FELIPE CAMPOS DE ALMEIDA

Avaliação do tratamento com agentes
desmetilantes do DNA sobre a função efetora e
resposta antitumoral dos linfócitos T CD8.

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

São Paulo
2018

FELIPE CAMPOS DE ALMEIDA

Avaliação do tratamento com agentes desmetilantes do
DNA sobre a função efetora e resposta antitumoral dos
linfócitos T CD8.

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante-
Mendes

Versão original

São Paulo
2018

RESUMO

De Almeida F. C. Avaliação do tratamento com agentes desmetilantes do DNA sobre a função efetora e resposta antitumoral dos linfócitos T CD8. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Baixas doses de agentes desmetilantes do DNA (DNMTi) tem efeitos antitumorais por induzirem parada do ciclo celular e aumentarem a imunogenicidade se tornando mais visível para o sistema imune. Crescentes evidências sugerem que o tratamento com DNMTis podem aumentar a sinalização imune nas células tumorais por meio do mecanismo de mimetismo viral bem como aumento da expressão de antígenos associados ao tumor, destacando assim, o seu potencial clínico na combinação com outras terapias. Enquanto os efeitos dos DNMTis têm sido na maior parte investigados nas células tumorais, os efeitos sobre o sistema imune ainda permanecem desconhecido, especialmente sobre baixas doses. Assim sendo, nosso objetivo foi investigar os efeitos da administração de agentes desmetilantes do DNA sobre a função efetora dos linfócitos T CD8 e seu papel frente a resposta antitumoral. Para isso, injetamos células tumorais CT26 na concentração de 5×10^5 por animal no dia 0. Cada grupo de animais foi tratado ou não com 5-AZA-CdR (0,5 mg/kg). Os camundongos foram tratados diariamente intraperitonealmente do dia 5 ao dia 9. Como controle adicional, em um grupo de animais, foi utilizado anticorpo neutralizante para depletar células T CD8. O tratamento diminuiu o tamanho tumoral, aumentou o infiltrado de células T CD8 e aumentou a capacidade de produção de citocinas por essas células. Em adição, todos esses efeitos foram abolidos na ausência das células T CD8. Em nossos ensaios de estimulação *ex vivo* e de imunização com adenovírus, o tratamento gerou aumento da ativação celular, aumento da produção de citocinas, diminuição da proliferação e aumento de morte celular. Por fim em nossos ensaios de citotoxicidade, o tratamento aumentou a capacidade citotóxica dessas células. Nossos resultados mostram que o tratamento *in vivo* com DNMTis em tumores de camundongos levou ao aumento da infiltração de células T CD8 e que a diminuição do tamanho tumoral é dependente da ação das células T CD8. Uma vez que observamos a capacidade efectoras das células T CD8, o tratamento levou ao aumento da produção de citocinas e aumento da indução de morte celular de células alvo. Em resumo, nossos resultados demonstram que o tratamento com DNMTis aumenta a resposta antitumoral e aumentam o potencial citotóxico das células T CD8.

Palavras-chave: Células T CD8, agentes desmetilantes do DNA, resposta imune antitumoral, potencial citotóxico.

ABSTRACT

De Almeida F. C. Evaluation of the treatment with DNA demethylating agents on the effector function and antitumor response by the T CD8 lymphocytes. [Dissertation (Master thesis in Immunology)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Low doses of the DNA methylation inhibitor (DNMTis) on cancer cells has durable anti-tumorigenic effects by inducing cell cycle arrest and immune-modulatory properties that increases their visibility by the immune system. Growing evidence suggest that DNMTis can upregulate immune signaling in cancer cells through viral mimicry and upregulation of tumour associated antigens, highlighting clinical potential to combine with immunotherapy. While the effects of DNMTis have been mostly studied in cancer cells, their effects on the immune system remains vastly unknown specially at clinically relevant low doses. Therefore, we aimed to investigate the effect of *in vivo* administration of DNA demethylating inhibitor on the effector function of CD8⁺ T cells and antitumor immune response. We injected 5×10^5 CT26 cells at day 0 in three group of mice (n=5 mice per group). Each group of mice were either mock treated or treated with Decitabine (5-AZA-CdR or DAC, at a dosage of 0,5 mg/kg). The mice were treated intraperitoneally daily from days 5 to 9. As a control, in one group of mice, it was used neutralizing antibody to deplete CD8⁺ T cells. The treatment significantly decreased tumor burden and in the absence of CD8⁺ T cells this effect was abolished. The treatment led to increase in CD8⁺ T cells infiltration into the tumor microenvironment and enhance secretion of effector cytokines. In addition, all these effects were abolished in the lack of CD8 T cells. Furthermore, using *ex vivo* and adenovirus immunization, the treatment led to enhance of cellular activation, decrease of proliferation and enhance of cell death. In addition, using cytotoxic assays, the treatment enhanced the killing capability of these cells. to characterize the CD8 T cells, we used *ex vivo* stimulation protocols. Remarkably, our results show that treatment *in vivo* with DNMTi in established murine tumors model led to increase CD8⁺ T cell infiltration and the decrease in tumor burden is dependent of CD8 T cells. Once the effector capacities of these CD8⁺ T cells were assessed, DNMTi treatment increased their effector cytokine production and increased killing of target cells. Altogether, our results show that treatment of CD8⁺ T cells enhance anti-tumor immune response and their cytolytic potential.

