os outros linfócitos do sangue do mesmo paciente. Contrariamente, Shimato e coautores reportam um viés Th2 dentre os linfócitos T tumor-específicos em pacientes com gliomas malignos, mas a análise foi realizada apenas dentre aqueles linfócitos T que eram específicos para peptídeos provenientes de dois TAA (SHIMATO et al., 2012). A literatura carece de uma análise mais ampla dos linfócitos T tumor-reativos, como a que aqui foi realizada, o que torna difícil a comparação direta entre os resultados. Podemos ressaltar, porém, que este viés de resposta Th1 dentre os linfócitos T CD4 tumor-reativo foi menor nos indivíduos com cânceres de mama, onde os linfócitos T CD4 tumor-reativos com outros fenótipos também foram encontrados com uma frequência relativamente alta.

Figura 53 – Perfil geral dos linfócitos T CD4 infiltrando tumores de GBM. Porcentagem de linfócitos T CD4, no tumor de indivíduos com glioblastoma multiforme com fenótipo Th1 (IFN- γ^+), Th2 (IL-4 $^+$), Th17 (IL-17 $^+$), Treg (IL-10 $^+$), Th1/2 (IFN- γ^+ IL-4 $^+$), Th1/17 (IFN- γ^+ IL-17 $^+$), com outros perfis, ou Th0 (IFN- γ^- IL-4 $^-$ IL-17 $^-$ IL-10 $^-$) ($n=7$).



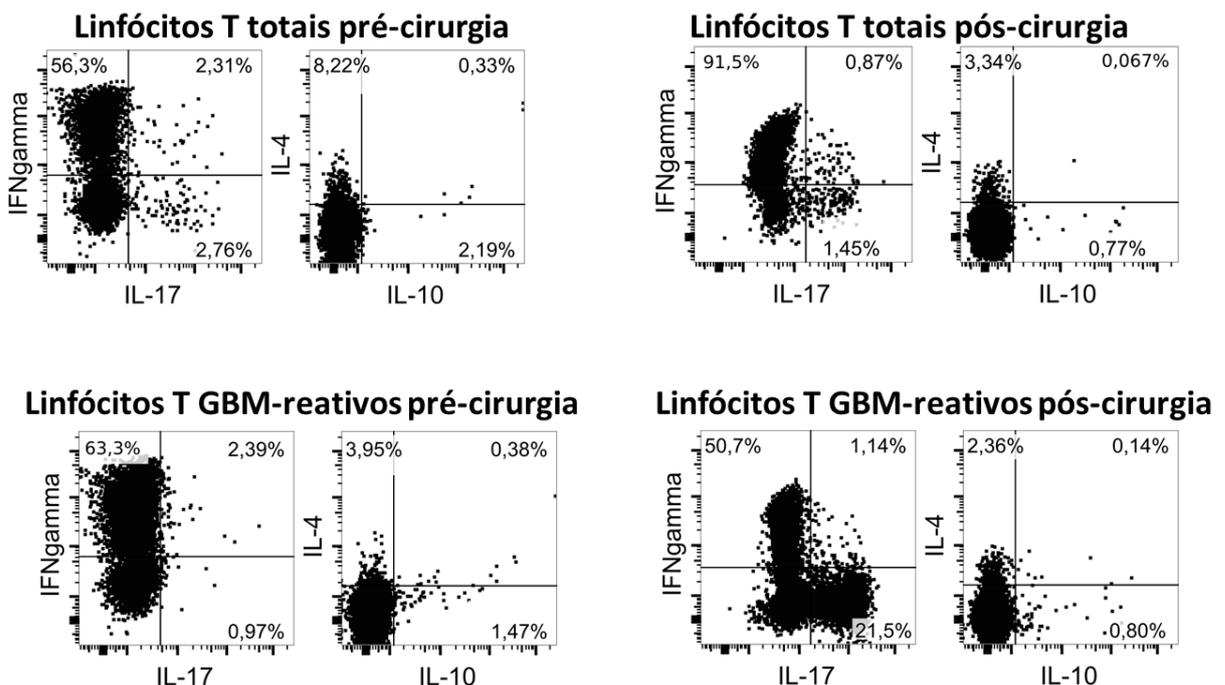
Também fomos capazes de determinar o padrão de produção de citocinas pelos linfócitos T CD4 presentes dentro do tumor dos pacientes (T-TIL) (Figura 53). Os T-TIL apresentaram uma porcentagem significativamente maior de linfócitos Th1 do que a encontrada nos linfócitos T CD4 sanguíneos (porcentagem de linfócitos T CD4 do sangue com fenótipo Th1: $31,44 \pm 21,0$, $n=11$, versus porcentagem de linfócitos T-TIL

com fenótipo Th1: $58,4 \pm 28,9$, $n=7$; $p=0,035$). Os T-TIL também apresentaram uma porcentagem menor de células não polarizadas, que, apesar de não ter sido estatisticamente significativa, indica que, assim como nos tumores de mama, os linfócitos T-TIL do GBM são, em sua maioria, linfócitos T capazes de produzir ao menos uma das citocinas de perfil de resposta analisadas (porcentagem de linfócitos Th0 CD4 do sangue: $46,1 \pm 21,4$, $n=11$, versus porcentagem de linfócitos T-TIL Th0: $25,32 \pm 24,9$, $n=7$; $p=0,078$).

4.9.2 Mudança no perfil de linfócitos T após procedimento cirúrgico

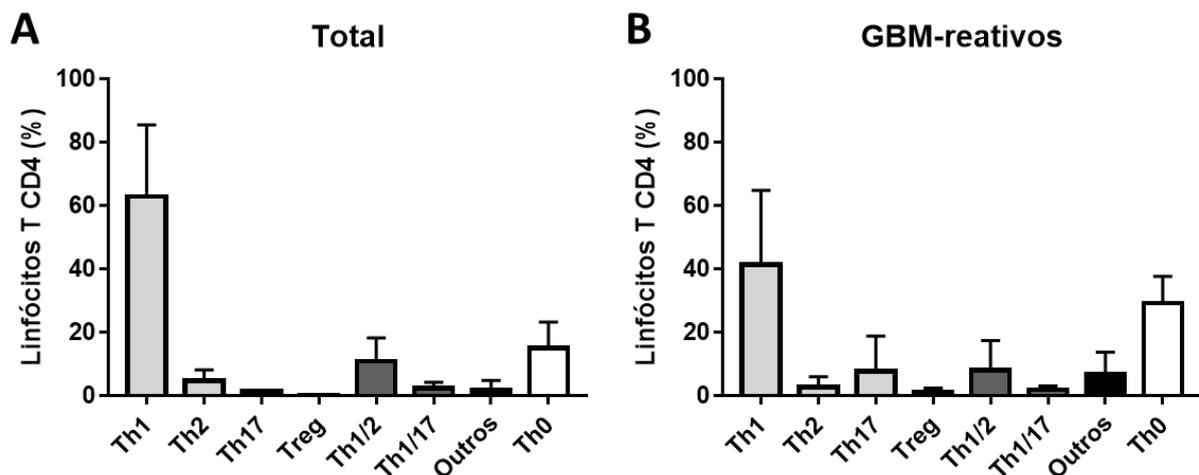
Conforme anteriormente mostrado, a cirurgia de retirada do tumor foi capaz de diminuir a porcentagem de linfócitos T CD4 e CD8 GBM-reativos nos doentes, um processo que pode ter sido desencadeado pelo estresse cirúrgico ou pela maior dose de dexametasona ministrada a estes pacientes após a cirurgia para conter o edema. Logo, avaliamos também a capacidade da cirurgia de modular a produção de citocinas por linfócitos T CD4.

Figura 54 – Produção de citocinas por linfócitos T sanguíneos de um paciente antes e após remoção do tumor. Gráficos mostrando a expressão de citocinas por linfócitos T totais ou GBM-reativos presentes no sangue de um paciente com GBM, logo antes do procedimento cirúrgico, ou um mês após a retirada do tumor. Para a análise, os linfócitos T foram isolados, expandidos, e avaliados quanto a capacidade de produção de citocinas, por citometria de fluxo.



Surpreendentemente, em um paciente avaliado logo antes e um mês após a cirurgia, o processo de remoção do tumor foi capaz de alterar profundamente tanto os linfócitos T CD4 GBM-reativos quanto os com especificidade diversa (Figura 54). De fato, ao analisar os linfócitos T do sangue de três pacientes que haviam passado por cirurgia de remoção do tumor a um mês, observou-se uma quantidade significativamente maior de linfócitos Th1 (porcentagem de linfócitos T CD4 com fenótipo Th1 antes da cirurgia: $31,4 \pm 21,0$, $n=11$, versus porcentagem de linfócitos Th1 pós-cirurgia: $63,0 \pm 22,6$, $n=3$; $p=0,041$), e menor de linfócitos T não polarizados (porcentagem de linfócitos Th0 CD4 do sangue pré-cirurgia: $46,1 \pm 21,4$, $n=11$, versus porcentagem de linfócitos Th0 após a cirurgia: $15,22 \pm 8,2$, $n=7$; $p=0,034$).

Figura 55 – Perfil dos linfócitos T CD4 GBM-reativos após remoção cirúrgica do tumor. Porcentagem de linfócitos T CD4, no sangue de pacientes um mês após a remoção cirúrgica do tumor, com fenótipo Th1 ($\text{IFN-}\gamma^+$), Th2 (IL-4^+), Th17 (IL-17^+), Treg (IL-10^+), Th1/2 ($\text{IFN-}\gamma^+$ IL-4^+), Th1/17 ($\text{IFN-}\gamma^+$ IL-17^+), com outros perfis, ou Th0 ($\text{IFN-}\gamma^-$ IL-4^- IL-17^- IL-10^-). (A) Linfócitos T totais ($\text{CFSE}^{\text{low}}\text{CD25}^+$ após ativação com dynabeads) no sangue de pacientes, um mês após a remoção do tumor ($n=3$). (B) Linfócitos T GBM-reativos ($\text{CFSE}^{\text{low}}\text{CD25}^+$ após cocultura com DC carregadas com lisado tumoral do paciente) no sangue de doentes, um mês após a remoção do GBM.



Tais mudanças no sentido de uma ativação geral do sistema são surpreendentes quando se considera o contexto destes pacientes, e do fato de estes estarem sob tratamento com dexametasona. O efeito da cirurgia na resposta imune parece ser complexo, e variar temporalmente, sendo mais profundo logo após a cirurgia, quando uma imunossupressão sistêmica é geralmente reportada (DĄBROWSKA; SŁOTWIŃSKI, 2014). Os efeitos aqui descritos, uma vez que foram avaliados após um período maior do evento cirúrgico, podem não ser um reflexo direto deste estresse cirúrgico *per se*, mas da ausência do tumor primário. Neste momento

da análise, o sistema imune dos pacientes provavelmente não estaria mais sob o efeito imunossupressor induzido pelos tumores de glioblastoma multiforme, que, por exemplo, diminuem significativamente a quantidade de linfócitos T CD4 circulantes nos doentes (GUSTAFSON et al., 2010). Logo, as alterações gerais observadas poderiam ser consequência da repopulação destas células.

Por outro lado, os linfócitos T GBM-reativos, apesar de estarem presentes em menor frequência como mostrado anteriormente, foram encontrados, após a cirurgia, com outros fenótipos que não o Th1. Vale notar, porém, que a porcentagem de linfócitos Th1 GBM-reativos não reduziu após a cirurgia; o que reduziu foi a quantidade de células não-polarizadas (Th0) que havia dentre os linfócitos T GBM-reativos no sangue dos pacientes. Novamente, este efeito poderia ser um reflexo da retirada do tumor que talvez exercesse uma pressão constante nas células GBM-reativas da circulação.

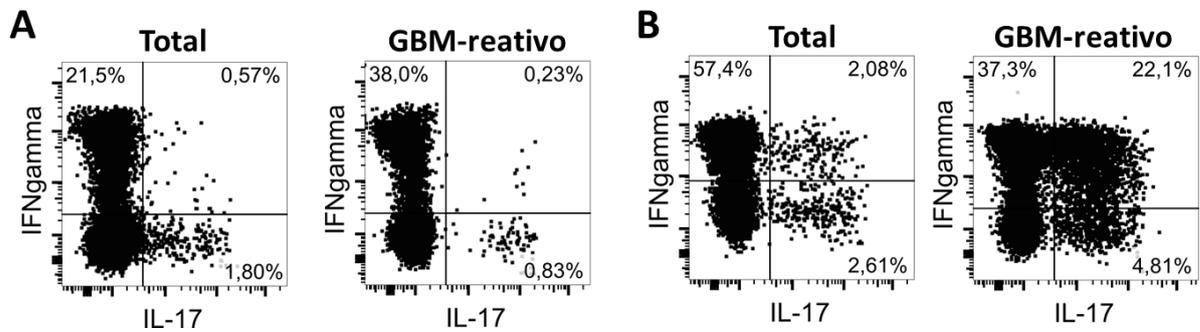
De qualquer modo, apesar de não sabermos o que de fato levou a tais alterações, fomos capazes de mostrar que indivíduos que sofreram a remoção de seu glioblastoma multiforme apresentaram, um mês após a cirurgia, mudanças significativas no fenótipo de seus linfócitos T CD4 circulantes, além de diminuição na frequência e alterações na capacidade de produção de citocina dos linfócitos T CD4 tumor-reativos. Estas mudanças são, provavelmente, decorrentes de uma série de fatores, como o uso de corticosteroides, o estresse cirúrgico e a remoção do tumor. Recentemente foi observado que a cirurgia pode diminuir a resposta tratamento imunoterapêutico com o bloqueio de PD-L1 em pacientes com glioblastoma multiforme (CLOUGHESY et al., 2019), o que reitera ainda mais a importância do melhor entendimento do efeito da cirurgia na resposta imune antitumoral.

4.9.3 Efeito do tratamento vacinal na função dos linfócitos T GBM-reativos

Fomos capazes de medir diferenças na frequência de linfócitos T GBM-reativos no sangue de dois pacientes, após estes terem recebido tratamento com vacina de híbridos de células dendríticas e células tumorais, que se correlacionaram com a sobrevivência dos pacientes e resposta a terapia. Visando avaliar se o fenótipo adquirido pelos linfócitos T CD4 GBM-reativos após a vacinação também era diferente entre estes doadores, estes foram purificados, expandidos e avaliados quanto a sua capacidade de produção de citocinas, sendo os dados para IFN- γ e IL-17 mostrados

abaixo (Figura 56). É importante notar que, mesmo que não tenha sido detectado nenhum linfócito T GBM-reativo pelo ensaio de proliferação *ex vivo*, ainda assim foi possível realizar a análise de citocinas, uma vez que um número de linfócitos T ainda maior do que o usado para determinar a frequência, foi estimulado apenas para realização desta análise.

Figura 56 – Produção de IFN- γ e IL-17 por linfócitos T CD4 GBM-reativos, antes e após tratamento imunoterapêutico de dois pacientes. Porcentagem, no sangue dos pacientes, de linfócitos T CD4 totais ou GBM-reativos expressando IFN- γ e IL-17, após vacinação com híbridos de células dendríticas e células tumorais. (A) Perfil dos linfócitos T CD4 no paciente com aumento da frequência de linfócitos T após vacinação (dose 3). (B) Perfil dos linfócitos T CD4 no paciente com diminuição da frequência de linfócitos T após vacinação (dose 2).



