



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANDREA JOHANNA MANRIQUE RINCON

ESTRATÉGIAS PARA A INATIVAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS POR
SILENCIAMENTO GÊNICO TRANSCRICIONAL DE FOXP3 PARA
POTENCIALIZAR A IMUNIDADE ANTITUMORAL

*INACTIVATION OF REGULATORY T CELLS BY TRANSCRIPTIONAL GENE
SILENCING OF FOXP3 TO POTENTIATE ANTITUMOR IMMUNITY*

CAMPINAS

2017

ANDREA JOHANNA MANRIQUE RINCON

**ESTRATÉGIAS PARA A INATIVAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS POR
SILENCIAMENTO GÊNICO TRANSCRICIONAL DE FOXP3 PARA
POTENCIALIZAR A IMUNIDADE ANTITUMORAL**

**INACTIVATION OF REGULATORY T CELLS BY TRANSCRIPTIONAL GENE
SILENCING OF FOXP3 TO POTENTIATE ANTITUMOR IMMUNITY**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na área de concentração da clínica médica.

Thesis presented at the Medical School of the University of Campinas as part of the requirements for obtaining the title of Doctor in Sciences in the concentration area of internal medicine.

ORIENTADOR: Dr. MARCIO CHAIM BAJGELMAN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
DEFENDIDA DA TESE PELA ALUNA ANDREA JOHANNA
MANRIQUE RINCON E ORIENTADA PELO DR. MARCIO
CHAIM BAJGELMAN

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 201302041-6
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8146-1495>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Rosana Evangelista Poderoso - CRB 6652

M317e Manrique Rincón, Andrea Johanna, 1986-
Estratégias para a inativação de células T regulatórias por silenciamento gênico transcricional de *Foxp3* para potencializar a imunidade antitumoral / Andrea Johanna Manrique Rincón. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marcio Chaim Bajgelman.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunoterapia. 2. Câncer. 3. Linfócitos T reguladores. 4. Vírus. 5. Aptâmeros de RNA. I. Bajgelman, Marcio Chaim. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Inactivation of regulatory T cells by transcriptional gene silencing of *Foxp3* to potentiate antitumor immunity

Palavras-chave em inglês:

Immunotherapy
Cancer
T-Lymphocytes, regulatory
Viruses
Aptamers, RNA

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Marcio Chaim Bajgelman [Orientador]
Jose Alexandre Marzagão Barbuto
Margareth Castro Ozelo
Raquel Chacon Ruiz Martinez
Welbert de Oliveira Pereira

Data de defesa: 20-12-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ANDREA JOHANNA MANRIQUE RINCON

ORIENTADOR: DR. MARCIO CHAIM BAJGELMAN

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. MARCIO CHAIM BAJGELMAN**
- 2. PROF. DR. MARGARETH CASTRO OZELO**
- 3. PROF. DR. JOSÉ ALEXANDRE MARZAGÃO BARBUTO**
- 4. PROF. DR. RAQUEL CHACON RUIZ MARTINEZ**
- 5. PROF. DR. WELBERT DE OLIVEIRA PEREIRA**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 20/12/2017

À memória da minha melhor amiga Maria Angélica Benavides (1986-2014) e de meu querido avô Hernando Rincón López (1929-2011) os quais teriam apreciado muito este momento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Marcio Chaim Bajgelman pela orientação, discussões e trabalho sobre este projeto. Obrigada pelo apoio e a confiança para desenvolver ideias novas de forma independente e pelo aprendizado por meio de discussões;

Ao grupo de vetores virais do LNBIO (LVV), a Camila Beraldo que colaborou com a clonagem dos imunomoduladores usados nos testes das vacinas. Um agradecimento especial a Jessica Toscaro pelo suporte em alguns dos experimentos *in vivo*, o apoio relacionado as tarefas do dia a dia e pela amizade;

Ao Dr. Paulo Oliveira pela paciência e empolgação com os projetos de bioinformática que eu lhe levava, mesmo sem ele ter muito tempo disponível;

À Dra. Kaliandra Gonçalves pela ajuda com o Operetta e sua colaboração com a padronização de experimentos;

Ao professor Silvio Consonni pela ajuda com todas as técnicas de histologia e microscopia confocal, além das discussões interessantíssimas de GoT;

À Luana Nunes pelas dicas para conseguir fazer a “imuno” dos tumores;