Keywords: CD8 T cells, DNA demethylating agents, Antitumor immune response, Cytotoxic potential

1 Introdução

1.1 Câncer

Câncer é a segunda maior causa de morte e um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Em 2012, 14 milhões de novos casos foram relatados e 8,2 milhões de pessoas morreram desta doença. Em 2018, estima-se mais de 1,7 milhões de novos casos nos Estados Unidos e aproximadamente 600.000 novos casos no Brasil (1, 2).

A doença tem início quando uma célula perde o controle sobre o ciclo celular e sobre os mecanismos de morte celular. Os mecanismos mais elucidados pelo qual isso ocorre são as alterações genéticas e epigenéticas, que contribuem para um aumento nas taxas de proliferação celular. Conforme essas células se proliferam, novas alterações moleculares são adquiridas, resultando em um aumento da diversidade celular e no consequente processo de oncogênese (3).

Ao longo deste processo, as células tumorais tornam-se cada vez mais diferentes de células saudáveis, o que favorece o sistema imune a reconhecê-las como células estranhas. No entanto, como mecanismo de evasão deste reconhecimento, as células tumorais passam por um processo conhecido como imunoeedição, que consiste em tornar a célula menos imunogênica favorecendo a progressão da doença (3).

A imunoeedição é um processo que acontece em 3 fases: a fase de eliminação, de equilíbrio e de escape. A primeira fase baseia-se no conceito da imunovigilância contra o câncer, em que novos antígenos derivados das células tumorais são liberados e capturados pelas células apresentadora de antígeno (APCs). Para que a ativação da resposta imune ocorra, sinais pró-inflamatórios são liberados, evitando uma tolerância periférica. Em seguida, as APCs apresentam esses antígenos através dos MHC de classe I e II para as células T, levando à ativação de uma resposta efetora. Isso irá levar ao reconhecimento das células tumorais e ao aumento do infiltrado inflamatório, que tem como objetivo induzir a morte dessas células. Essa morte pode elevar a liberação de antígenos cancerosos, aumentando ainda mais a resposta imune (4).

Na fase de equilíbrio, a resposta imune adaptativa continua eliminando as células mais imunogênicas, enquanto as células menos imunogênicas permanecem vivas. Nessa fase, as células tumorais remanescentes entram em um estado de dormência por tempo indeterminado (5). Já na última fase, de evasão, as células tumorais adquirem características que reduzem o

reconhecimento pelo sistema imune, tais como: a perda de antígeno tumoral, a perda da expressão de MHC e a perda de moléculas co-estimulatórias, além do desenvolvimento de um microambiente tumoral mais imunossupressor (5).

Dentro desse contexto, o processo tumorigênico clássico é conhecido primordialmente pelo acúmulo de modificações moleculares anormais (6, 7). No entanto, a maquinaria molecular que controla as alterações epigenéticas e que, por sua vez, regulam a expressão gênica, tem apresentado, também, ter uma íntima relação com o desenvolvimento do câncer.

1.2 A metilação de DNA e o Câncer

A epigenética é um estudo de um mecanismo de regulação genética capaz de “ligar” e “desligar” a expressão de genes. Existem três mecanismos que integram a epigenética: a metilação do DNA, as modificações que ocorrem nas histonas e o silenciamento provocado pelos RNA não codificantes (RNAnc) (8). No entanto, a regulação por metilação de DNA é o mecanismo epigenético mais explorado na literatura científica quanto ao seu potencial terapêutico e, portanto, tornou-se alvo deste estudo.

