

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E
BIOAGENTES PATOGÊNICOS**

Michele Procópio Machado

**Efeito na ativação de células T e NK modificadas com
GXMR-CAR contendo distintos domínios de reconhecimento para
Cryptococcus spp.**

**Ribeirão Preto
2023**

Michele Procópio Machado

**Efeito na ativação de células T e NK modificadas com
GXMR-CAR contendo distintos domínios de
reconhecimento para *Cryptococcus* spp.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Dr. Thiago Aparecido da Silva

Ribeirão Preto

2023

Efeito na ativação de células T e NK modificadas com GXMR-CAR contendo distintos domínios de reconhecimento para *Cryptococcus* spp.

As infecções fúngicas invasivas representam um grave problema de saúde pública afetando mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, e entre os principais fungos causadores dessas doenças se destacam o *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* por acometerem indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, respectivamente. A taxa de mortalidade anual está estimada em 625.000 óbitos decorrentes da criptococose. *Cryptococcus* spp. apresenta diversos fatores de virulência que medeiam a subversão da resposta imunitária do hospedeiro, fato que está associado a uma reduzida atividade microbida de células fagocítica e a um comprometimento da diferenciação de células T em perfis efetores contra a criptococose. A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência de *Cryptococcus* spp., sendo composto majoritariamente por GXM (glucuronoxilomanana) que mascara componentes da parede celular fúngica passíveis de reconhecimento por células da imunidade. A terapia com antifúngico para o tratamento da criptococose leva a efeitos colaterais adversos ao hospedeiro e também ao aumento da resistência por *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos. Com isso, imunoterapias têm sido propostas no tratamento da criptococose, e uso da terapia celular através de células T ou NK modificadas com receptor antigênico quimérico (CAR) é uma estratégia terapêutica promissora contra a criptococose. Estudos prévios demonstraram que o redirecionamento de células T expressando um CAR, contendo um domínio de reconhecimento específico para o GXM de *Cryptococcus* spp., foi capaz de reduzir a progressão da criptococose. Dessa forma, o presente trabalho investigou o efeito de distintos GXMR-CAR contendo diferentes scFv (domínio variável de cadeia única), oriundos dos clones 2H1 e 18B7 de anticorpos monoclonais (mAb) específicos para GXM, como constituintes da região de reconhecimento do antígeno de GXMR-CAR. Os vetores lentivirais dos construtos gerados 18B7-GXMR-CAR e 2H1-GXMR-CAR compartilham as sequências codificadoras para a região hinge/transmembrana (molécula de CD8) e a porção intracelular composta da molécula coestimulatória CD137 (4-1BB) acoplado ao CD3ζ. Os plasmídeos de 18B7-GXMR-CAR e 2H1-GXMR-CAR foram co-transfectados com pMD2 e pPAX2 em células HEK-293T para a produção de partículas lentivirais visando a modificação de células Jurkat e NK-92. As células Jurkat modificadas com 18B7-GXMR-CAR e 2H1-GXMR-CAR reconheceram GXM solúvel de *C. gattii* (R265) e *C. neoformans* (H99), e essas células modificadas após a incubação com GXM solúvel ou leveduras de *C. gattii* ou *C. neoformans* produziram altos níveis de IL-2. Além disso, células Jurkat expressando 18B7-GXMR-CAR ou 2H1-GXMR-CAR apresentaram sinalização tônica e de forma mais pronunciada após a expressão de 18B7-GXMR-CAR, e a ativação celular mediada pelos construtos de GXMR-CAR na presença ou ausência do alvo foi drasticamente mitigada após a incubação com Dasatinibe, um inibidor farmacológico de proteínas quinases da família Src. Os diferentes níveis de sinalização tônica desencadeado por 18B7-GXMR-CAR apresentaram forte relação com a oligomerização do scFv de GXMR-CAR na superfície celular, como constatado na microscopia de fluorescência uma elevada clusterização de 18B7-GXMR-CAR e uma distribuição mais homogênea de 2H1-GXMR-CAR. Os construtos de GXMR-CAR também mediaram a ativação de células T modificadas após cocultivo com isolados clínicos de *C. neoformans* ou *C. gattii* e, além disso, as células modificadas produziram elevados níveis de IL-2 após a incubação com soro de paciente com criptococose. Os construtos 18B7-GXMR-CAR e 2H1-GXMR-CAR foram expressos em células NK-92 para investigar a capacidade de mediar um efeito fungicida e fungistático sobre leveduras de *C. neoformans* ou *C. gattii*, porém não foi observado uma redução do crescimento do fungo na

presença das células NK-92 modificadas. Por outro lado, a expressão dos construtos de GXMR-CAR induziu uma produção significativa de IFN- γ pelas células NK-92 modificadas mesmo na ausência e presença de *Cryptococcus* spp., e o construto 2H1-GXMR-CAR se destacou como maior indutor da liberação de IFN- γ . Os mecanismos envolvidos na ausência de atividade fungicida de células NK-92 modificadas com GXMR-CAR sobre o *Cryptococcus* spp. estão sendo investigados, e os indícios direcionam para uma baixa liberação de grânulos de perforina pelas células NK-92 modificadas a partir do domínio de transdução de sinal adotado nos construtos de GXMR-CAR avaliados. Portanto, concluímos que ambos os scFv de 2H1 e 18B7, pertencentes ao GXMR-CAR, promovem um nível de ativação próximo nos diferentes tipos celulares modificados e incubados com o ligante, e indícios contundentes demonstram que a distinção na oligomerização do GXMR-CAR causada pelos diferentes scFv reflete na intensidade da sinalização tônica mediada por GXMR-CAR.

Palavras-chave: Receptor antigênico quimérico, GXMR-CAR, NK-92, Células T, *Cryptococcus* spp., scFv.