À Dra. Hozana Andrade Castillo e a Dra. Angela Costa pelas discussões científicas, conselhos e conversações sobre a vida, foi maravilhoso encontrá-las no caminho e que virassem minhas amigas. Sempre admirei muito sua dedicação e excelente trabalho;

À Wanderlei Pedroso e Lais Ternero de Oliveira pela ajuda técnica e compreensão com a quantidade de amostras de sequenciamento;

À Dra. Angela Saito pelas caronas, discussões sobre CRISPR/CAS e a vida mesma. Obrigada por permitir-me compartilhar momentos muito sérios e intelectuais e outros não tão sérios onde nos relaxamos um pouco;

À Mayara Miyachiro pelas caronas e discussões sobre o fim dos tempos e tudo o que está errado com a vida. Fiquei muito feliz com ter encontrado você;

Ao Douglas Adamosky pelas caronas e o fato de sempre estar disponível para conversar sobre a vida acadêmica e os protocolos;

À Dra. Luciana Ruas, embora você tenha chego recentemente, as nossas discussões têm sido muito produtivas, obrigada pela ajuda. Desde já posso falar que é um prazer trabalhar junto de você;

À Dra. Samira Zouhir e Giulia Gonçalves que já não estão mais no LNBIO, mas me deram uma força muito grande quando estiveram que continua cada vez que falamos;

À mestre Maria Eugenia Ribeiro de Camargo obrigada por ensinar-me o bonito trabalho da citometria, por colaborar na padronização de muitos experimentos e participar ativamente deles, por compartilhar tantos cafés e conselhos, e principalmente por deixar-me entrar na sua família. Para mim você e a sua família viraram a minha família brasileira;

À mestre Anna Carolina Pereira Viera de Carvalho, nós chegamos ao mesmo tempo ao Brasil e foi muito grato ter compartilhado com você muitos aprendizados, obrigada pela ajuda técnica, e todas as funções que você desenvolveu que fazem parte deste trabalho, mas principalmente obrigada pelo apoio e força desde qualquer lugar do mundo que você estiver. Conhecer você é virar sua amiga quase irmã é uma das coisas mais bonitas que me deixo o Brasil;

À todos as pessoas do LNBio que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho, bem seja pela sua função laboral, por compartilhar um equipamento, emprestar um reagente ou pelas conversas simples trocando dados ou experiências;

Ao Juan Pablo Narváez, você foi indispensável, e falar “obrigada” parece ser demasiado fraco e leve para representar tudo o que você me ajudou e como eu sinto-me ao respeito. Tudo seu apoio e amor permitiram-me chegar aqui e sabê-lo meu melhor amigo e companheiro de vida traz felicidade à minha existência;

À minha família que mesmo longe sempre me deram uma força. Minha avó preciosa, Melida Restrepo de Rincón que é o maior exemplo que eu tenho e a minha mãe Sonia Rincón que sempre está cuidando de mim. Meu Irmão Juan Guillermo Manrique que também longe de casa, tem nós mostrado a importância da família e sempre aparece enviando apoio. Obrigada, vocês me ajudaram muito, bem seja mandando café, animando pelo telefone, mandando coisas pelo Whatsapp, ou entendendo que a minha ausência física é por alcançar os meus objetivos. Gracias

absolutas. Ao mestre Juan José Builes Gómez o que eu aprendi de você serve para todos os aspectos da vida, obrigada pelo apoio, mesmo longe sua presença é essencial;

Àqueles que desafortunadamente partiram, mas teriam gostado de ver que eu consegui chegar até este ponto: minha melhor amiga Maria Angélica Benavides, meu Avó Hernando Rincón e meu pai Guillermo Manrique;

Aos animais utilizados nesse trabalho; meus mais profundos agradecimentos e respeito;

Às instituições que fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo apoio ao projeto e pela bolsa de estudos (Processo: 2013/02041-6), projetos de auxílio a pesquisa FAPESP (MCB 2017/06692-2, MCB 2015/01488-2, MCB 2012/13132-0) e auxílio CNPq (KGF 141670/2014-7).

Ao Laboratório Nacional de Biociências, LNBio, e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CNPEM, lugar onde foram realizados os experimentos deste trabalho, com apoio das instalações envolvidas (LVV, LMG, LBE e LIB e citometria);

Ao centro de transfusões do Hospital das Clínicas por ter me permitido realizar a irradiação das células tumorais nas instalações;

À unidade de citometria do hemocentro da UNICAMP que me permitiu realizar os experimentos de *sorting*, especialmente a Irene Santos que tem sido muito atenciosa e me ajudou bastante a padronizar e desenvolver esses experimentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em clínica médica da FCM, UNICAMP e membros da banca por terem aceitado participar da avaliação desse trabalho.