Os linfócitos T CD4 reativos para GBM no sangue dos dois doentes apresentaram perfis diferentes. Enquanto a maioria dos linfócitos T CD4 GBM-reativos do paciente com frequência crescente de reatividade eram Th1, uma população de linfócitos T GBM-reativos produtores de IL-17 foi observada no paciente com piora na frequência de resposta ao tumor. O efeito da presença de linfócitos produtores de IL-17 em glioblastoma ainda é bastante discutido, sendo geralmente descritos os mesmos efeitos antagônicos descobertos para outros tipos tumorais (PARAJULI; MITTAL, 2013). Porém, já foi mostrado que a citocina IL-17, em gliomas de alto grau, facilitaria a capacidade supressora de linfócitos CD4 reguladores (LIANG et al., 2014). Conforme discutido anteriormente, os linfócitos Th1/17 podem apresentar um papel pró-tumoral no câncer de mama, mas seu papel em glioblastoma carece de maiores estudos.

Apenas com a análise temporal da resposta dos linfócitos T CD4 é possível responder se a vacinação é capaz de alterar o padrão de citocinas liberados pelos linfócitos T CD4 reativos para GBM. Esta análise pôde ser realizada no paciente cujos linfócitos T apresentaram reatividade crescente ao seu tumor (Figura 57). Neste

paciente, foi possível observar uma diminuição na porcentagem de linfócitos Th2, Th17, Th1/2 e Th1/17, e aumento na porcentagem de linfócitos Th1 reativos para o tumor autólogo do paciente após a vacinação. Também foi observado a diminuição de uma população de linfócitos T com padrão de expressão de citocinas diferente dos destacados (outros). Ao analisar tal população, percebemos que grande parte destes eram capazes de produzir IL-10. A porcentagem de linfócitos T GBM-reativos produtores de IL-10 antes da vacinação era de mais de 8% das células (Figura 58). Esta, reduziu consistentemente após as doses de vacinação.

Figura 57 – Perfil dos linfócitos T CD4 GBM-reativos antes e após tratamento imunoterapêutico de um paciente. Porcentagem, no sangue de um doente, de linfócitos T CD4 reativos para GBM com fenótipo Th1 (IFN- γ^+), Th2 (IL-4 $^+$), Th17 (IL-17 $^+$), Treg (IL-10 $^+$), Th1/2 (IFN- γ^+ IL-4 $^+$), Th1/17 (IFN- γ^+ IL-17 $^+$), com outros perfis, ou Th0 (IFN- γ^- IL-4 $^-$ IL-17 $^-$ IL-10 $^-$). A porcentagem foi avaliada no sangue do paciente logo antes da vacinação, e após 2 e 3 doses de vacina com híbridos de células dendríticas e células tumorais

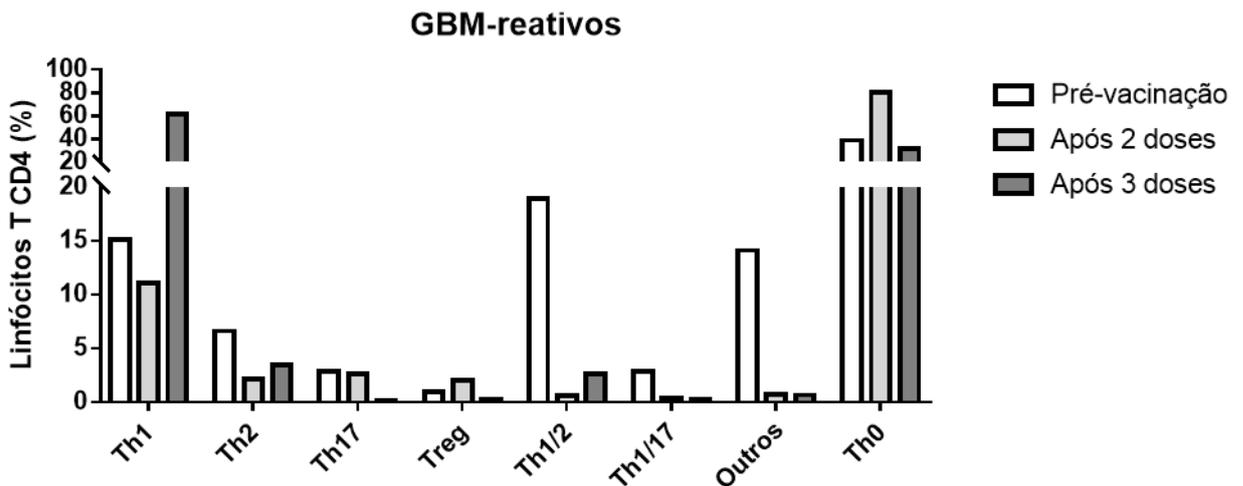
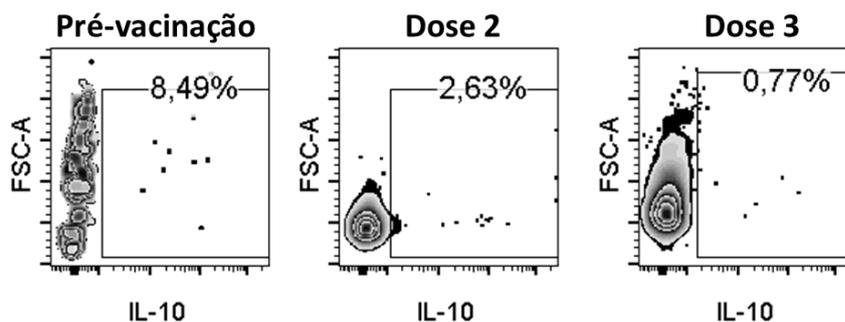


Figura 58 – Produção de IL-10 por linfócitos T CD4 GBM-reativos, antes e após tratamento imunoterapêutico de um paciente. Porcentagem, no sangue de um doente, de linfócitos T CD4 expressando IL-10. A porcentagem foi avaliada no sangue do paciente logo antes da vacinação, e após 2 e 3 doses de vacina com híbridos de células dendríticas e células tumorais



Assim, neste paciente testado, observamos uma modulação no sentido de diminuir a resposta reguladora, caracterizada pela produção de IL-10, e aumentar a população de linfócitos Th1 reativos para o tumor. Estas alterações que, ao que tudo indica, foram induzidas pela vacinação, podem ser tanto um reflexo de uma ativação e diferenciação de linfócitos T *naïve* pela vacina, quanto de uma mudança no fenótipo das células já diferenciadas, uma vez que linfócitos T *helper* apresentam uma plasticidade celular elevada (GEGINAT et al., 2014). Todavia, independente do fenômeno predominante, estes estão modificando o fenótipo dos linfócitos T CD4 para um fenótipo mais antitumoral, que é condizente com a melhora do paciente e sua sobrevida elevada após a vacinação. Estes resultados mostram que intervenções imunoterapêuticas podem modular não só a frequência de linfócitos T tumor-reativos, quanto o fenótipo destas células, além de reiterar a importância translacional de entender e estudar o repertório de linfócitos T reativos para câncer.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que:

- ❖ Indivíduos saudáveis apresentam linfócitos T de memória reativos para antígenos tumorais, que, por serem células de memória, seriam capazes de patrulhar os tecidos, e, portanto, de exercer funções de imunovigilância contra o câncer.
- ❖ A frequência e a relação entre linfócitos T tumor-reativos CD4 e CD8 nos pacientes com câncer podem diferir significativamente entre pacientes com tumores gerados em tecidos diferentes, mas também entre subtipos de tumores com a mesma origem.
- ❖ Em humanos, as frequências de linfócitos T tumor-reativos no sangue e infiltrando os tumores podem não apresentar uma correlação direta, fazendo com que seja necessário cuidado ao tentar considerar dados de imunidade antitumoral no sangue como representativos das condições encontradas dentro do tumor.
- ❖ Apesar da falta de correlação entre sangue e tumor, a análise da frequência, assim como da função, dos linfócitos T tumor-reativos no sangue dos pacientes pode fornecer informações com possível valor prognóstico, e que ajudem no entendimento da evolução do repertório antitumoral durante intervenções imunoterapêuticas.
- ❖ Linfócitos T específicos para proteínas próprias consideradas associadas a tumores (como o Her2) podem estar presentes, em frequências relativamente elevadas, no sangue de indivíduos saudáveis e com câncer, podendo vir a contribuir significativamente com a resposta imune ao câncer.
- ❖ Linfócitos T CD8 específicos para Her2 parecem ser capazes de eliminar apenas células com expressão aumentada desta molécula, indicando que

estes parecem ser capazes de discernir o nível de expressão desta molécula, reagindo apenas quando uma expressão elevada é detectada.

- ❖ Linfócitos T CD8 tumor-reativos, além de sua capacidade citotóxica já bem descrita na literatura, podem, também, suprimir a resposta imune, por meio do bloqueio da proliferação de linfócitos T CD4. Este possível viés pró-tumoral dos linfócitos T CD8 reitera a importância da determinação da função de tais células, quando estas estão presentes infiltrando tumores.
- ❖ Linfócitos T CD4 tumor-reativos, mesmo quando não apresentam um fenótipo de linfócitos Treg, podem exercer múltiplas funções imunossupressoras, como aumentar a expressão de PD-L1 em células tumorais, recrutar neutrófilos pró-tumorais, e produzir adenosina, que tem atividade imunossupressora.
- ❖ Linfócitos T CD4 tumor-reativos podem apresentar multifuncionalidade ao nível clonal, ou seja, células de um mesmo clone de linfócitos T podem adquirir fenótipos distintos (Th1, Th17 e Th1/17) estáveis temporalmente.
- ❖ A cirurgia parece modular significativamente, e de maneira sistêmica, o sistema imune dos pacientes, por meio da diminuição do número de linfócitos T tumor-reativos e alteração em sua capacidade de produção de citocinas.
- ❖ A vacinação com híbridos de células dendríticas e tumorais é capaz de aumentar a frequência de linfócitos T tumor-reativos no sangue dos pacientes, e modular o fenótipo destes. Tais alterações podem vir a se correlacionar com a resposta clínica dos pacientes.

Sendo assim, fomos capazes de mostrar que o estudo do repertório de linfócitos T tumor-reativos, quando acoplado à análise de sua frequência e função, contribui para um melhor entendimento da resposta imune antitumoral em humanos. Esta avaliação, quando feita de uma forma mais abrangente como aqui mostrado, é capaz de revelar características da resposta imune tumoral nunca antes descritas, e que podem servir como base para o desenvolvimento racional de novas estratégias imunoterapêuticas.

REFERÊNCIAS¹

- ACHER, A. W. et al. Advances in surgery for pancreatic cancer. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 9, n. 6, p. 1037–1043, dez. 2018.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17–producing T helper memory cells. **Nature Immunology**, v. 8, n. 6, p. 639–646, 7 jun. 2007.
- ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 14 ago. 2013.
- ALI, H. R. et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1488–1493, jul. 2015.
- ALLISON, J. P.; MCINTYRE, B. W.; BLOCH, D. Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 129, n. 5, p. 2293–300, nov. 1982.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018**. [s.l.: s.n.].
- ANANTH, A. A. et al. Surgical Stress Abrogates Pre-Existing Protective T Cell Mediated Anti-Tumor Immunity Leading to Postoperative Cancer Recurrence. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155947, 19 maio 2016.
- ANNUNZIATO, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1849–1861, 6 ago. 2007.
- ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, jun. 2013.
- ANZ, D. et al. CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 10, p. 2417–2426, 15 nov. 2011.
- AUBERT, R. D. et al. Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 52, p. 21182–7, 27 dez. 2011.
- BAILEY, S. R. et al. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 276, 2014.
- BAKKER, A. H.; SCHUMACHER, T. N. MHC multimer technology: current status and future prospects. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 428–433, 2005.
- BARBIERI, C. et al. Effect of surgical treatment on the cellular immune response of gastric cancer patients. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 36, n. 3, p. 339–45, mar. 2003.
- BARTH JR., R. J. et al. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 3, p. 647–658, 1991.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- BASDEO, S. A. et al. Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 198, n. 6, p. 2249–2259, 15 mar. 2017.
- BAXEVANIS, C. N.; PEREZ, S. A.; PAPAMICHAIL, M. Cancer immunotherapy. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 46, n. 4, p. 167–189, 2009.
- BECATTINI, S. et al. T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4⁺ T cell clones primed by pathogens or vaccines. **Science (New York, N.Y.)**, v. 347, n. 6220, p. 400–6, 23 jan. 2015.
- BECK, L.; ROTH, R.; SPIEGELBERG, H. L. Comparison of monocytes and B cells for activation of human T helper cell subsets. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 78, n. 1, p. 56–60, jan. 1996.
- BENEVIDES, L. et al. IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. **Cancer Research**, v. 75, n. 18, p. 3788–3799, 15 set. 2015.
- BERGER, M. et al. IgE antibodies to Staphylococcus aureus and Candida albicans in patients with the syndrome of hyperimmunoglobulin E and recurrent infections. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 125, n. 6, p. 2437–43, dez. 1980.
- BEVAN, M. J. Helping the CD8⁺ T-cell response. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 595–602, ago. 2004.
- BÉZIE, S.; ANEGON, I.; GUILLONNEAU, C. Advances on CD8⁺ Treg Cells and Their Potential in Transplantation. **Transplantation**, v. 102, n. 9, p. 1467–1478, set. 2018.
- BIOLEY, G. et al. Melan-A/MART-1-specific CD4 T cells in melanoma patients: identification of new epitopes and ex vivo visualization of specific T cells by MHC class II tetramers. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 6769–6779, 2006.
- BOZIC, I. et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 43, p. 18545–18550, 2010.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.
- BROSSART, P. et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3102–3108, 2000.
- BRYN, T. et al. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3⁺ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism. **International immunology**, v. 20, n. 2, p. 235–45, 1 fev. 2008.
- BÜCHELE, S.; HÖPFL, R. Presentation of tetanus toxoid to autologous T cells by dendritic cells generated from human blood. Improved specificity with dendritic cells generated without fetal calf serum. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 417, p. 233–7, 1997.
- BURKHOLDER, B. et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 182–201, abr. 2014.

- BURNET, F. M. Immunological recognition of self. **Science (New York, N.Y.)**, v. 133, n. 3449, p. 307–11, 3 fev. 1961.
- BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res**, v. 13, p. 1–27, 1970.
- BUTLER, M. O. et al. Ex vivo expansion of human CD8+ T cells using autologous CD4+ T cell help. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30229, 12 jan. 2012.
- BUTLER, M. O.; HIRANO, N. Human cell-based artificial antigen-presenting cells for cancer immunotherapy. **Immunological Reviews**, v. 257, n. 1, p. 191–209, jan. 2014.
- CAMPION, S. L. et al. Proteome-wide analysis of HIV-specific naive and memory CD4(+) T cells in unexposed blood donors. **J Exp Med**, v. 211, n. 7, p. 1273–1280, 2014.
- CARRASCO, J. et al. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2897–2905, 2006.
- CARRENO, B. M. et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 348, n. 6236, p. 803–8, 15 maio 2015.
- CASTRO, F. et al. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 847, 4 maio 2018.
- CEPEK, K. L. et al. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha\beta 7$ integrin. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 190–193, 10 nov. 1994.
- CHEN, A. M. et al. Virus-specific and bystander CD8 T cells recruited during virus-induced encephalomyelitis. **Journal of virology**, v. 79, n. 8, p. 4700–8, abr. 2005.
- CHEN, X.; JENSEN, P. E. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 56, n. 2, p. 77–83, abr. 2008.
- CHOI, E. M.-L. et al. High Avidity Antigen-Specific CTL Identified by CD8-Independent Tetramer Staining. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 10, p. 5116–5123, 15 nov. 2003.
- CHURCH, S. E. et al. Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 1, p. 69–79, 2014.
- CLARKE, S. R. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. **Journal of leukocyte biology**, v. 67, n. 5, p. 607–14, maio 2000.
- CLAVIJO-SALOMON, M. A. et al. Monocyte-derived dendritic cells reflect the immune functional status of a chromophobe renal cell carcinoma patient: Could it be a general phenomenon? **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 64, n. 2, p. 161–171, 15 fev. 2015.
- CLIFTON, G. T. et al. Clinical Development of the E75 Vaccine in Breast Cancer. **Breast care (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 2, p. 116–21, abr. 2016.
- CLOUGHESY, T. F. et al. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma.