A metilação do DNA ocorre quando um grupo metil é adicionado ao quinto carbono do nucleotídeo citosina, formando a 5-metilcitosina (5mC). Esta, por sua vez, está ligada por uma ligação fosfato a base guanina formando o dinucleotídeo CpG. Os dinucleotídeos CpG são distribuídos aleatoriamente no genoma humano e podem ser encontrados em pequenas regiões chamadas de ilhas CpG e em regiões com grandes sequências repetidas. As ilhas CpG são preferencialmente localizadas na porção 5' de cada gene e ocupam 60% dos promotores do genoma humano (9). Em tecidos normais, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento e diferenciação celular (10-12).

A adição do grupamento metil à citosina é realizada pela família de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que possuem 4 membros descritos em mamíferos: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. DNMT1 atua como uma enzima de manutenção e propagação das regiões metiladas já existentes no DNA. As enzimas DNMT3A e DNMT3B são conhecidas como metiltransferases “de novo” e são responsáveis por estabelecer novas regiões de metilação na fita de DNA (13). Por fim, a DNMT3L parece não possuir atividade enzimática (14). Diferentemente das células normais, as células tumorais são caracterizadas pela perda global de metilação (hipometilação) em alguns genes e em regiões intergênicas e um ganho de metilação (hipermetilação) nas regiões promotoras de genes supressores

tumorais, resultando em seus silenciamentos (10, 12, 15, 16). Dessa forma, defeitos nesses mecanismos de regulação na expressão gênica podem causar transformações na célula, que contribuem diretamente para o desenvolvimento de tumores. Portanto, estratégias terapêuticas voltadas a modulação epigenética tem sido muito abordada atualmente (17, 18).

1.3 Terapias Epigenéticas

Diversos tipos de inibidores da enzima DNMT tem sido desenvolvido e alguns já foram aprovados pela US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de tumores hematológicos (14, 19). As principais drogas utilizadas atualmente, principalmente na terapêutica de tumores não sólidos, são a 5-azacitidina e a 5-aza-2'deoxicitidina (17, 19-21).

1.3.1 Os inibidores de DNMT

A 5-azacitidina (Vidaza, 5-AZA-CR) e seu análogo 5-aza-2'deoxicitidina (Decitabine, 5-AZA-CdR) são dois importantes análogos de pirimidina, utilizadas originalmente em altas doses para o tratamento de câncer, provocando alta toxicidade nos pacientes (22). No entanto, quando administradas em baixas doses, essas drogas tornam-se potentes inibidores da metilação sendo conhecidos como agentes desmetilantes do DNA ou inibidores da DNMT (DNMTi) (23).

A 5-AZA-CR e a 5-AZA-CdR têm mecanismos de ação semelhantes, sendo que a primeira é incorporada tanto no DNA quanto no RNA, enquanto a segunda é incorporada somente no DNA. Ao entrar nas células, esses análogos de citidina tornam-se substrato para a maquinaria da replicação e são incorporados à fita de DNA. Sendo assim, a enzima DNMT reconhece o dinucleotídeo CpG contendo este análogo de citidina como um substrato natural e forma uma ligação covalente com o resíduo da droga no DNA, impedindo a enzima de ser liberada e levando-a à sua degradação proteolítica (24, 25).

5-azacitidina

5-aza-2'deoxicitidina

Figura 1. **Representação molecular dos agentes desmetilantes do DNA.**

O tratamento com altas doses de agentes desmetilantes do DNA é tóxico e tem sua atuação associada ao dano no DNA seguido da parada do ciclo celular e apoptose (17, 26). No entanto, diversos modelos pré-clínicos que usaram baixas doses desses análogos observaram menor citotoxicidade e a indução de uma reprogramação genômica em vias de sinalização essenciais para a manutenção do ciclo celular (17, 26-29).

Embora a ação de DNMTi induza a desmetilação global do DNA, a sua ação também se destaca sobre a regulação de genes específicos que estão metilados no câncer. Karpf e colaboradores (1999), mostraram o aumento de expressão de um grupo de genes responsivos a interferon e com isso a indução da expressão de fatores de transcrição da família STAT, após o tratamento com 5-AZA-CdR em células tumorais de cólon (30). Além disso, mais recentemente, foi descrito que o tratamento com agentes desmetilantes do DNA aumentam a expressão de MHC de classe I em células tumorais e aumenta a expressão de MAGEA4, um antígeno tumoral, em células tumorais de tireóide (31, 32). Dessa forma, diversos trabalhos vêm demonstrando um aumento da expressão de genes responsivos a interferon, de MHC de classe I, assim como antígenos tumorais, mostrando o papel fundamental dos agentes desmetilantes do DNA no aumento da imunogenicidade das células tumorais (33-36).