RESUMO

A imunoterapia para câncer desenvolveu-se extraordinariamente na última década, no entanto, apesar destes esforços, ainda existem mecanismos utilizados pelas células tumorais para conseguirem se evadir do sistema imunológico. Biopsias de tumores revelam que o infiltrado de células T regulatórias (Treg) no sítio tumoral correlaciona-se com a progressão de câncer, tendo em vista a sua habilidade de antagonizar a ação de linfócitos efetores. Deste modo, a eliminação específica de Treg pode atuar em sinergia com outras terapias antitumorais. Existem estratégias para a inibição de Treg, entretanto, devido à falta de seletividade, estas abordagens acabam por eliminar também outros linfócitos efetores, podendo assim atuar de forma antagônica a imunidade antitumoral. O fator de transcrição FOXP3, presente quase exclusivamente em Treg, desempenha um papel central associado com a manutenção do fenótipo imunossupressor nestas células. Devido ao fato de FOXP3 ser inacessível a anticorpos, neste trabalho desenvolvemos uma nova estratégia de imunoterapia para inibir as células Treg com base na veiculação de moléculas de RNAi para silenciamento gênico transcricional (TGS) do *Foxp3* e, em decorrência, inibir o fenótipo imunossupressor. Escolhemos como alvos alguns sítios CpG em regiões do promotor e do enhancer especificamente desmetilado em Treg (TSDR). Em contraste ao silenciamento pós-transcricional que tem como objetivo a inibição do RNA mensageiro que é constantemente expresso na célula, o sistema TGS tem como alvo o genoma celular, bastando uma única molécula para bloquear a expressão gênica de *Foxp3*. Efetuamos a veiculação das moléculas de TGS-RNAi por meio de uma plataforma de vetores virais que possibilitaram uma prova de conceito, posteriormente aprimorada para uma segunda plataforma baseada em aptâmeros quiméricos que podem apresentar um grande potencial para o desenvolvimento de futuras aplicações clínicas. Adicionalmente, também apresentamos neste trabalho, resultados de um estudo com vacinas antitumorais que atuam na coestimulação de células T e que poderão atuar em sinergia com a depleção de células T regulatórias, para potencializar a resposta imune antitumoral.

Palavras-chave: imunoterapia, câncer, Treg, vetores virais, Aptâmeros, TGS

ABSTRACT

Immunotherapy for cancer has developed remarkably in the last decade, however, despite these efforts, there are still mechanisms used by tumor cells to evade the immune system. Tumor biopsies reveal that regulatory T-cell infiltrates (Treg) at the tumor site correlate with cancer progression, because of their ability to antagonize the action of effector lymphocytes. In this way, the specific elimination of Treg may act in synergy with other antitumor therapies. There are strategies for the inhibition of Treg, however, due to the lack of selectivity, these approaches also eliminate other effector lymphocytes, thus acting antagonistically to antitumor immunity. The transcription factor FOXP3, present almost exclusively in Treg, plays a central role associated with the maintenance of the immunosuppressive phenotype in these cells. Due to the fact that FOXP3 is inaccessible to antibodies, in this work we have developed a new immunotherapy strategy to inhibit Treg cells based on the delivery of RNAi molecules for the transcriptional gene silence (TGS) of *Foxp3* and, consequently, inhibiting the immunosuppressive phenotype. We chose as target some CpG sites in the promoter and also in the enhancer Treg-specific demethylated region (TSDR) region. In contrast to post-transcriptional gene silencing that aims to inhibit the messenger RNA, which is constitutively expressed in the cell, the TGS system targets the cellular genome, and a single molecule is enough to block the gene expression of *Foxp3*. We performed the delivery of the TGS-RNAi molecules through a platform of viral vectors that enabled a proof of concept, later improved for a second platform based on chimeric aptamers that may increase the potential for developing future clinical applications. In addition, we show in this work, results of a study with antitumor vaccines for T cells costimulation that may act in synergy with the depletion of regulatory T cells strategies, to enhance the antitumor immune response.