Nature Medicine, v. 25, n. 3, p. 477–486, 11 mar. 2019.

COHEN, C. J. et al. Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 10, p. 3981–3991, 1 out. 2015.

COHEN, P. A. et al. CD4⁺ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. **Crit Rev Immunol**, v. 20, n. 1, p. 17–56, 2000.

CORTI, D.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. High throughput cellular screens to interrogate the human T and B cell repertoires. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 3, p. 430–435, 2011.

COUZIN-FRANKEL, J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. **Science**, v. 342, n. 6165, p. 1432–1433, 2013.

DĄBROWSKA, A. M.; SŁOTWIŃSKI, R. The immune response to surgery and infection. **Central-European journal of immunology**, v. 39, n. 4, p. 532–7, 2014.

DAI, X. et al. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017.

DATTA, J. et al. Progressive loss of anti-HER2 CD4(+) T-helper type 1 response in breast tumorigenesis and the potential for immune restoration. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 10, p. e1022301, 2015.

DE SAINT-VIS, B. et al. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. **J Immunol**, v. 160, n. 4, p. 1666–1676, 1998.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–1265, 11 jun. 2007.

DIETRICH, J. et al. Corticosteroids in brain cancer patients: benefits and pitfalls. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 233–42, mar. 2011.

DOBZANSKI, M. J. Expanding Roles for CD4 T Cells and Their Subpopulations in Tumor Immunity and Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 63, 2013.

DRAUBE, A. et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18801, 2011.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 137–148, ago. 2004.

EGELSTON, C. A. et al. Human breast tumor-infiltrating CD8⁺ T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4297, 16 dez. 2018.

EHRlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v. 5, p. 273–290, 1909.

ENGELS, E. A. et al. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency

virus in the United States. **Int J Cancer**, v. 123, n. 1, p. 187–194, 2008.

ERTEL, A. et al. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. **Molecular cancer**, v. 5, n. 1, p. 55, 2 nov. 2006.

FERNANDES, C. et al. **Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy**. [s.l.: s.n.].

FINDELSTEIN, S. E. From bench to bedside: bringing immunotherapy into the clinic. **Cancer Control**, v. 20, n. 1, p. 4–5, 2013.

FUJIWARA, H. et al. The role of tumor-specific Lyt-1+2- T cells in eradicating tumor cells in vivo. I. Lyt-1+2- T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of in vivo immunity. **J Immunol**, v. 133, n. 3, p. 1671–1676, 1984.

GARIBALDI, C. et al. Recent advances in radiation oncology. **ecancermedicalsecience**, v. 11, 2017.

EGINAT, J. et al. Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 630, 16 dez. 2014.

GEIGER, R. et al. Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. **J Exp Med**, v. 206, n. 7, p. 1525–1534, 2009.

GERLONI, M.; ZANETTI, M. CD4 T cells in tumor immunity. **Springer Semin Immunopathol**, v. 27, n. 1, p. 37–48, 2005.

GERMEAU, C. et al. High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 241–8, 17 jan. 2005.

GIBNEY, G. T.; WEINER, L. M.; ATKINS, M. B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 12, p. e542–e551, dez. 2016.

GONZÁLEZ-GALARZA, F. F. et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D784–D788, 28 jan. 2015.

GREENBERG, P. D.; KERN, D. E.; CHEEVER, M. A. Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1+,2- T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells. **J Exp Med**, v. 161, n. 5, p. 1122–1134, 1985.

GROS, A. et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. **Nature Medicine**, v. 22, n. 4, p. 433–438, 22 abr. 2016.

GUSTAFSON, M. P. et al. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DR^{lo}/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 7, p. 631–44, jul. 2010.

GUY, C. S. et al. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 3, p. 262–270, 2013.

HAABETH, O. A. W. et al. How Do CD4+ T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 174, 15 abr. 2014.

HAILEMICHAEL, Y.; OVERWIJK, W. W. Cancer vaccines: Trafficking of tumor-specific T cells to tumor after therapeutic vaccination. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 53, p. 46–50, ago. 2014.

HAMAI, A. et al. Human TH17 Immune Cells Specific for the Tumor Antigen MAGE-A3 Convert to IFN- γ -Secreting Cells as They Differentiate into Effector T Cells In Vivo. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p. 1059–1063, 1 mar. 2012.

HANIF, F. et al. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017.

HOBEIKA, A. C. et al. Enumerating antigen-specific t-cell responses in peripheral blood: A comparison of peptide MHC tetramer, ELISpot, and intracellular cytokine analysis. **Journal of Immunotherapy**, v. 28, n. 1, p. 63–72, 2005.

HUEMAN, M. T. et al. Analysis of naïve and memory CD4 and CD8 T cell populations in breast cancer patients receiving a HER2/neu peptide (E75) and GM-CSF vaccine. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 2, p. 135–146, 2007.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **J Leukoc Biol**, v. 71, n. 6, p. 907–920, 2002.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro**INCA RJ, , 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018>>

IQBAL, N.; IQBAL, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **Molecular Biology International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

ITOH, M. et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5317–5326, 1 maio 1999.

JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A.; BEVAN, M. J. Positive Selection of Thymocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 93–126, abr. 1995.

JANEWAY JR, C. et al. **T cell-mediated cytotoxicity**. 5th edition ed. [s.l.] Garland Science, 2001.

JANSSEN, E. M. et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. **Nature**, v. 434, n. 7029, p. 88–93, 3 mar. 2005.

JARNICKI, A. G. et al. Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- β -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 2, p. 896–904, 15 jul. 2006.

JENKINS, M. K.; MOON, J. J. The Role of Naive T Cell Precursor Frequency and Recruitment in Dictating Immune Response Magnitude. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4135–4140, 1 maio 2012.

- JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 6, p. e1792–e1792, 18 jun. 2015.
- KAHLERT, H. et al. T Cell Reactivity with Allergoids: Influence of the Type of APC. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 4, p. 1807–1815, 15 ago. 2000.
- KAPPLER, J. W.; ROEHM, N.; MARRACK, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. **Cell**, v. 49, n. 2, p. 273–280, 24 abr. 1987.
- KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. December, p. 984–993, 2003.
- KESARI, S. Understanding Glioblastoma Tumor Biology: The Potential to Improve Current Diagnosis and Treatments. **Seminars in Oncology**, v. 38, p. S2–S10, dez. 2011.
- KESKIN, D. B. et al. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. **Nature**, v. 565, n. 7738, p. 234–239, 19 jan. 2019.
- KHAN, I. S. et al. Enhancement of an anti-tumor immune response by transient blockade of central T cell tolerance. **J Exp Med**, v. 211, n. 5, p. 761–768, 2014.
- KOEBEL, C. M. et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 903–907, 2007.
- KUMAR, R. et al. Th1/Th2 cytokine imbalance in meningioma, anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme patients. **Oncology reports**, v. 15, n. 6, p. 1513–6, jun. 2006.
- KUZNETSOVA, M. et al. Cytotoxic Activity and Memory T Cell Subset Distribution of in vitro-Stimulated CD8+ T Cells Specific for HER2/neu Epitopes. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1017, 9 maio 2019.
- LEE, K. H. et al. Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. **J Immunol**, v. 163, n. 11, p. 6292–6300, 1999a.
- LEE, P. P. et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. **Nat Med**, v. 5, n. 6, p. 677–685, 1999b.
- LEGOUX, F. P.; MOON, J. J. Peptide:MHC tetramer-based enrichment of epitope-specific T cells. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 68, p. 1–7, 22 out. 2012.
- LI, C. I. et al. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. **JAMA**, v. 289, n. 11, p. 1421–4, 19 mar. 2003.
- LIANG, H. et al. Interleukin-17 Facilitates the Immune Suppressor Capacity of High-Grade Glioma-Derived CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) T Cells Via Releasing Transforming Growth Factor Beta. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 80, n. 2, p. 144–150, ago. 2014.
- LIN, X.-L. et al. HER2-specific T lymphocytes kill both trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive breast cell lines in vitro. **Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, v. 24, n. 2, p. 143–50, jun. 2012.
- LIU, Z. et al. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer.

Translational oncology, v. 11, n. 2, p. 311–329, abr. 2018.

LIUDAHL, S. M.; COUSSENS, L. M. To Help or To Harm: Dynamic Roles of CD4+ T Helper Cells in Solid Tumor Microenvironments. **Immunology**, p. 97–116, 1 jan. 2018.

LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 3, p. 776–781, 2003.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 jun. 2016.

LU, Y. C. et al. Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 13, p. 3401–3410, 2014.

LU, Z. et al. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 3, p. 541–50, 7 fev. 2000.

LURQUIN, C. et al. Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 249–57, 17 jan. 2005.

MAHER, J.; DAVIES, E. T. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. **Br J Cancer**, v. 91, n. 5, p. 817–821, 2004.

MAHNKE, Y. D. et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 11, p. 2797–2809, nov. 2013.

MALDONADO, R. A.; VON ANDRIAN, U. H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. **Adv Immunol**, v. 108, p. 111–165, 2010.

MANDAI, M. et al. Dual Faces of IFN in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 10, p. 2329–2334, 15 maio 2016.

MAZZOCCHI, A. et al. Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp) interacting with autologous tumor via the T-cell receptor: limiting dilution analysis of specific CTLp in peripheral blood and tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients. **International journal of cancer**, v. 58, n. 3, p. 330–9, 1 ago. 1994.

MEYAARD, L. et al. Changes in cytokine secretion patterns of CD4+ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. **Blood**, v. 84, n. 12, p. 4262–8, 15 dez. 1994.

MIGLIORATI, G. et al. Effect of dexamethasone on T-cell receptor/CD3 expression. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 167, n. 1–2, p. 135–44, fev. 1997.

MITTENDORF, E. A. et al. The E75 HER2/neu peptide vaccine. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 57, n. 10, p. 1511–1521, 7 out. 2008.

MONTES, M. et al. Optimum in vitro expansion of human antigen-specific CD8+ T cells for adoptive transfer therapy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 142, n. 2, p. 292–302, nov. 2005.

MOON, J. J. et al. Tracking epitope-specific T cells. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 565–581, 2 abr. 2009.

- MORETTA, A. et al. Direct demonstration of the clonogenic potential of every human peripheral blood T cell. Clonal analysis of HLA-DR expression and cytolytic activity. **J Exp Med**, v. 157, n. 2, p. 743–754, 1983.
- MURANSKI, P. et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 362–373, 2008.
- NDUOM, E. K.; WELLER, M.; HEIMBERGER, A. B. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. suppl 7, p. vii9–vii14, 29 nov. 2015.
- NIELSEN, M. B.; MARINCOLA, F. M. Melanoma vaccines: the paradox of T cell activation without clinical response. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 46 Suppl, p. S62-6, 2000.
- NISHIMURA, T. et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. **J Exp Med**, v. 190, n. 5, p. 617–627, 1999.
- OLSON, B. M. et al. Human Prostate Tumor Antigen-Specific CD8+ Regulatory T Cells Are Inhibited by CTLA-4 or IL-35 Blockade. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 12, p. 5590–5601, 15 dez. 2012.
- PAOLILLO, M.; BOSELLI, C.; SCHINELLI, S. Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. **Brain sciences**, v. 8, n. 1, 16 jan. 2018.
- PARAJULI, P.; MITTAL, S. Role of IL-17 in Glioma Progression. **Journal of spine & neurosurgery**, v. Suppl 1, 18 out. 2013.
- PATENTE, T. A. et al. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 21 jan. 2019.
- PERRIN, S. L. et al. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 2, p. 625–638, 30 abr. 2019.
- PETROVA, G.; FERRANTE, A.; GORSKI, J. Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system. **Critical reviews in immunology**, v. 32, n. 4, p. 349–72, 2012.
- PINHO, M. P. et al. Frequency determination of breast tumor-reactive CD4 and CD8 T cells in humans: unveiling the antitumor immune response. **Oncolmmunology**, p. 1–10, 15 maio 2019.
- PITTET, M. J. et al. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 5, p. 705–715, 1999.
- POSCHKE, I. et al. Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 131, p. 1611–20, 2012.
- QIAN, J. et al. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 290, 17 dez. 2018.
- QIN, S.-Y.; ZHANG, A.-Q.; ZHANG, X.-Z. Recent Advances in Targeted Tumor Chemotherapy Based on Smart Nanomedicines. **Small**, v. 14, n. 45, p. 1802417, nov. 2018.

QIN, Z. et al. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. **Cancer Res**, v. 63, n. 14, p. 4095–4100, 2003.

RENTZSCH, C. et al. Evaluation of pre-existent immunity in patients with primary breast cancer: molecular and cellular assays to quantify antigen-specific T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 4376–86, 1 out. 2003.

REUSCHENBACH, M.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; WENTZENSEN, N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 58, n. 10, p. 1535–1544, 28 out. 2009.

RODRIGUES, C. P. et al. Tolerogenic IDO+ dendritic cells are induced by pd-1-expressing mast cells. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JAN, 2016.

ROSENBERG, S. A. et al. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 9, p. 6169–76, 1 nov. 2005.

ROTHOEFT, T. et al. Structure and duration of contact between dendritic cells and T cells are controlled by T cell activation state. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3105–3117, dez. 2006.

SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708–712, 14 out. 1999.

SELLINS, K. S.; COHEN, J. J. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 139, n. 10, p. 3199–206, 15 nov. 1987.

SHIMATO, S. et al. Profound tumor-specific Th2 bias in patients with malignant glioma. **BMC cancer**, v. 12, p. 561, 27 nov. 2012.

SIDAWAY, P. CNS cancer: Glioblastoma subtypes revisited. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 10, p. 587–587, 1 ago. 2017.

SLEZAK, S. L. et al. Analysis of Vaccine-Induced T Cells in Humans with Cancer. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 684, p. 178, 2010.

SMINIA, P.; WESTERMAN, B. A. Blood-brain barrier crossing and breakthroughs in glioblastoma therapy. **British journal of clinical pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 1018–20, jun. 2016.

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Adv Immunol**, v. 90, p. 1–50, 2006.

SOLIMAN, H.; KHALIL, F.; ANTONIA, S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88557, 2014.

SOTIROPOULOU, P. A. et al. Cytotoxic T-cell precursor frequencies to HER-2 (369 – 377) in patients with HER-2/neu-positive epithelial tumours. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 6, p. 1055–1061, 9 set. 2003.