Com isso, o papel de DNMTi induzindo a reativação de regiões do DNA silenciadas epigeneticamente nas células tumorais começou a ser estudado mais intensamente. Li e colaboradores (2014), fizeram uma análise do perfil de expressão gênica em linhagens de células de câncer de mama, cólon e ovário, após tratamento com 5-AZA-CR, a fim de selecionar biomarcadores para potenciais tratamentos em associação com imunoterapias. Entre os genes induzidos por DNMTi, destacou-se o aumento da expressão de genes

relacionados à mecanismos imunes de controle às infecções virais, tais como genes associados à resposta mediada por interferon. Interessantemente, foi descrito que apesar do potencial desmetilante de DNA deste agente, muitos dos genes regulados positivamente não tinham ilhas CpG metiladas em seu promotor, sugerindo a ação de outros mecanismos celulares para ativação da transcrição gênica nessas células (27).

Dessa forma, estudos recentes evidenciam um grande efeito dos agentes desmetilantes do DNA no estímulo à resposta de interferon contra RNAs dupla fita (dsRNA), induzidos pela expressão de retrovírus endógenos do DNA (ERVs), um processo denominado como mimetismo de um estado de infecção viral (“Viral Mimicry”)(37).

Roulois e colaboradores (2015), relataram que baixas doses de 5-AZA-CdR reduziam a frequência de células iniciadores de câncer colorretal. Além disso, mostraram que o efeito anti-tumoral causado pelo 5-AZA-CdR era mediado pela re-expressão de genes de retrovírus endógenos (ERVs), os quais possuem certa complementariedade e acabam dobrando-se entre si, induzindo a formação de dsRNA. Esse dsRNA é reconhecido por receptores citosólicos MDA5, no qual tem um domínio de recrutamento e ativação de caspase na porção N-terminal responsável por recrutar MAVS. A proteína MAVS, por sua vez, é responsável por recrutar moléculas de sinalização que irão aumentar a expressão de genes responsivos a interferon (como IRF7), levando à expressão de interferon do tipo III e a uma ativação de uma resposta antiviral. Além disso, o tratamento com 5-AZA-CdR resultou no aumento de expressão de MHC de classe I e de TAP, bem como induziu a expressão de antígenos tumorais (Figura 2). O silenciamento da cascata de sinalização, através de RNAs de interência (shRNA) para MDA5/MAVS/IRF7, impediu a redução das células iniciadoras de tumor mediada por 5-AZA-CdR, elucidando ainda mais o mecanismo pelo qual este agente exerce seu papel terapêutico contra o câncer (37).

Chiappinelli e colaboradores (2015), corroboraram esses resultados ao mostrar que o mecanismo causado pela ação da 5-AZA-CdR é através da indução de ERVs e formação de dsRNA em células tumorais de ovário. Os autores afirmaram ainda, que esse tipo de tratamento pode ser usado para induzir uma resposta pro-inflamatória e aumentar o infiltrado tumoral com células do sistema imune, tornando o tumor mais imunogênico. Além disso, também se destacou a importância do tratamento com DNMTi em melanoma, visto que esse tratamento sensibiliza as células tumorais as imunoterapias contra os imuno checkpoints (28).

De modo geral, esses achados sugerem que os agentes desmetilantes do DNA podem induzir uma atração de células T e aumentar o infiltrado tumoral dessas células. Dessa forma, esse tratamento pode potencializar o sistema imune e servir como uma estratégia para o tratamento do câncer.

Figura 2. **Tratamento com DNMTi induz um comportamento de célula infectada por vírus.** (A) Em estado normal, as células tumorais possuem genes retro-virais endógenos hipermetilados. Quando tratadas com DNMTi, esses genes passam a ser expressos e induzem a formação de dsRNA. (B) Esse aumento de dsRNA induz uma cascata de sinalização composta por MDA5/MAVS/IRF7. Essa ativação irá levar a um aumento da expressão de genes responsivos a interferon e a expressão de interferon do tipo III. Dessa forma, o tratamento com DNMTi leva ao aumento da imunogenicidade da célula tumoral. Adaptado de Roulois; Yau; De Carvalho, 2016.

1.4 As células T CD8

Em termos gerais, as células T (ou linfócitos T) são células do sistema imune adaptativo e são classificadas com base na expressão de co-receptores CD4 ou CD8. A característica mais importante do sistema imune adaptativo é a capacidade de iniciar uma resposta imune mais específica e desenvolver uma memória imunológica contra esses

antígenos. As células CD4 podem reconhecer antígenos apresentados pelo complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II, enquanto as células T CD8 reconhecem antígenos presentes na fenda do MHC de classe I. Notavelmente, as células CD4 e CD8 juntas orquestram uma complexa resposta imune para proteger o hospedeiro contra doenças, bem como para uma imuno vigilância anti-tumoral (38, 39).