Key words: immunotherapy, cancer, Treg, viral vectors, Aptamers, TGS

RESUMEN

La inmunoterapia contra el cáncer se ha desarrollado notablemente en la última década, sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, todavía hay mecanismos utilizados por las células tumorales para evadir el sistema inmune. Las biopsias tumorales revelan que los infiltrados de células T reguladoras (Treg) en el sitio del tumor se correlacionan con la progresión del cáncer, por su capacidad para antagonizar la acción de los linfocitos efectores. De esta manera, la eliminación específica de Treg puede actuar en sinergia con otras terapias antitumorales. Existen estrategias para la inhibición de Treg, sin embargo, debido a la falta de selectividad, estos enfoques también eliminan otros linfocitos efectores, actuando así de manera antagonista contra la inmunidad antitumoral. El factor de transcripción FOXP3, presente casi exclusivamente en Treg, juega un papel central asociado con el mantenimiento del fenotipo inmunosupresor en estas células. Debido al hecho de que FOXP3 es inaccesible a los anticuerpos, en este trabajo hemos desarrollado una nueva estrategia de inmunoterapia para inhibir las células Treg basadas en el suministro de moléculas de RNAi para el silenciamiento transcripcional génico (TGS) de *Foxp3* y, en consecuencia, inhibir el fenotipo inmunosupresor. Elegimos como objetivo algunos sitios CpG en el promotor y también en la región desmetilada específica de Treg (TSDR) que es un *enhancer*. En contraste con el silenciamiento génico postranscripcional que tiene como objetivo inhibir el ARN mensajero, que se expresa constitutivamente en la célula, el sistema TGS se dirige al genoma celular, y una sola molécula es suficiente para bloquear la expresión génica de *Foxp3*. Realizamos la entrega de moléculas TGS-RNAi a través de una plataforma de vectores virales que permitieron demostrar la eficiencia de esta estrategia, que posteriormente fue mejorada con una segunda plataforma basada en aptámeros quiméricos que pueden tener un mayor potencial para desarrollar aplicaciones clínicas. Además, mostramos en este trabajo los resultados de un estudio con vacunas antitumorales para la coestimulación de células T que puede actuar en sinergia con el TGS de *Foxp3*, con el objetivo de potenciar la respuesta inmune antitumoral.

Palabras clave: inmunoterapia, cáncer, Treg, vectores virales, aptámeros, TGS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Treg	Célula T regulatória (<i>Regulatory T cell</i>)
FOXP3	Forkhead box P3 (proteína)
<i>Foxp3</i>	Forkhead box P3 (gene)
CD25	Cadeia alfa do receptor da Interleucina-2
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
shRNA	short hairpin RNA
sasRNA	small antisense RNA
tiRNA	transcriptional interference RNA
VSVG	Vírus da estomatite vesicular com envelope de glicoproteína (<i>Vesicular stomatitis virus - glycoprotein envelope</i>)
IFN- γ	Interferon gama
<i>Rag2</i>	Gene ativador da recombinação 2 (<i>Recombination activating gene 2</i>)
TGS	Silenciamento gênico transcricional
PTGS	Silenciamento gênico pós transcricional
siRNA	RNA de interferência pequeno
mRNA	RNA mensageiro (messenger RNA)
NHEJ	União de extremos não homólogos (<i>Nonhomologous end joining</i>)
sgRNA	Pequeno RNA guia (<i>short-guide RNA</i>)
CRISPR/Cas9	Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas e Aglomeradas associadas à nucleasse 9 (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein-9 nuclease (Cas9)</i>)
CTLA4	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico (<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>)
PD1	Proteína de morte celular programada 1 (<i>Programmed cell death protein 1</i>)