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. Role of the Tumor Microenvironment

- in Breast Cancer. **Pathobiology**, v. 82, n. 3–4, p. 142–152, 31 ago. 2015.
- SPITZER, M. H. et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. **Cell**, v. 168, n. 3, p. 487–502.e15, 2017.
- SRIVATSAN, S. et al. Allogeneic tumor cell vaccines: the promise and limitations in clinical trials. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 1, p. 52–63, 2014.
- STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. **Pathol Biol (Paris)**, v. 51, n. 2, p. 59–60, 2003.
- STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Dendritic cells: features and functions. **Immunol Rev**, v. 53, p. 127–147, 1980.
- STRIOGA, M. M. et al. Therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines: the state of the art. **Crit Rev Immunol**, v. 33, n. 6, p. 489–547, 2013.
- STRONEN, E. et al. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. **Science**, v. 352, n. 6291, p. 1337–1341, 10 jun. 2016.
- THIBAUDIN, M. et al. Human ectonucleotidase-expressing CD25^{high} Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 1, p. e1055444, 2 jan. 2016.
- THORSSON, V. et al. The Immune Landscape of Cancer. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 812–830.e14, 17 abr. 2018.
- TING KOH, Y.; LUZ GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.; MARTIN KAST, W. Tumor Immune Escape Mechanisms. In: **Cancer Drug Resistance**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 577–602.
- TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, v. 302, n. 5909, p. 575–81, 14 abr. 1983.
- TSAI, S.-L. et al. A method to increase tetramer staining efficiency of CD8⁺ T cells with MHC–peptide complexes: therapeutic applications in monitoring cytotoxic T lymphocyte activity during hepatitis B and C treatment. **Journal of Immunological Methods**, v. 285, n. 1, p. 71–87, 1 fev. 2004.
- USS, E. et al. CD103 Is a Marker for Alloantigen-Induced Regulatory CD8⁺ T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 2775–2783, 1 set. 2006.
- WALLER, E. K. et al. A tale of two T cells: suppressor CD8 T cells recalled to life. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4203–4204, 1 jun. 2006.
- WANG, X.; LI, M. Correlate tumor mutation burden with immune signatures in human cancers. **BMC Immunology**, v. 20, n. 1, p. 4, 11 dez. 2019.
- WANG, Z.-Q. et al. CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 24, p. 6290–6297, 15 dez. 2016.
- WEDER, P. et al. Testing for HLA/peptide tetramer-binding to the T cell receptor complex on human T lymphocytes. **Results in Immunology**, v. 2, p. 88–96, 1 jan. 2012.
- WILKE, C. M. et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? **Carcinogenesis**, v. 32, n. 5, p. 643–649, maio 2011.

- WITHERBY, S. et al. Advances in Medical Management of Early Stage and Advanced Breast Cancer: 2015. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 26, n. 1, p. 59–70, jan. 2016.
- WOLL, M. M. et al. Direct Measurement of Peptide-Specific CD8+ T Cells Using HLA-A2:Ig Dimer for Monitoring the In Vivo Immune Response to a HER2/neu Vaccine in Breast and Prostate Cancer Patients. **Journal of Clinical Immunology**, v. 24, n. 4, p. 449–461, jul. 2004.
- WONDERLICH, J. et al. Induction and Measurement of Cytotoxic T Lymphocyte Activity. In: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- WOOLDRIDGE, L. et al. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 147–164, 2009.
- WORONIECKA, K. I. et al. T-cell Dysfunction in Glioblastoma: Applying a New Framework. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 16, p. 3792–3802, 15 ago. 2018.
- XING, K. et al. Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: an insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy. **BMC immunology**, v. 16, p. 39, 26 jun. 2015.
- XING, Y.; HOGQUIST, K. A. T-cell tolerance: central and peripheral. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 6, p. a006957–a006957, 1 jun. 2012.
- XU, Z. et al. Molecular and Cellular Characterization of Human CD8 T Suppressor Cells. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 549, 30 nov. 2016.
- YANG, L. et al. Expression of Th17 Cells in Breast Cancer Tissue and Its Association with Clinical Parameters. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, n. 1, p. 153–159, 13 jan. 2012.
- YONG, R. L.; LONSER, R. R. Surgery for Glioblastoma Multiforme: Striking a Balance. **World Neurosurgery**, v. 76, n. 6, p. 528–530, dez. 2011.
- YOUNG, M. R. I. Th17 Cells in Protection from Tumor or Promotion of Tumor Progression. **Journal of clinical & cellular immunology**, v. 7, n. 3, 2016.
- ZAKS, T. Z.; ROSENBERG, S. A. Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. **Cancer research**, v. 58, n. 21, p. 4902–8, 1 nov. 1998.
- ZHANG, Q.; LAKKIS, F. G. Memory T Cell Migration. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 504, 2015.
- ZHANG, S.; ZHANG, H.; ZHAO, J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 384, n. 4, p. 405–8, 10 jul. 2009.
- ZHOU, G.; DRAKE, C. G.; LEVITSKY, H. I. Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 628–636, 15 jan. 2006.
- ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 445–489, 2010.

ZHU, M. L.; NAGAVALLI, A.; SU, M. A. Aire deficiency promotes TRP-1-specific immune rejection of melanoma. **Cancer Res**, v. 73, n. 7, p. 2104–2116, 2013.

ZIELINSKI, C. E. et al. Dissecting the human immunologic memory for pathogens. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 40–51, 2011.

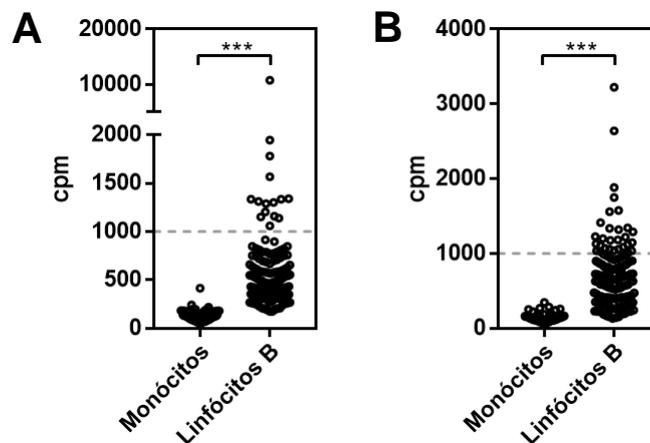
APÊNDICE A – Capacidade linfoestimuladora de diferentes APC

A proliferação de linfócitos T depende da correta apresentação de antígenos pelas APC. Uma vez que estamos utilizando ensaios onde a especificidade é determinada pela capacidade proliferativa do linfócito frente ao seu antígeno cognato, a escolha da melhor APC é de suma importância para que o ensaio seja mais sensível. Apesar de serem consideradas as melhores células estimuladoras de linfócitos T, as células dendríticas (DC) tem seu uso limitado, uma vez que a quantidade destas que é possível de se obter a partir dos monócitos do sangue é restrita, devido, por exemplo, ao fato destas não proliferarem, e haver uma grande perda durante a diferenciação. Assim, foram feitos experimentos com o objetivo de comparar as diferentes APC com relação à sua capacidade de estimulação de linfócitos T, visando escolher a melhor em relação a disponibilidade e capacidade estimuladora, para os ensaios com antígenos tumorais. Para isso, bibliotecas de linfócitos T CD4 *naïve* e de memória foram montadas por meio de proliferação não-específica e desafiadas utilizando monócitos ou linfócitos B como APC, e, como antígenos, a vacina contra a gripe (Influvac) ou um *pool* de peptídeos tumorais restritos pelo MHC de classe II obtidos a partir de neoantígenos presentes no tumor de um paciente com carcinoma hepatocelular (MHC II t-pep). A proliferação basal obtida utilizando monócitos foi significativamente inferior à obtida quando se utilizou linfócitos B (Figura A.1). De fato, algumas linhagens de linfócitos T estimuladas pelas células B sem adição de qualquer antígeno apresentaram valores de cpm superiores ao valor limiar (1.000 cpm) utilizado para determinar as linhagens com reatividade específica para o antígeno.

Uma possível explicação para este fenômeno poderia ser a de que, para serem utilizados nos desafios, os linfócitos B precisam ser previamente expandidos com células que expressam CD40L, de modo a se obter um número suficiente de células. As células K562 não expressam moléculas de MHC de classe I ou II e podem ser facilmente transfectadas, sendo a linhagem celular humana preferencialmente utilizada em uma variedade de aplicações, sendo até mesmo usadas como células apresentadoras de antígenos artificiais (BUTLER; HIRANO, 2014). As células K562-CD40L irradiadas são utilizadas para expandir linfócitos B e, uma vez que estas morrem durante a cultura com os linfócitos B, não "contaminam" as culturas de estimulação de linfócitos T. Estas células, porém, podem liberar antígenos após a morte celular, que poderiam ser capturados pelos linfócitos B. Este processo pode,

assim, explicar o elevado *background* das linhagens de linfócitos T estimulados com linfócitos B, como sendo uma resposta específica contra antígenos da K562. De fato, já observamos, em outro cenário, a expansão de linfócitos T específicos para K562 após estimulação de linfócitos T com DC e células K562 (dados de minha dissertação de Mestrado, não publicados).

Figura A.1 – Proliferação basal de linhagens de linfócitos T estimuladas por monócitos ou por linfócitos B. (A) Proliferação de linfócitos T CD4 *naïve* utilizando monócitos sem antígenos ou linfócitos B sem antígenos. (B) Proliferação de linfócitos T CD4 de memória total utilizando monócitos sem antígenos ou linfócitos B sem antígenos.

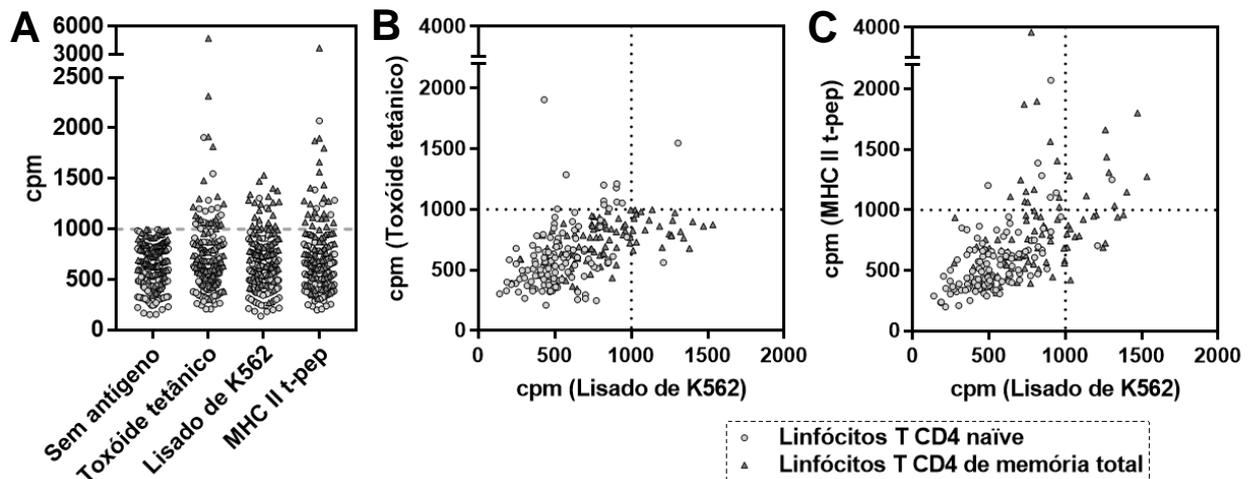


Mais do que aumentar a proliferação basal na presença de linfócitos B, esta resposta específica para K562 induzida por linfócitos B poderia também dificultar a detecção de linfócitos T específicos para tumores, uma vez que a K562 é uma linhagem de células tumorais (eritroleucemia) e pode ter antígenos tumorais compartilhados com os utilizados para o desafio. Para testar esta hipótese, uma biblioteca de linfócitos T de um doador saudável foi desafiada com linfócitos B carregados com o lisado de células K562, o conjunto de peptídeos tumorais restritos pelo MHC de classe II ou o toxóide tetânico, como controle positivo.

Embora a proliferação tenha sido baixa, foi possível observar, ao se excluir as linhagens que tinham mais de 1.000 cpm de proliferação basal (com linfócitos B sem antígeno), linhagens que “reagiram” para cada antígeno (Figura A.2A). Curiosamente, algumas linhagens que reagiram ao lisado da K562 também reagiram ao peptídeo tumoral, mas não ao toxóide tetânico (Figura A.2B). Embora existam aproximadamente 2.000 clones de linfócitos T por linhagem, é possível que o mesmo clone esteja proliferando na presença de ambos os antígenos. De fato, alguns linfócitos T CD4 que proliferaram na presença do lisado de K562 no contexto da

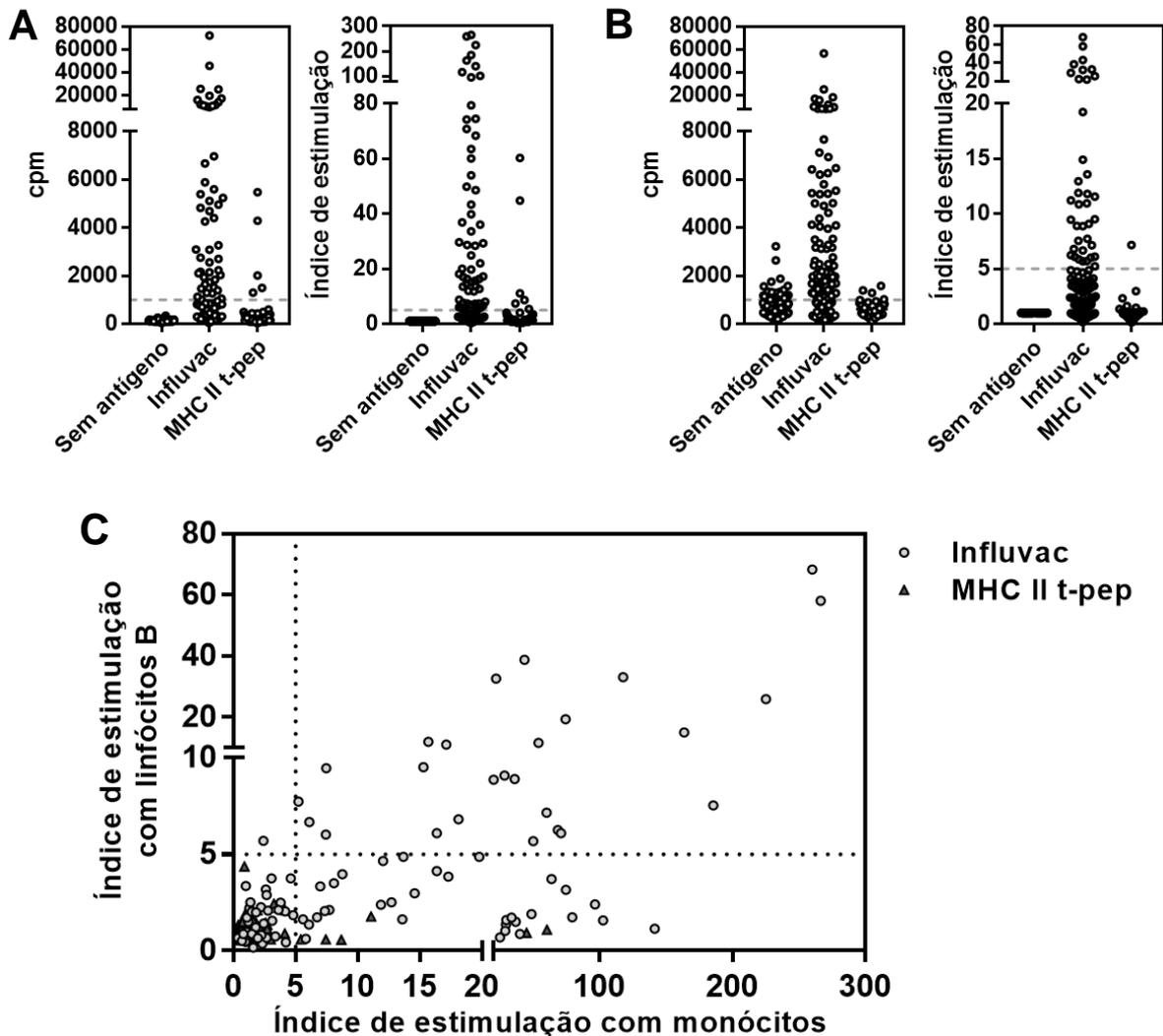
biblioteca também proliferaram, no nível clonal e de maneira dependente do MHC de classe II, na presença de linfócitos B sem antígenos (dados não apresentados), suportando a ideia de que os linfócitos B podem apresentar antígenos da K562.