As células T CD8 (também conhecidas como células T citotóxicas – CTLs) são capazes de secretar citocinas citotóxicas para eliminar células infectadas e células tumorais. Para serem ativadas totalmente, as células T precisam apresentar 3 sinais distintos de ativação. A interação entre uma célula T antígeno-específica e uma célula apresentadora de antígeno (APCs) fornece o primeiro sinal para ativação de células T, através da interação entre o TCR e MHC de classe I. Essa interação tem uma grande especificidade proporcionada por uma recombinação gênica da molécula TCR, que ocorre no timo, e que permite o controle das células auto-reativas (tolerância central). Dessa forma, a célula T CD8, que passa por esse primeiro processo de regulação, origina as células “naives”, capazes de migrarem para tecidos linfóides secundários, mas ainda incapazes de produzir qualquer tipo de resposta frente à antígenos. Uma vez que ocorra a interação entre o MHC de classe I e o TCR, o segundo sinal é através do auxílio das moléculas co-estimulatórias CD3. Por fim, o terceiro sinal necessário para a completa ativação das células T são através de citocinas, como IL-2, IL4, IL6, IL7 e etc (40, 41).

Após ativação, as células T diferenciam-se em células T citotóxicas capazes de matar a célula estranha ou infectada por meio da secreção de granzimas e liberação de citocinas, tais como interferon-gama (INF-gama) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa) (42). Um dos tipos de granzima mais estudados é a granzima B, que é secretada em grânulos citotóxicos, clivando proteínas-alvo e resultando em morte celular por apoptose (43).

As citocinas INF-gama e TNF-alfa são citocinas pró-inflamatórias com um grande raio de ação. INF-gama contribui para a ativação de outras células do sistema imune e inicia a produção de outras citocinas e espécies reativas de oxigênio. Além disso, ela aumenta a apresentação de antígenos por induzir o aumento da expressão de MHC de classe I e aumenta o recrutamento de linfócitos, aumentando também sua vida útil (44, 45).

TNF-alfa também apresenta a capacidade de suprimir a proliferação celular e induzir regressão tumoral. Essa citocina se liga a receptores na célula alvo e ativam diferentes tipos de sinalização que regulam a sobrevivência da célula, a proliferação ou a morte. Dessa forma,

essa citocina possui efeito pleiotrópico em relação a resposta anti-tumoral visto que ela pode tanto induzir morte celular como também estimular proliferação, sobrevivência, migração e até angiogênese no microambiente tumoral (46, 47).

Outro mecanismo bastante importante na eliminação da célula infectada é a interação entre Fas (CD95) e FasL (CD95L). A interação entre essas duas proteínas induz uma cascata de sinalização induzindo a ativação da via extrínseca da apoptose (44, 48).

Uma vez que o antígeno é eliminado, a quantidade de células T CD8 diminui consideravelmente e o que resta são as células de memória. Geralmente, o pico da resposta imune ocorre no 7º dia e a partir desse ponto, passa a decair. A fase de decaimento é conhecida como fase de contração da resposta imune, regulada diretamente pela apoptose e possibilitando a homeostase do organismo (49). Nesse contexto, existem duas vias de regressão da resposta imune em linfócitos: AICD (Activation-Induced Cell Death) e ACAD (Activated T Cell Autonomous Death). A primeira delas requer a re-estimulação do complexo TCR/CD3 que, durante a fase de contração da resposta, permite a ocorrência da AICD. A principal via da AICD é dependente da ligação Fas/FasL. Por outro lado, a ACAD independe da re-estimulação de TCR e, por sua vez, utiliza-se da via intrínseca da apoptose, mediada pela proteína Bim. Essas duas vias interagem para o controle da resposta imune a fim de manter a homeostase e prevenir o desenvolvimento de doenças auto-imune. No entanto, enquanto a AICD está majoritariamente presente na eliminação das células T ativadas pelas doenças crônicas, a ACAD regula o número de células T durante a fase de regressão (50, 51).

As células T que induzem apoptose por AICD são células que tem sua atividade diminuída devido a persistência de estimulação ao antígeno e são conhecidas como células T em estado de exaustão, caracterizada pela progressiva perda de funções efetoras (52, 53).

Dentro desse contexto, as células T possuem diversas proteínas de superfícies que permitem a classificação dessa célula quanto ao seu estado de ativação. Com o passar o tempo, estes marcadores foram caracterizados em sendo de estimulação e de inibição (52). Em uma ativação normal de célula T, ambos os marcadores são expressos para regular uma dada resposta imune, eliminando o antígeno, e manter a homeostase (Baitsch et al., 2012). No entanto, o estudo desses marcadores é complexo, devido à função ambígua que possuem tanto na estimulação, quanto na inibição de células T (52, 54, 55).