Figura A.2 – Resposta contra o lisado de células K562 em bibliotecas desafiadas com linfócitos B. (A) Proliferação de linhagens de linfócitos T CD4 *naïve* (círculo) e de memória total (triângulo) desafiadas utilizando linfócitos B. Linhagens com proliferação basal superior a 1000 cpm foram excluídas da análise. (B) Gráfico da proliferação observada em cada linhagem de linfócitos T CD4 rastreada com toxóide tetânico e lisado de K562. (C) Gráfico da proliferação observada em cada linhagem de linfócitos T CD4 rastreada com peptídeo tumoral restrito pelo MHC de classe II (MHCII t-pep) e lisado de K562.



Em seguida, comparamos os resultados obtidos utilizando monócitos e linfócitos B na análise de uma biblioteca de linfócitos T CD4 de memória com um antígeno "forte" (vacina contra influenza) ou um antígeno "fraco" (conjunto de peptídeos tumorais restritos pelo MHC de classe II). Ambas as APC foram capazes de induzir uma forte proliferação nos linfócitos T específicos para Influvac, mas linhagens positivas para o MHC II t-pep só foram encontradas quando se utilizou monócitos como APC (Figura A.3A e B). Interessantemente, a maioria das linhagens que reagiram a um antígeno quando rastreadas com linfócitos B também reagiram ao mesmo antígeno quando se utilizou monócitos, mas não vice-versa (Figura A.3C). Além disso, como foram encontradas mais linhagens positivas com monócitos do que linfócitos B, a frequência de precursores de linfócitos T CD4 de memória específicos para Influvac foi maior quando se utilizou monócitos (monócitos: 357 linfócitos T específicos para Influvac por milhão; linfócitos B: 107 linfócitos T específicos para Influvac por milhão).

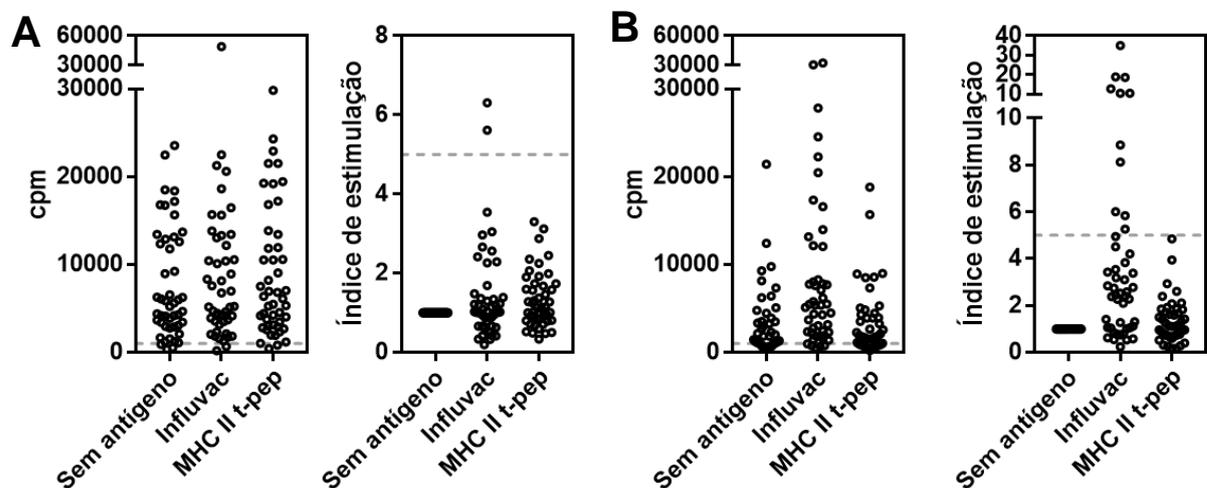
Figura A.3 – Comparação de linfócitos T CD4 de memória total estimulados com linfócitos B ou monócitos. (A) Proliferação e índice de estimulação de linfócitos T de memória CD4 estimulados por monócitos sem antígenos ou carregados com Inluvac ou MHC II t-pep. (B) Proliferação e índice de estimulação de linfócitos T CD4 de memória estimulados por linfócitos B sem antígeno ou carregados com Inluvac ou MHC II t-pep. (C) Gráfico do índice de estimulação de linfócitos T que foram cultivados com linfócitos T versus linfócitos T cultivados com monócitos. As APC foram carregadas com a vacina contra a gripe (círculo) ou com o MHC II t-pep (triângulo). O índice de estimulação foi determinado dividindo o valor de cpm obtido no poço com a APC com o antígeno pelo valor do mesmo poço estimulado com a APC sem antígeno.



A apresentação de antígenos via MHC de classe II mais eficiente feita pelos linfócitos B é a que ocorre através da internalização do antígeno através da ligação com o receptor de linfócitos B (BCR) (CHEN; JENSEN, 2008). Embora a internalização também possa ocorrer de forma BCR-independente, estes antígenos são muito menos eficientemente apresentados no contexto das moléculas de MHC de classe II. Além disso, apesar de induzirem uma eficiente ativação e proliferação de linfócitos T específicos B para o mesmo antígeno para o qual são específicos, os linfócitos B

normalmente induzem a tolerância de linfócitos T quando apresentam antígenos para os quais estes linfócitos B não são específicos (CHEN; JENSEN, 2008). Assim, linfócitos B podem não apresentar eficazmente antígenos que normalmente induzem baixa resposta de anticorpos, como é geralmente o caso dos antígenos tumorais (REUSCHENBACH; VON KNEBEL DOEBERITZ; WENTZENSEN, 2009). Tudo isto contribui para a conhecida superioridade dos monócitos e DC sobre os linfócitos B na apresentação de antígenos diversos (BECK; ROTH; SPIEGELBERG, 1996; KAHLERT et al., 2000), o que também foi confirmado com nossos resultados. Porém, embora os linfócitos B tenham se mostrado menos eficientes do que monócitos para serem utilizados no desafio de bibliotecas de linfócitos T, a sua utilização é, até o momento, a única possibilidade quando se trabalha com pequenas quantidades de PBMC, uma vez que é necessário um grande número de APC para rastrear bibliotecas de células T e monócitos não podem ser expandidos *in vitro*.

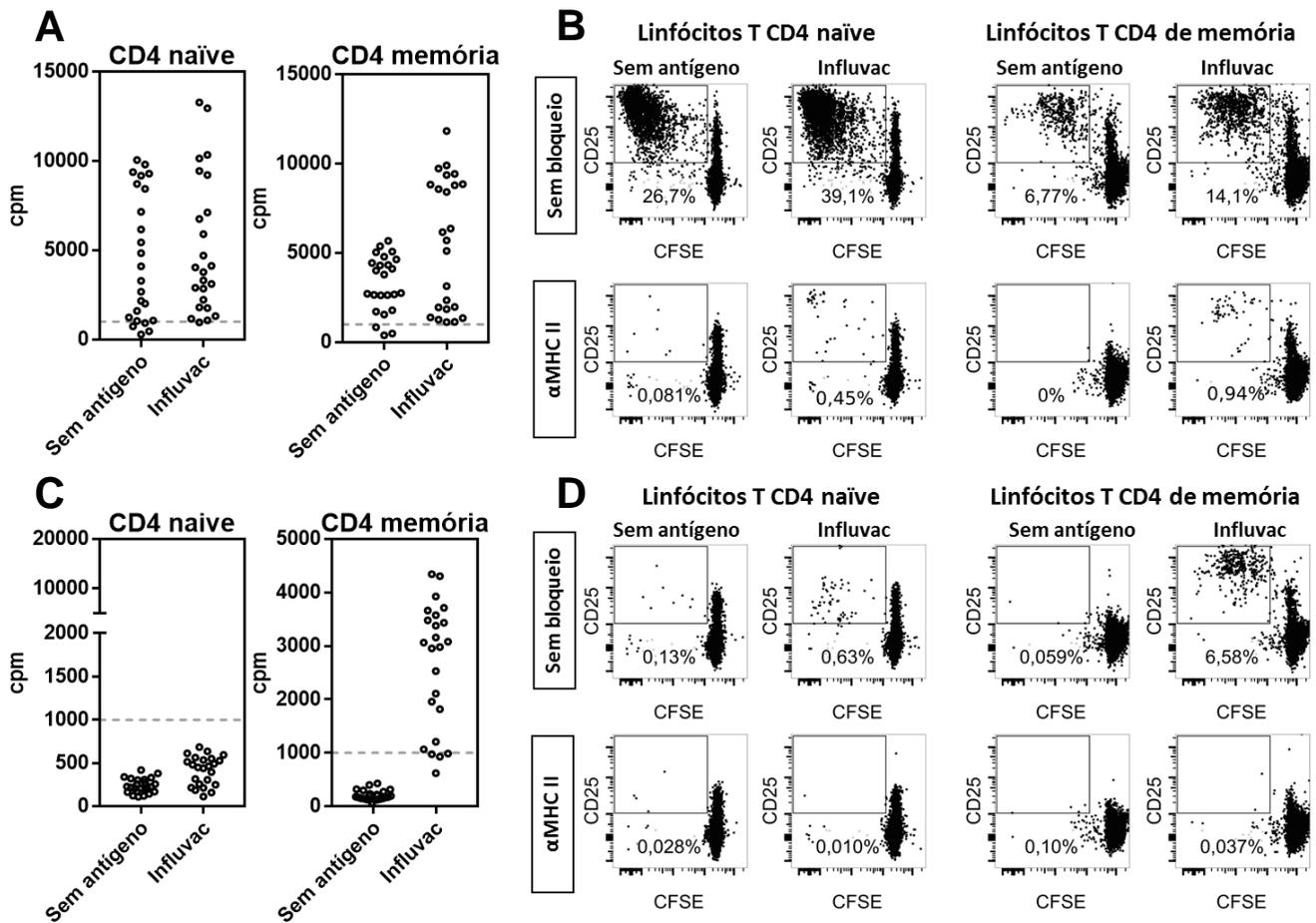
Figura A.4 – Screening de bibliotecas de linfócitos T CD4 com DC diferenciadas na presença de soro fetal bovino. Proliferação e índice de estimulação de (A) linfócitos T CD4 naïve e (B) linfócitos T CD4 de memória total estimulados por DC (proporção 1:30) diferenciadas a partir de monócitos com IL-4 e GM-CSF em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino e ativadas *overnight* com LPS.



O outro tipo de célula que poderia ser utilizado para o *screening* de bibliotecas de linfócitos T são as células dendríticas derivadas de monócitos (DC). Uma vez que a sua potência como APC é maior do que a de monócitos, talvez seja possível utilizar uma proporção mais baixa de APC para linfócitos T durante o desafio das bibliotecas de linfócitos T, aumentando assim o número de poços que podem ser rastreados a partir da mesma quantidade de PBMC obtida de um doador. Para testar esta hipótese,

DC foram diferenciadas a partir de monócitos utilizando meio de cultura R-10 (RPMI-1640 + 10% de soro fetal bovino + antibióticos) suplementado com IL-4 e GM-CSF, ativadas com LPS e utilizadas numa proporção de 1:30 para fazer o *screening* de bibliotecas de linfócitos T CD4 *naïve* e de memória total. A proliferação induzida por DC, mesmo na ausência de antígeno (*background*), se mostrou muito elevada, mascarando a proliferação específica induzida pelo antígeno, especialmente nas linhagens de linfócitos T *naïve* (Figura A.4 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Figura A.5 – Capacidade de estimulação de linfócitos T por DC diferenciadas na presença ou ausência de soro fetal bovino. (A) Proliferação (por incorporação de timidina) e (B) expressão de CFSE e CD25 de linfócitos T CD4 *naïve* (esquerda) ou de memória (direita) estimuladas por DC (razão 1:30) diferenciadas na presença de soro fetal bovino. (C) Proliferação (por incorporação de timidina) e (D) expressão de CFSE e CD25 de linfócitos T CD4 *naïve* (esquerda) ou de memória (direita) estimuladas por DC (razão 1:30) diferenciadas na ausência de soro fetal bovino e presença de soro humano.



As DC utilizadas no *screening* da biblioteca foram diferenciadas em um meio de cultura de células contendo soro fetal bovino. Uma vez que as DC são APC muito eficazes, e o soro pode conter antígenos bovinos que podem ser apresentados por elas, o *background* observado pode refletir uma resposta específica para o soro fetal bovino. Para testar esta hipótese, as DC foram diferenciadas na presença de soro fetal bovino ou de soro humano, sendo utilizadas, na proporção de 1:30, para estimular linfócitos T CD4 *naïve* e de memória de maneira *ex vivo* (não bibliotecas). A análise foi feita tanto por diluição de CFSE como por incorporação de timidina.

Novamente, as DC diferenciadas na presença de soro fetal bovino induziram alta proliferação e ativação de linfócitos T, mesmo na ausência de antígenos, efeito que também já foi observado por outros (BÜCHELE; HÖPFL, 1997). Este *background* foi ainda mais elevado no compartimento de linfócitos T *naïve* (Figura A.5A e B) e foi dependente da apresentação do antígeno para os linfócitos T CD4, uma vez que o bloqueio das moléculas do MHC de classe II foi capaz de anular esta proliferação. Interessantemente, o *background* induzido por DC diferenciadas na ausência de soro fetal bovino foi tão baixo quanto o observado em monócitos (Figura A.5C e D). Estes dados suportam fortemente a hipótese de que a proliferação basal observada na biblioteca estimulada por DC foi devido à presença de antígenos de soro fetal bovino, que foram apresentados pelas DC, gerando ativação dos linfócitos T específicos. Vale notar que a maior frequência de linhagens positivas no compartimento *naïve* seria compatível com a baixa exposição de doadores a esses antígenos.

Em seguida, procurou-se determinar se as DC seriam melhores do que os monócitos para pesquisar as bibliotecas de células T, comparando diretamente a capacidade de ambas as APC em induzir a ativação dos linfócitos T CD4 totais. Para isso, as APC foram ativadas ou não durante 2 horas (em tubo plástico de 15 mL), irradiadas, carregadas ou não com Influvac e cocultivadas com linfócitos T CD4 totais em diferentes proporções de células T para APC. A ativação parece não ter alterado a capacidade das DC de ativarem linfócitos T, mas os monócitos ativados por LPS induziram menor proliferação de linfócitos T (Figura A.6). Intrigantemente, já foi descrito na literatura que monócitos ativados com LPS são capazes de suprimir a ativação de linfócitos T e induzir a diferenciação de Treg, por um mecanismo dependente de COX2 e PGE2 (BRYN et al., 2008).

Figura A.6 – Capacidade linfoestimuladora de DC versus monócitos. Proliferação (por incorporação de timidina) de linfócitos T CD4 total após estimulação *ex vivo* por diferentes quantidades de (A) DC ou (B) monócitos ativados com diferentes moléculas. Diluição de CFSE de linfócitos T CD4 total após estimulação *ex vivo* por diferentes quantidades de (C) DC ou (D) monócitos ativados com diferentes moléculas.

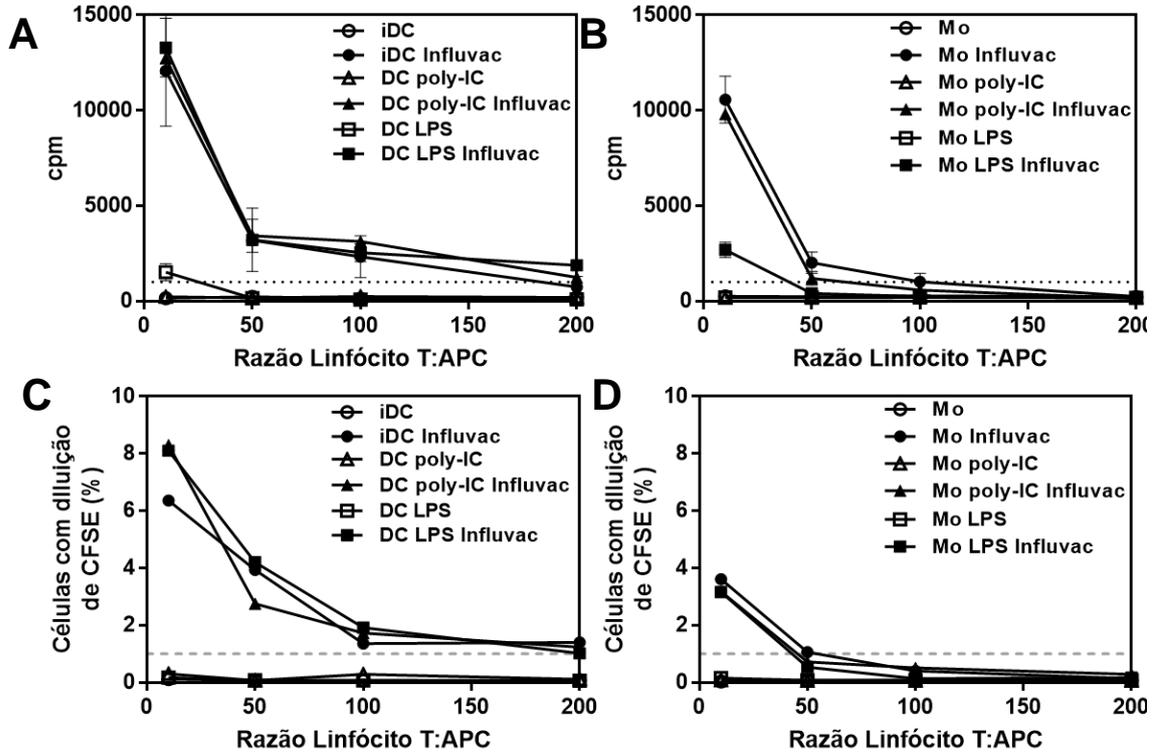
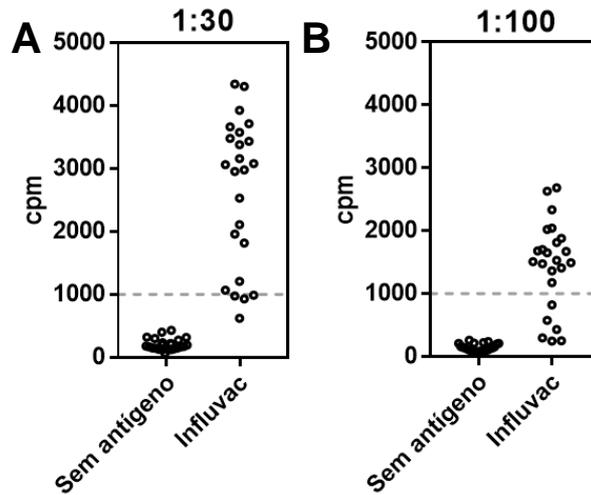


Figura A.7 – Capacidade de estimulação de linfócitos T por DC em diferentes proporções. Proliferação de linfócitos T CD4 de memória estimulados *ex vivo* por diferentes quantidades de DC ativadas com LPS. (A) proporção de 1:30 APC para linfócitos T. (B) proporção de 1:100 APC para a linfócitos T.



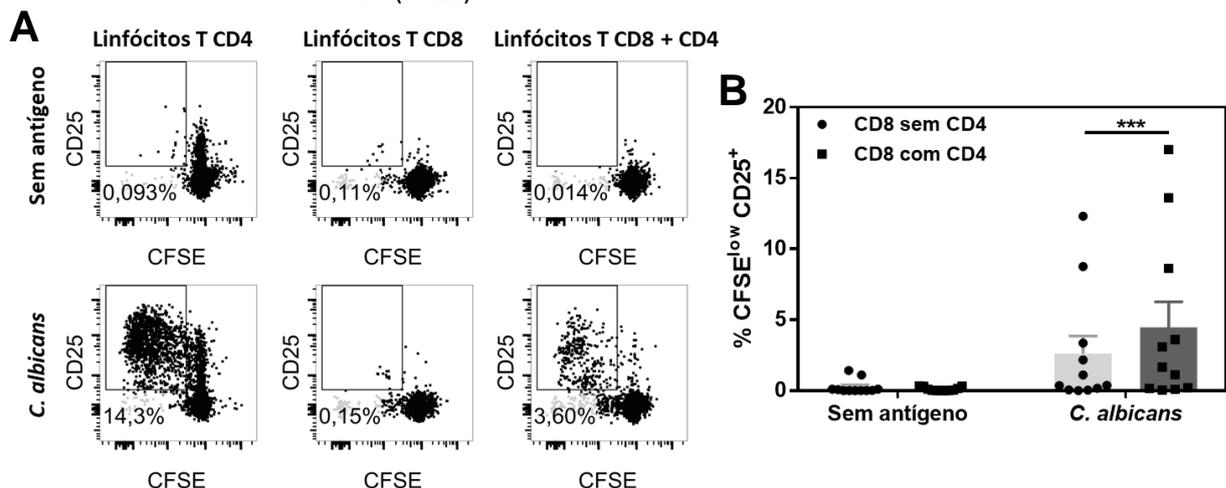
Além disso, os monócitos só foram capazes de induzir uma proliferação de linfócitos T detectável na razão mais elevada testada. Nesta proporção, as DC induziram maior proliferação do que os monócitos, sendo capazes de induzir a proliferação de linfócitos T em todas as proporções testadas de uma forma dependente da dose. Este efeito foi reproduzido quando se comparou um maior número de poços utilizando duas diferentes proporções de DC para linfócitos T (Figura A.7). Mais do que apenas induzir valores de cpm mais baixos, o menor número de DC também permitiu a detecção de um menor número de linhas positivas. Isto mostra que, embora seja mais eficiente do que os monócitos para induzir a proliferação de linfócitos T, para se ter a melhor resposta proliferativa possível, deve ser utilizada a razão 1:10 de DC para linfócitos T. Por outro lado, para se obter a mesma resposta proliferativa do que a observada com monócitos, a proporção pode ser inferior a 1:10. Sendo assim, é possível utilizar menos DC por poço do que monócitos e, ainda assim, obter respostas proliferativas equiparáveis.

Concluindo, estes resultados mostram que, dentre todas as APC, os linfócitos B foram as que tiveram maior *background* e menor eficiência de estimulação, tornando-as as piores APC para utilização na detecção de antígenos tumorais. Seu uso, portanto, foi minimizado para situações onde os outros tipos celulares não poderiam ser utilizados devido à restrição do número de células. Por outro lado, DC se mostraram mais eficientes na estimulação de linfócitos T do que monócitos, podendo induzir uma maior resposta proliferativa mesmo utilizando um menor número de células por poço. Sendo assim, seu uso foi priorizado para análise de antígenos tumorais, levando-se em conta que estes, necessariamente, deveriam ser diferenciados na ausência de soro fetal bovino.

APÊNDICE B – Ativação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4

Sabe-se que a proliferação *in vitro* de linfócitos T CD8 purificados é um processo ineficiente, o que, por exemplo, acaba por atrapalhar a obtenção de grandes quantidades de linfócitos T CD8 antitumorais para utilização em protocolos imunoterapêuticos de transferência adotiva (MONTES et al., 2005). De fato, não conseguimos detectar linfócitos T CD8 reativos para neoantígenos ou CMV em bibliotecas de linfócitos T CD8 de um paciente com carcinoma hepatocelular (dados não mostrados). Sabendo desta limitação, fizemos experimentos visando padronizar um ensaio onde seria possível a avaliação da proliferação específica de linfócitos T CD8. *In vivo*, a correta estimulação de linfócitos T CD8 parece ser dependente dos linfócitos T CD4 (BEVAN, 2004). Sendo assim, testamos se a presença de linfócitos T CD4 irradiados seria capaz de aumentar a proliferação específica de linfócitos T CD8.

Figura B.1 – Proliferação de linfócitos T CD8 na presença ou ausência de linfócitos T CD4 irradiados. (A) Gráficos representativos da diluição de CFSE e expressão de CD25 em linfócitos T CD4, linfócitos T CD8 e linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4 irradiados, estimulados com monócitos carregados ou não com *C. albicans*. (B) Porcentagem de linfócitos T CD8 com diluição de CFSE e expressão de CD25 após cocultura com monócitos carregados ou não com *C. albicans*, e na presença ou ausência de linfócitos T CD4 (n=11).



Consistentemente, um maior número de linfócitos T CD8 com diluição de CFSE, após estímulo com monócitos carregados com *C. albicans*, foi encontrado na presença de linfócitos T CD4 irradiados (Figura B.1). É importante notar que essa maior proliferação não é devido à proliferação dos linfócitos T CD4 que se encontram

na cultura, dado que nenhuma diluição de CFSE foi encontrada nos linfócitos T CD4 presentes na cocultura (Figura B.2). Este resultado é esperado, uma vez que linfócitos T CD4 irradiados com raios gama morrem devido a fragmentação de DNA induzida pela radiação (SELLINS; COHEN, 1987), explicando, também, o fato de, ao final da cultura, existirem menos linfócitos T CD4 do que CD8, apesar destes terem sido plaqueados na mesma proporção.

Figura B.2 – Proliferação de linfócitos T CD4 irradiados na cocultura com linfócitos T CD8. Gráficos representativos da proliferação de linfócitos T CD4 e CD8 em coculturas de linfócitos T CD8 e linfócitos T CD4 irradiados com monócitos carregados ou não com *S. typhimurium*.

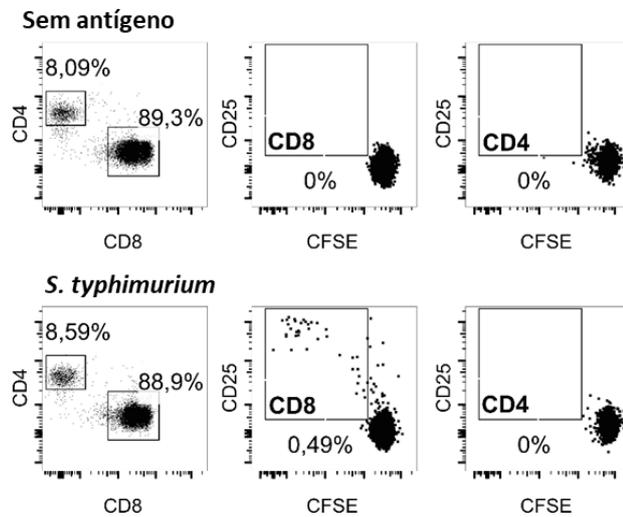
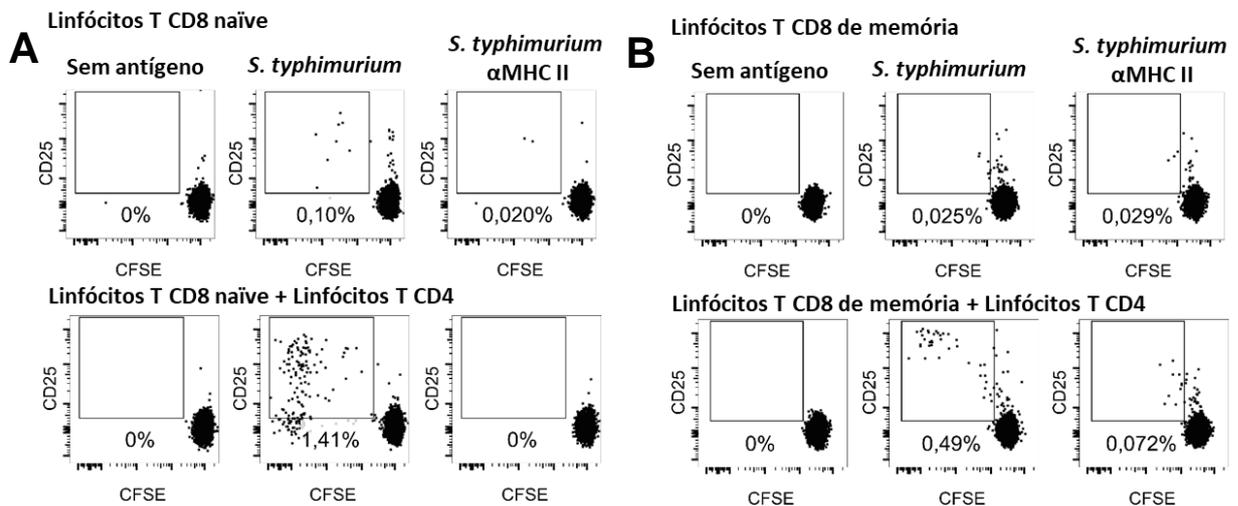
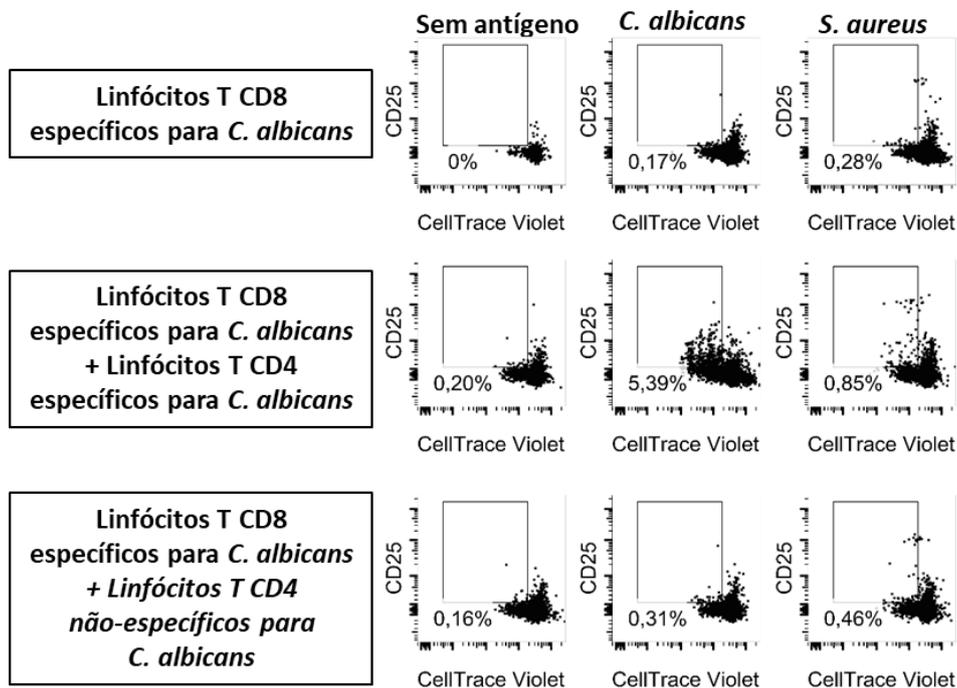


Figura B.3 – Proliferação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4. (A) Proliferação de linfócitos T CD8 na ausência ou presença de linfócitos T CD4 totais irradiados. (B) Proliferação de linfócitos T CD8 de memória na ausência ou presença de linfócitos T CD4 totais irradiados. Quando na presença do antígeno, os monócitos foram tratados ou não com anticorpos que bloqueiam as moléculas de MHC de classe II (α MHC II).



Esta estratégia de utilizar linfócitos T CD4 para auxiliar na proliferação *in vitro* de linfócitos T CD8 também se mostrou útil para expansão não-específica de linfócitos T CD8 para transferência adotiva (BUTLER et al., 2012). Interessantemente, ambos linfócitos T CD8 *naïve* e de memória se beneficiam da adição de linfócitos T CD4 irradiados na cultura (Figura B.3). O efeito da presença de linfócitos T CD4 durante o *priming* de linfócitos T CD8 *naïve* é bastante conhecido, mas estudos divergem com relação ao efeito que estas células podem ter em linfócitos T CD8 de memória (ZHANG; ZHANG; ZHAO, 2009). Assim, intrigantemente, este resultado indica que os linfócitos T CD4 podem ser importantes, também, na proliferação de linfócitos T CD8 de memória.