Durante a ativação das células CD8+ há a expressão de receptores em sua superfície que influenciam na proliferação e na capacidade de sobrevivência da célula. O primeiro

marcador que é expresso é o CD69, após a ativação via TCR. Em seguida, ocorre o aumento da expressão do receptor de IL-2 (CD25), de grande importância para o aumento da proliferação dessas células. Reddy e colaboradores evidenciaram que nos linfócitos T em repouso de indivíduos saudáveis, era possível observar uma baixa expressão de CD69 e uma moderada expressão de CD25. Após a ativação, o aumento da expressão de CD69 ocorre antes do que o de CD25 e, em seguida, ocorre um aumento progressivo deste último nas primeiras 24 horas (56).

As células T exaustas são caracterizadas pela diminuição da secreção de citocinas como a IL-2 (responsável por sinais de sobrevivência e proliferação), seguido de uma diminuição da secreção de INF-gama e TNF-alfa (53). Essas células também falham em se diferenciar em células de memória de vida longa e reduzem a resposta à citocinas IL-7, IL-2, IL-15, que normalmente são associadas à diferenciação celular (57).

Quando essas células adquirem um fenótipo de exaustão, elas passam a expressar receptores de inibição tais como CTLA4, PD1, e TIM3 em sua superfície celular. Estes receptores são cruciais para a regulação da ativação das células T e para prevenir a geração de doenças autoimunes. No entanto, as células tumorais exploram esse mesmo mecanismo para evitar a resposta imune (58-60).

O receptor CTLA4 (traduzido do inglês, proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico) é uma molécula crucial para a manutenção da homeostase e manutenção da tolerância periférica. Essa molécula tem sido diretamente relacionada como um regulador negativo de resposta anti-tumoral mediada pelas células T CD8⁺ (59). Atualmente, testes clínicos mostraram resultados promissores no tratamento de tumores utilizando bloqueadores de CTLA-4, particularmente em melanomas (61, 62).

A proteína de morte celular 1 (Programed cell Death protein-1 (PD-1)) foi identificada como uma proteína expressa quando as células T se encaminham para a morte celular programada. De fato, a falta dessa proteína em camundongos gerou diferentes casos de doenças autoimunes (63). Essa molécula possui dois ligantes, o PDL1 e o PDL2. A interação entre PD1 e PDL1 controla a ativação de células T e é um dos mecanismos utilizados pelas células tumorais para escapar da resposta (64). O uso de anticorpos monoclonais que bloqueiam PD-1 *in vivo* promove expansão de linfócitos T citotóxicos, reduzem o crescimento tumoral e promovem rejeição tumoral (65).

Outra proteína envolvida com a tolerância nas células T CD8+ é a molécula TIM3 (T cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing 3). A deficiência dessa proteína não prejudica o desenvolvimento tímico e não tem nenhuma relação com autoimunidade ou doenças linfoproliferativas. Alguns estudos mostraram que TIM3 é co-expresso com PD1 em células T CD8+ tumor-específicas em camundongos e em pacientes com melanoma em estágio avançado. As células que expressam ambos os receptores se comportam como células em estado de exaustão, por possuírem baixas taxas proliferativas e por deixarem de produzir citocinas. No entanto, o bloqueio de ambos receptores mostra reverter o estado de exaustão e restaura a imunidade antitumoral (54, 66, 67).

1.4.1 Metilação e os linfócitos T CD8

Muito pouco é conhecido sobre a relação entre as alterações epigenéticas e o desenvolvimento dos linfócitos T CD8+. No entanto, sabe-se que a metilação de DNA é fundamental na função efetora dessas células. A metilação de DNA é importante no processamento dos linfócitos no timo, promovendo a sobrevivência das células duplo negativas e a diferenciação das duplo positivas (68). Nas células T CD8+ efetoras, foi mostrado que os genes da granzima B e de INF-gama perdem a metilação na região promotora quando são comparadas as células “naive”. No entanto, genes relacionados à homeostasia apresentam hipermetilação nas células efetoras e hipometilação nas células “naïve” e de memória nas mesmas regiões (69).