Figura B.4 – Proliferação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4 específicos ou não para o mesmo antígeno. Linfócitos T CD8 que apresentaram proliferação na presença de *C. albicans* foram isolados por *sorting* assim como linfócitos T CD4 que proliferaram ou não na presença de *C. albicans*. Estes linfócitos T CD8 “específicos” para *C. albicans* foram reestimulados com monócitos carregados com diferentes antígenos, na presença de linfócitos T CD4 irradiados, específicos ou não para *C. albicans*.



Foi possível observar que o aumento na proliferação de linfócitos T CD8 foi dependente da apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4, uma vez que o bloqueio das moléculas do MHC de classe II resultou na diminuição desta proliferação para os níveis encontrados na ausência de CD4. Portanto, surgiu o questionamento se este efeito dependeria da especificidade dos linfócitos T CD4. Para responder a

esta pergunta, linfócitos T CD8 reativos *C. albicans* e linfócitos T CD4 reativos ou não para *C. albicans* foram isolados por *sorting*. Os linfócitos T CD8 reativos para *C. albicans* foram reestimulados com monócitos carregados com diferentes antígenos, na presença de linfócitos T CD4 reativos ou não para *C. albicans*, irradiados com 45 Gy. Não foi possível observar proliferação dos linfócitos T CD8 na ausência de linfócitos T CD4 ou mesmo na presença de linfócitos T CD4 não específicos para *C. albicans*. Apenas houve proliferação significativa quando os linfócitos T CD8 específicos para *C. albicans* foram estimulados na presença de linfócitos T CD4 que também eram específicos para o mesmo antígeno, e quando os monócitos estavam carregados com *C. albicans* e não *S. aureus* (Figura B.4).

Figura B.5 – Proliferação de linfócitos T CD4 e CD8 específicos para diferentes antígenos. (A) Proliferação de linfócitos T CD4 na presença de monócitos carregados com diferentes antígenos. (B) Proliferação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4 irradiados e monócitos carregados com diferentes antígenos.

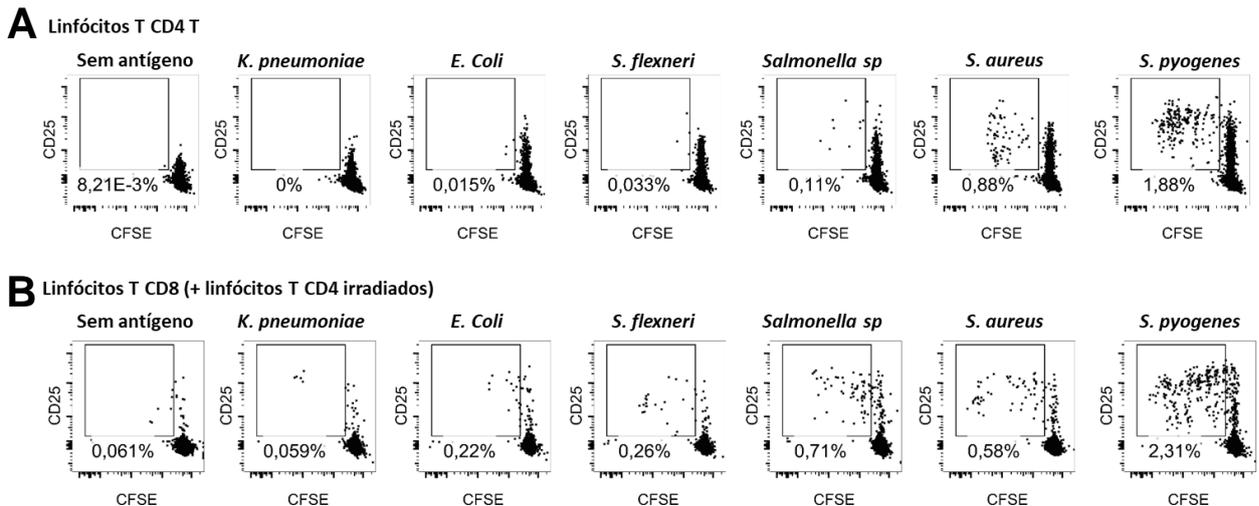
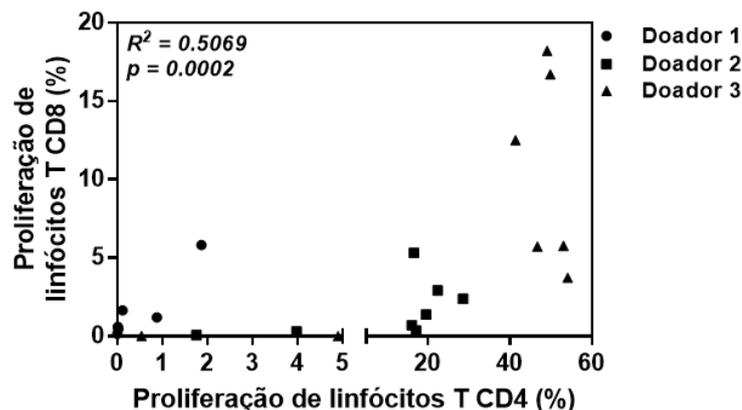


Figura B.6 – Correlação entre a proliferação de linfócitos T CD4 e a proliferação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4. Proliferação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4 irradiados e de linfócitos T CD4, em três doadores saudáveis diferentes. Cada ponto representa um antígeno diferente.



Além disso, ao se testar – na presença de linfócitos T CD4 irradiados – a resposta proliferativa de linfócitos T CD8 para diferentes antígenos, essa só foi significativa para aqueles cuja presença de linfócitos T CD4 reativos pôde ser, também, detectada (Figura B.5). De fato, em três doadores diferentes, e com níveis de respostas variáveis, foi possível observar uma correlação positiva entre a proliferação de linfócitos T CD4 detectada em poços independentes, e a proliferação de linfócitos T CD8 observada na presença de linfócitos T CD4 irradiados (Figura B.6).

Figura B.7 – Proliferação de linfócitos T CD8 específicos para diferentes antígenos na presença de linfócitos T CD4 ativado. (A) Proliferação de linfócitos T CD4 na presença de monócitos carregados com diferentes antígenos. (B) Proliferação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4 ativados com esferas anti-CD3/CD28 e monócitos carregados com diferentes antígenos.

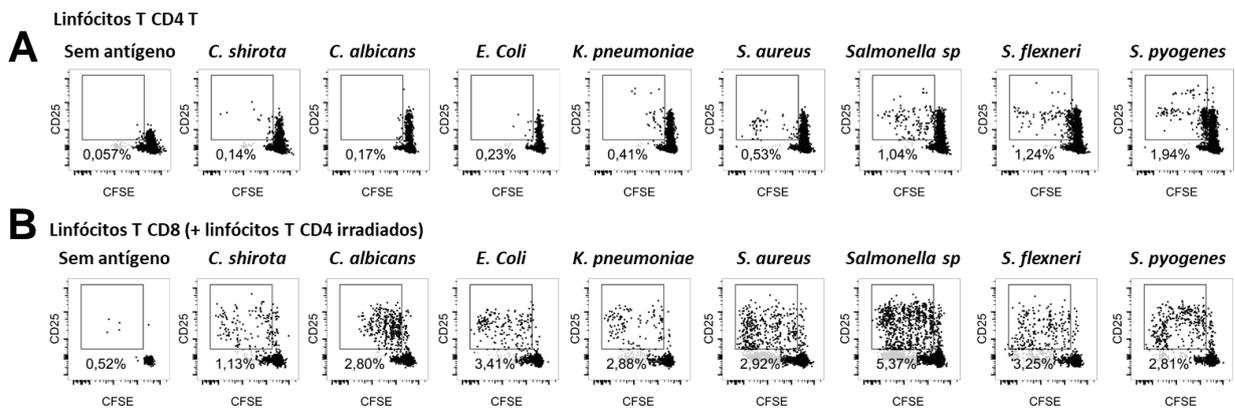
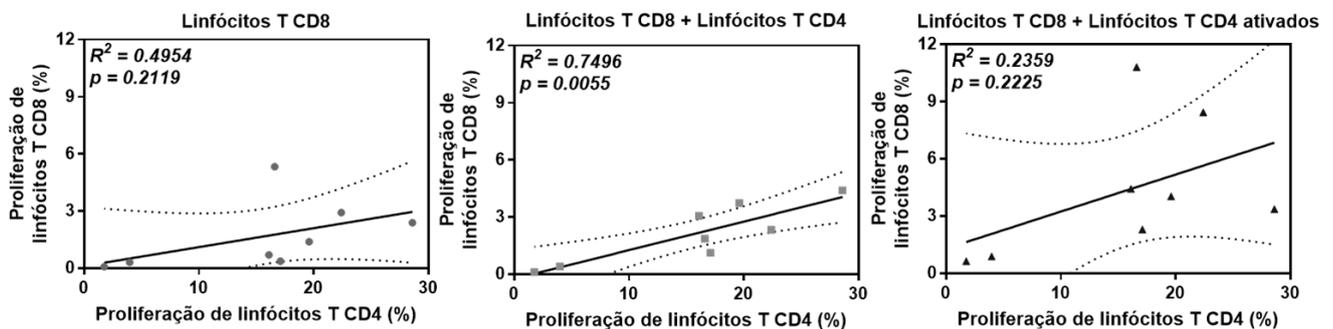


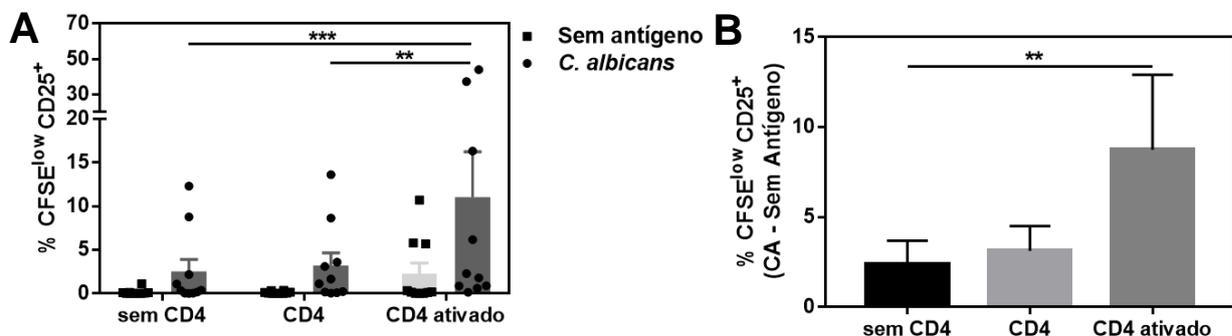
Figura B.8 – Correlação entre a proliferação de linfócitos T CD4 e a proliferação de linfócitos T CD8. Correlação entre a proliferação de linfócitos T CD4 e a proliferação de linfócitos T CD8 na presença de linfócitos T CD4 ativado ou não com esferas anti-CD3/CD28 ou na ausência de linfócitos T CD4. Cada ponto representa um antígeno diferente utilizado.



Uma vez que a proliferação *in vitro* de linfócitos T CD8 se mostrou dependente da especificidade dos linfócitos T CD4, experimentos foram feitos pretendendo avaliar se a ativação dos linfócitos T CD4 antes da cocultura seria suficiente para que estes induzissem um aumento da proliferação de linfócitos T CD8, independentemente de

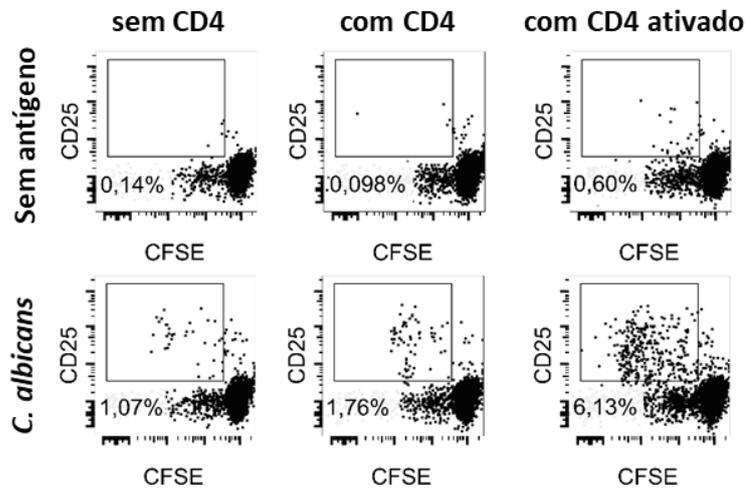
sua especificidade. Para isso, linfócitos T CD4 foram ativados por 2 a 4 horas com *dynabeads* (Thermo Fisher Scientific; esferas magnéticas com anticorpos específicos para CD3 e CD28), sendo estas retiradas magneticamente da cultura após a ativação. Estes linfócitos T CD4 foram cocultivados, então, com linfócitos T CD8 na presença de monócitos carregados com diferentes antígenos. Nestas condições, foi possível observar linfócitos T CD8 com diluição de CFSE para todos os antígenos testados, independente da presença ou ausência de linfócitos T CD4 específicos para estes mesmos antígenos (Figura B.7). De fato, a correlação existente entre a proliferação de linfócitos T CD8 e a proliferação de linfócitos T CD4 deixa de existir quando estes últimos são ativados antes de serem colocados na cocultura (Figura B.8).

Figura B.9 – Proliferação de linfócitos T CD8 específicos para *C. albicans* na presença ou ausência de linfócitos T CD4 ativados ou não. (A) Porcentagem de linfócitos T CD8 com diluição de CFSE e expressão de CD25 após cocultura com monócitos carregados ou não com *C. albicans*, e na presença ou ausência de linfócitos T CD4 irradiados ativados ou não com esferas anti-CD3/CD28 (n=10). (B) Porcentagem de proliferação de linfócitos T CD8 na presença de *C. albicans* diminuído pela porcentagem de proliferação basal (sem antígeno) na presença ou ausência de linfócitos T CD4 irradiados ativados ou não com esferas anti-CD3/CD28 (n=10).



Além de ser capaz de induzir a proliferação de linfócitos T CD8 mesmo na ausência de linfócitos T CD4 específicos para o mesmo antígeno, o uso de linfócitos T CD4 autólogos ativados também foi capaz de aumentar, significativamente, a proliferação observada ao se utilizar o antígeno *C. albicans* (Figura B.9). É importante observar que este efeito não foi devido à baixa capacidade de estimulação das APC utilizadas (monócitos), uma vez que o mesmo efeito pode ser observado utilizando-se células dendríticas maduras como as células apresentadoras de antígeno (Figura B.10). Assim, estes experimentos indicam que a especificidade do linfócito T CD4 não seria decisiva para que o efeito “*helper*” aconteça, mas, sim, a presença de linfócitos T CD4 ativados (independentemente de sua especificidade).

Figura B.10 – Proliferação de linfócitos T CD8 com DC na presença ou ausência de linfócitos T CD4. Proliferação de linfócitos T CD8 com células dendríticas carregadas ou não com *C. albicans*, na ausência ou presença de linfócitos T CD4 ativados ou não com esferas anti-CD3/CD28.

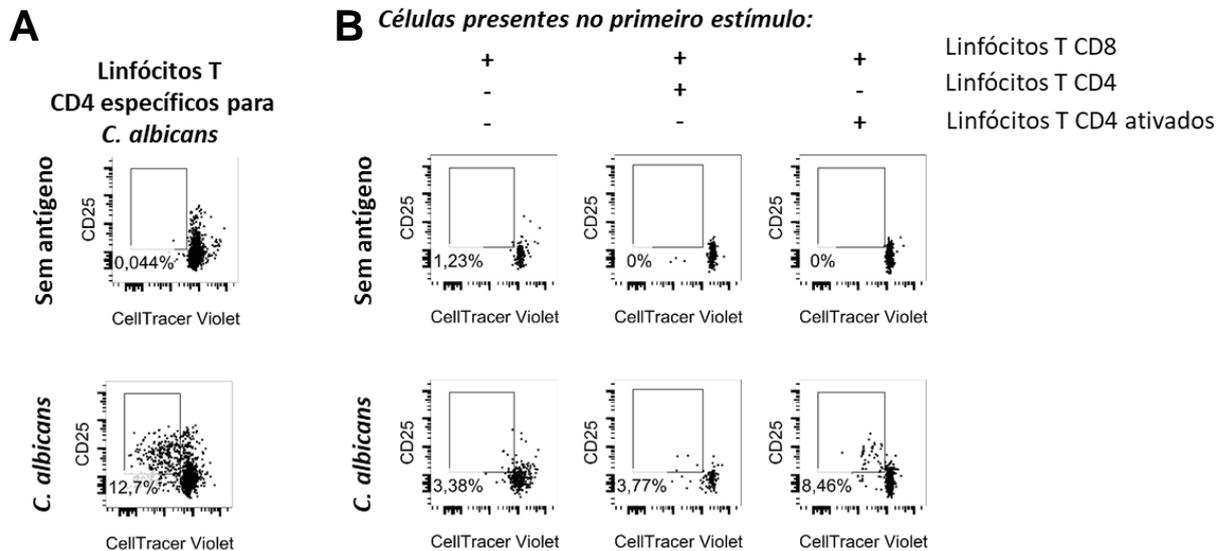


Também foram feitos experimentos comparando o uso de linfócitos T CD4 alogeneicos como células *feeders*, uma vez que estas se ativariam na presença de APC de outro doador. Apesar de serem capazes de gerar uma proliferação maior de linfócitos T CD8, o *background* obtido com essa estratégia foi alto mesmo na ausência do antígeno, o que fez com que não fosse dada continuidade a esta estratégia (dados não mostrados). É possível notar que em alguns doadores o *background* também foi alto utilizando linfócitos T CD4 ativados, mas acredita-se que este efeito foi devido à presença de esferas residuais do processo de ativação, problema que poderia resolvido ao se ter maior cuidado na retirada destas, realizando um maior número de ciclos de lavagem.

Em seguida, esforços foram feitos visando avaliar se estes linfócitos T CD8 que estavam proliferando nestas condições de cultura eram, de fato, específicos para o antígeno que estava sendo apresentado. Para isso, os linfócitos T CD8 com diluição de CFSE e expressão de CD25 foram isolados por *sorting* e mantidos em cultura com IL-2 (50 U/mL) até começarem a entrar em repouso, quando foram marcados com um segundo corante de proliferação (Cell Tracer Violet; Thermo Fisher Scientific) e desafiadas com monócitos carregados ou não com *C. albicans*, na presença de linfócitos T CD4 ativados com antiCD3/CD28. Todos os linfócitos T CD8 isolados do primeiro estímulo foram capazes de proliferar após reestímulo com o mesmo antígeno (Figura B.11). Porém, intrigantemente, aqueles que proliferaram mais no segundo estímulo foram os linfócitos T CD8 que no primeiro estímulo haviam sido estimulados

na presença de linfócitos T ativados. Isto indica que os linfócitos T CD8 que proliferaram no primeiro desafio são, de fato, específicos para o antígeno. Vale notar que a resposta proliferativa dos linfócitos T, em nossos experimentos, se mostrou inferior quanto mais tempo de cultura estas células eram mantidas (dados não mostrados).

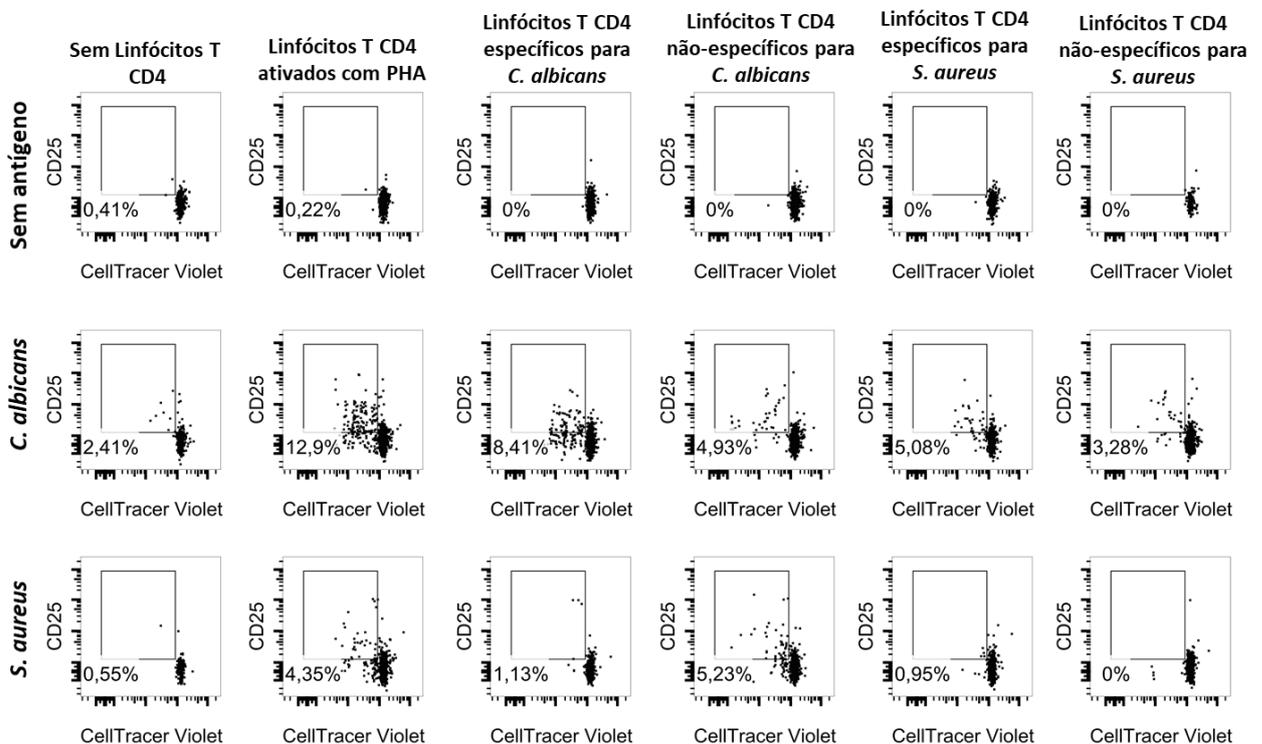
Figura B.11 – Reestímulo de linfócitos T CD8 que proliferaram quando desafiados com *C. albicans* na presença ou ausência de linfócitos T CD4 ativados ou não. (A) Proliferação de linfócitos T CD4 “específicos” para *C. albicans*, ou seja, que proliferaram na presença deste antígeno no primeiro desafio. (B) Reestimulação de linfócitos T CD8 que proliferaram no primeiro estímulo com monócitos carregados com *C. albicans* na ausência de linfócitos T CD4 ou presença de linfócitos T CD4 ativados ou não com esferas anti- CD3/CD28. O reestímulo foi feito com monócitos, na presença de linfócitos T CD4 ativados com esferas anti-CD3/CD28.



Para tentar excluir a possibilidade dos linfócitos T CD8 estarem proliferando simplesmente devido a presença de linfócitos T CD4 ativados, os linfócitos T CD8 que haviam proliferado na presença de linfócitos T CD4 ativados foram reestimulados na ausência de linfócitos T CD4, ou na presença de linfócitos T CD4 específicos para diferentes antígenos. Os linfócitos T CD8 que proliferaram na presença de *C. albicans* no primeiro estímulo foram, de fato, capazes de proliferar em um segundo estímulo, mesmo na ausência de linfócitos T CD4 (Figura B.12). Um dos efeitos já reportados na literatura da presença de linfócitos T CD4 durante o *priming* de linfócitos T CD8 é a capacidade que estas células adquirem de sofrer uma segunda expansão clonal específica, mesmo que estejam, desta vez, na ausência de linfócitos T CD4 (ZHANG; ZHANG; ZHAO, 2009). Linfócitos T CD8 que não foram “primados” na presença de linfócitos T CD4, por outro lado, não são capazes de proliferar a um segundo desafio

na ausência de linfócitos T CD4, e sofrem morte celular mediada por TRAIL (JANSSEN et al., 2005). O mesmo efeito foi observado em nosso experimento, onde linfócitos T CD8, provenientes de uma primeira estimulação na ausência de linfócitos T CD4, morreram e não apresentaram diluição de CFSE após um segundo desafio sem linfócitos T CD4.

Figura B.12 – Reestímulo de linfócitos T CD8 que proliferaram quando desafiados com *C. albicans* na presença de linfócitos T CD4 ativados. Linfócitos T CD8 que mostraram diluição de CFSE e expressão de CD25 após estímulo com *C. albicans* na presença de linfócitos T CD4 ativados foram isolados por *sorting* e reestimulados com o mesmo antígeno na ausência ou presença de linfócitos T CD4 diferentes.

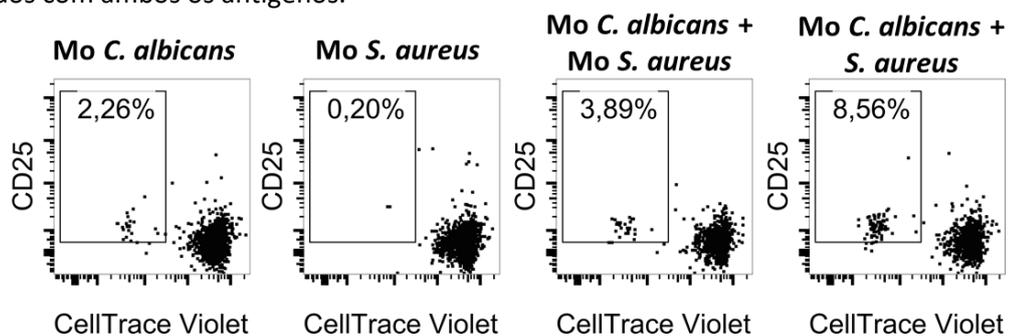


Todavia, a maior proliferação de linfócitos T CD8, ainda assim, foi encontrada na presença de linfócitos T CD4, especialmente na presença dos que haviam sido ativados ou que eram específicos para *C. albicans*. Intrigantemente, os linfócitos T CD8 que haviam proliferado em resposta à *C. albicans* no primeiro estímulo, também foram capazes de responder no segundo desafio à *S. aureus*, mas em menor porcentagem, e apenas na presença de linfócitos T CD4 ativados ou não-específicos para *C. albicans*. Estes resultados podem sugerir que existe uma certa reatividade cruzada entre os antígenos presentes nestes dois micro-organismos. Já foi reportado na literatura que pacientes com síndrome de hiper-IgE têm anticorpos que apresentam

reatividade cruzada para os dois micro-organismos, indicando que estes podem apresentar antígenos com similaridade parcial (BERGER et al., 1980).

Por fim, foram realizados experimentos visando determinar o mecanismo de ação pelo qual os linfócitos T CD4 aumentam a proliferação antígeno-específica de linfócitos T CD8. Primeiramente, foi feito um experimento visando descobrir se o efeito dos linfócitos T CD4 era dependente da interação destes com a mesma APC que deveria apresentar os antígenos para os linfócitos T CD8. Para isso, foram utilizados linfócitos T CD8 específicos para *C. albicans* e linfócitos T CD4 específicos para *S. aureus*. Estes linfócitos T foram cocultivados com monócitos carregados com apenas um antígeno, uma mistura de monócitos carregados com cada antígeno, ou monócitos carregados com ambos os antígenos. Não houve proliferação de linfócitos T CD8 na presença de monócitos carregados com *S. aureus*. A maior proliferação de linfócitos T CD8 foi detectada na presença de monócitos carregados com ambos os antígenos (Figura B.13). Isso indica que, nestas condições, o efeito *helper* necessita que a mesma APC interaja com linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8.

Figura B.13– Proliferação na presença de monócitos carregados com antígenos específicos para ambos linfócitos T CD8 e CD4. Proliferação de linfócitos T CD8 específicos para *C. albicans* na presença de linfócitos T CD4 específicos para *S. aureus* e monócitos carregados com *C. albicans*; monócitos carregados com *S. aureus*; uma mistura de monócitos carregados com cada antígeno; ou monócitos carregados com ambos os antígenos.



Com relação às moléculas envolvidas, alguns estudos mostram que a produção de IL-2 por linfócitos T CD4 podem ser um evento importante para a correta ativação de linfócitos T CD8, mas apenas em alguns modelos (ZHANG; ZHANG; ZHAO, 2009). Outras citocinas, como IFN- γ , também podem ter algum papel, ainda pouco estudado, na ativação de linfócitos T CD8 dependente da presença de linfócitos T CD4. Por outro lado, além de serem capazes de produzir citocinas, linfócitos T CD4 são capazes de licenciar células dendríticas para ativar linfócitos T CD8 via interação do CD40L

presente nos linfócitos T CD4 e o CD40 presente nas DC (CLARKE, 2000). Este licenciamento gera alterações nas DC, entre elas a expressão da molécula coestimuladora CD70, que faz com que estas sejam capazes de primar corretamente linfócitos T CD8. Todos estes resultados, porém, foram obtidos em modelos animais de camundongos, e podem não refletir o que acontece em humanos. Infelizmente, não foi possível avaliar adequadamente o papel destas moléculas no contexto do ensaio de CD8 desenvolvido neste projeto, dado resultados conflitantes obtidos em diferentes experimentos (dados não mostrados). É de se esperar, porém, que os mecanismos que envolvam licenciamento de DC sejam os mais prováveis atuantes neste ensaio, uma vez que a maior proliferação de linfócitos T CD8 parece depender da interação da mesma DC com ambos linfócitos T CD4 e CD8. Vale lembrar que mecanismos de licenciamento de DC de maneira independente de CD40 também já foram descritos (LU et al., 2000). Sendo assim, o efeito de “ajuda” que linfócitos T CD4 têm sobre os linfócitos T CD8 parece depender tanto do licenciamento de DC por meio da interação com linfócitos T CD4 (que pode ser dependente ou independente de CD40), quanto da comunicação direta de linfócitos T CD4 e CD8 por meio de citocinas, o que indica que a simples adição de CD40 solúvel na cocultura pode não ser suficiente para mimetizar todo o efeito observado neste trabalho.

De qualquer modo, mostrou-se que a análise da presença de linfócitos T CD8 específicos para antígenos raros, como é provável que seja o caso dos antígenos tumorais, pode ser feita através da adição de linfócitos T CD4 ativados na cocultura. Além de induzir uma maior proliferação dos linfócitos T CD8 conforme mostrado neste projeto, a adição de linfócitos T CD4 pode ainda, segundo dados da literatura, resgatar linfócitos T CD8 exaustos, restaurando a proliferação e produção de citocinas por estas células (AUBERT et al., 2011). Uma vez que linfócitos T CD8 específicos para o tumor se encontram, em geral, em um estado de exaustão (JIANG; LI; ZHU, 2015), esta estratégia se torna ainda mais vantajosa.

Neste trabalho, porém, devido ao baixo volume de sangue obtido dos pacientes com câncer de mama, e à baixa quantidade de linfócitos T no sangue de pacientes com GBM (GUSTAFSON et al., 2010), optamos por, ao invés de ativar os linfócitos T CD4 para serem usados como *feeder*, cultivar os linfócitos T CD8 e CD4 em conjunto, sem irradiar os linfócitos T CD4, diminuindo a quantidade de célula necessária para análise, mas, ainda assim, beneficiando-se do efeito *helper* aqui discutido.