Para o desenvolvimento de células T CD8+ de memória, algumas alterações epigenéticas se destacam, como no locus do gene INF- γ , que se apresenta hipometilado nas células efetoras e hipermetilado nas células “naïves”. Entretanto, o perfil de metilação de DNA encontrado nas células de memória sofre modificações mais rapidamente do que em células “naïves”, tendo em vista que ao ocorrer uma reinfecção, elas precisam estar prontas para iniciar sua ação efetora. No entanto, os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda são pouco elucidados (70). Apesar do pouco conhecimento sobre as regulações epigenéticas nas células T CD8+, alguns estudos mostraram que essas modificações ajudam a manter um estado de baixa responsividade nessas células (57).

Assim sendo, este projeto de pesquisa procurou investigar os efeitos do tratamento com agente desmetilante do DNA nas células T CD8+, devido à sua capacidade de reconhecer e eliminar células tumorais. Além disso, as investigações sobre os mecanismos antitumorais

com baixas doses de agentes desmetilantes do DNA tem focado principalmente nos efeitos sobre as células tumorais. No entanto, como essa droga é administrada sistemicamente, é essencial entender qualquer impacto funcional sobre o sistema imune, o que ainda permanece desconhecido. Dessa forma, a nossa hipótese é que a exposição com baixas doses de 5-AZA-CR ou 5-AZA-CdR durante a expansão das células T CD8⁺ pode aumentar a expressão e produção de citocinas e, por sua vez, favorecer uma resposta antitumoral.

2 Conclusão

Em resumo, o tratamento com agentes desmetilantes do DNA altera a função efetora das células T CD8 como demonstrado no presente trabalho. Após o tratamento, as células que proliferam e sobrevivem ao tratamento estão mais ativas e produzem mais citocinas. Dessa forma, o tratamento leva a uma diminuição do tamanho tumoral dependente das células T CD8. Ainda nesse contexto, as células T CD8 que recebem o tratamento tem um potencial efetor aumentando induzindo maior morte celular em células alvo. Além disso, o tratamento com agentes desmetilantes do DNA altera o fenótipo de memória e de efetora. Dessa forma, o conhecimento da ação dos agentes desmetilantes do DNA sobre o sistema imune, especialmente sobre as células T CD8, é essencial para se poder combinar essa terapia epigenética a outras terapias. Novas pesquisas precisam ser feitas afim de se entender melhor a polarização das células T CD8 bem como qual o mecanismo pelo qual essas células passam a ter um potencial citotóxico aumentado.

REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
2. INCA. Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2018.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
4. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007;121(1):1-14.
5. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology.* 2002;3(11):991-8.
6. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach* 2nd Edition 2007. 1-820 p.
7. Uzman A, Lodish H, Berk A, Zipursky L, Baltimore D. *Molecular Cell Biology* (4th edition) New York, NY, 2000, ISBN 0-7167-3136-3. Biochemistry and Molecular Biology Education. 2000;29:Section 1.2The Molecules of Life-Section 1.2The Molecules of Life.
8. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429(6990):457-63.
9. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):27-36.
10. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human molecular genetics.* 2001;10(7):687-92.
11. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 2005;45:629-56.
12. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature biotechnology.* 2010;28(10):1069-78.
13. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Advances in experimental medicine and biology.* 2013;754:3-29.
14. De Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends in cell biology.* 2010;20(10):609-17.
15. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. 2012. p. 12-27.
16. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 2002;21(35):5400-13.
17. Tsai HC, Li H, Van Neste L, Cai Y, Robert C, Rassool FV, et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer cell.* 2012;21(3):430-46.
18. Agrawal K, Das V, Vyas P, Hajdúch M. Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs - A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacology & therapeutics.* 2018;188:45-79.
19. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2002;21(35):5483-95.
20. Gang AO, Frøsig TM, Brimnes MK, Lyngaa R, Treppendahl MB, Grønbaek K, et al. 5-Azacytidine treatment sensitizes tumor cells to T-cell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies. *Blood Cancer Journal.* 2014;4(3):e197-.

21. Li X, Mei Q, Nie J, Fu X, Han W. Decitabine: a promising epi-immunotherapeutic agent in solid tumors. *Expert review of clinical immunology*. 2015;11(3):363-75.
22. Pískala A, Šorm F. Nucleic acids components and their analogues. II. Synthesis of 1-glycosyl derivatives of 5-azauracil and 5-azacytosine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1964;29(9):2060-76.
23. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980;20(1):85-93.
24. Chen L, MacMillan AM, Chang W, Ezaz-Nikpay K, Lane WS, Verdine GL. Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry*. 1991;30(46):11018-25.
25. Santi DV, Norment a, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(22):6993-7.
26. Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1998;58(1):95-101.
27. Li H, Chiappinelli KB, Guzzetta Aa, Easwaran H, Yen R-WC, Vata-palli R, et al. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. *Oncotarget*. 2014;5(3):587-98.
28. Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2015;162(5):974-86.
29. Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen Shu Y, et al. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015;162(5):961-73.
30. Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, Dalley BK, Yang Q, Albertsen H, et al. Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):14007-12.
31. Šimová J, Polláková V, Indrová M, Mikyšková R, Bieblová J, Štěpánek I, et al. Immunotherapy augments the effect of 5-azacytidine on HPV16-associated tumours with different MHC class I-expression status. *British Journal of Cancer*. 2011;105(10):1533-41.
32. Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S. Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery*. 2013;154(6).
33. Claus R, Almstedt M, Lubbert M. Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Seminars in oncology*. 2005;32(5):511-20.
34. Fonsatti E, Nicolay HJ, Sigalotti L, Calabro L, Pezzani L, Colizzi F, et al. Functional up-regulation of human leukocyte antigen class I antigens expression by 5-aza-2'-deoxycytidine in cutaneous melanoma: immunotherapeutic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(11):3333-8.
35. Kulaeva OI, Draghici S, Tang L, Kraniak JM, Land SJ, Tainsky MA. Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. 2003:4118-27.
36. Li Q, Tainsky MA. Epigenetic Silencing of IRF7 and/or IRF5 in Lung Cancer Cells Leads to Increased Sensitivity to Oncolytic Viruses. *PloS one*. 2011;6(12).

37. Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015;162(5):961-73.
38. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(8):595-602.
39. Gallegos AM, Xiong H, Leiner IM, Susac B, Glickman MS, Pamer EG, et al. Control of T cell antigen reactivity via programmed TCR downregulation. *Nature immunology*. 2016;17(4):379-86.
40. Gao GF, Rao Z, Bell JL. Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends in immunology*. 2002;23(8):408-13.
41. Kimura MY, Pobezinsky LA, Guinter TL, Thomas J, Adams A, Park JH, et al. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8(+) T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nature immunology*. 2013;14(2):143-51.
42. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):749-61.
43. Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, Chuang TH, Casiano CA, O'Brien GA, et al. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *The EMBO Journal*. 1996;15(10):2407-16.
44. Cox MA, Kahan SM, Zajac AJ. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology*. 2013;435(1):157-69.
45. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*. 2007;96:41-101.
46. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2010;49(7):1215-28.
47. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death And Differentiation*. 2003;10:45.
48. Rauf A, Khatri M, Murgia MV, Saif YM. Fas/FasL and perforin-granzyme pathways mediated T cell cytotoxic responses in infectious bursal disease virus infected chickens. *Results in Immunology*. 2012;2:112-9.
49. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(7):532-42.
50. Arnold R, Brenner D, Becker M, Frey CR, Krammer PH. How T lymphocytes switch between life and death. *European journal of immunology*. 2006;36(7):1654-8.
51. Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. 2008. p. 52-64.
52. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco SA. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:455.
53. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010;129(4):474-81.
54. Baitsch L, Fuertes-Marraco SA, Legat A, Meyer C, Speiser DE. The three main stumbling blocks for anticancer T cells. *Trends in immunology*. 2012;33(7):364-72.
55. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Munz C, Romero P, Zehn D. T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nature reviews Immunology*. 2014;14(11):768-74.

56. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of immunological methods*. 2004;293(1-2):127-42.
57. Zuniga EI, Macal M, Lewis GM, Harker JA. Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections. *Annual review of virology*. 2015;2(1):573-97.
58. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology*. 2009;10(1):29-37.
59. Sledzinska A, Menger L, Bergerhoff K, Peggs KS, Quezada SA. Negative immune checkpoints on T lymphocytes and their relevance to cancer immunotherapy. *Molecular oncology*. 2015;9(10):1936-65.
60. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2007;27(4):670-84.
61. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol*. 2018;8.
62. Ribas A. Anti-CTLA4 Antibody Clinical Trials in Melanoma. Update on cancer therapeutics. 2007;2(3):133-9.
63. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. *Immunological reviews*. 2010;236:219-42.
64. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology*. 2012;24(2):207-12.
65. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63(19):6501-5.
66. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(10):2175-86.
67. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(10):2187-94.
68. Chappell C, Beard C, Altman J, Jaenisch R, Jacob J. DNA methylation by DNA methyltransferase 1 is critical for effector CD8 T cell expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(8):4562-72.
69. Scharer CD, Barwick BG, Youngblood BA, Ahmed R, Boss JM. Global DNA methylation remodeling accompanies CD8 T cell effector function. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013;191(6):3419-29.
70. Kersh EN, Fitzpatrick DR, Murali-Krishna K, Shires J, Speck SH, Boss JM, et al. Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(7):4083-93.