TNFRSF	Super família de receptores do fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>)
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado com TNF (<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>)
PAP	Fosfatase acida prostática (<i>Prostatic acid phosphatase</i>)
GITR	Receptor de TNF induzido por glicocorticoides (<i>glucocorticoid-induced TNF receptor</i>)
LAG3	Gene 3 de ativação linfocitária (<i>lymphocyte-activation gene</i>)
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
IDO	Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase (<i>Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
ACT	Transferência de células T adotivas (Adoptive cell transfer)
SELEX	Evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (<i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment</i>)
TILs	linfócitos infiltrados por tumores (tumor-infiltrating lymphocytes)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O câncer, uma das principais causas de morte.....	17
1.2 O câncer e o sistema imune, uma guerra infinita	18
1.3 Imunoedição em câncer; evolução e pressão seletiva.	23
1.4 Mecanismos de eliminação de células tumorais mediados por células T	24
1.5 Imunoterapia para câncer, uma resposta natural a um problema complexo.....	26
1.5.1 Vacinas terapêuticas antitumorais, terapias feitas com o mesmo tumor.....	30
1.5.2 A família de receptores do fator de necrose tumoral constitui um grupo de ligantes para coestimulação de células efectoras que podem ser usados em vacinas antitumorais.	34
1.5.3 Imunossupressão como alvo de imunoterapia	37
1.6 Células T regulatórias protagonistas da homeostase imune	41
1.7 Células T regulatórias e câncer, as cúmplices?	42
1.8 FOXP3, o regulador das reguladoras	44
1.8.1 A regulação do regulador	47
1.9 Silenciamento transcricional.....	51
1.10 Sistema CRISPR / CAS para edição de genes e supressão da expressão de <i>Foxp3</i>	53
1.11 Sistemas de entrega de candidatos para TGS que podem ser usados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	56
1.11.1 Vetores virais	56
1.11.2 Aptâmeros, o futuro?.....	59
2. OBJETIVOS	63
2.1 Objetivos Gerais	63
2.2 Objetivos Específicos.....	63
3. METODOLOGIA.....	65
3.1 Análise bioinformática da sequência do gene <i>Foxp3</i>	65
3.2 Desenho e clonagem de candidatos de RNA para TGS em <i>Foxp3</i>	65

3.3 Produção de aptâmeros	66
3.4 Produção viral e titulação	66
3.5 Aprovação da Comissão de Ética e Biossegurança	66
3.6 Isolamento imunomagnético de células primárias T CD4 e CD8	66
3.7 Ensaio <i>in vitro</i> para avaliar candidatos para TGS.....	66
3.8 Citometria de fluxo para ensaio de inibição de <i>Foxp3</i>	67
3.9 Ensaio de imunossupressão usando Treg tratadas com candidatos TGS e células CD8 efectoras.....	67
3.10 Ensaios de inibição de <i>Foxp3</i> e imunossupressão usando aptâmeros.....	68
3.11 Análises de metilação	68
3.12 Linhagens celulares MCF7 - FOXP3-CRISPR	68
3.13 Isolamento de RNA e perfil de expressão de genes.....	69
3.14 Estabelecimento de linhagens celulares para modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> derivado de B16F10	69
3.15 Camundongos.....	69
3.16 Ensaios dos efeitos das vacinas <i>in vitro</i>	70
3.16.1 Aquisição e análise da imagem (<i>operetta</i>).....	70
3.16.2 Citometria de fluxo	70
3.17 Inoculação e tratamento de tumores	71
3.18 Histologia e imunofluorescência.....	71
3.19 Citometria de fluxo de linfócitos infiltrados por tumores (TILs).....	72
3.20 Análise estatística	72
4. RESULTADOS	73
4.1 Análise de bioinformática de <i>Foxp3</i>	73
4.2 Desenho e clonagem dos candidatos de RNAi	75
4.3 Avaliação dos candidatos para silenciamento transcricional em células primarias	77
4.4 Teste de utilização de diferentes envelopes heterólogos para otimizar a veiculação de transferência gênica lentiviral.....	79
4.5 O silenciamento transcricional do gene <i>Foxp3</i> permite evitar a imunossupressão mediada por Treg.....	80

4.6 Candidatos de TGS-RNAi induzem metilação de DNA nas regiões alvo.....	81
4.7 Geração de um aptâmero quimérico de RNA para inibir o fator de transcrição FOXP3 em células Treg	82
4.8 O aptâmero quimérico 41BB-TS6 pode mediar inibição do fenótipo imunossupressor de Treg.	84
4.9 Ensaios <i>in vitro</i> para avaliar a eficiência dos candidatos sgRNA para CRISPR	85
4.9.1 Análise da expressão de <i>Foxp3</i> na célula humana de câncer de mama MCF7.....	87
4.10 O FOXP3 pode estar relacionado com a proliferação das células MCF7	88
4.11 O sistema CRISPR/cas pode ser veiculado por vetores retrovirais de forma específica em células CD4 humanas, inibindo-se a expressão de <i>Foxp3</i>	89
4.12 Experimentos <i>in vivo</i> , padronização de modelos para imunoterapia e exploração de vacinas antitumorais.	91
4.13 Artigo I: Exploring Synergy in Combinations of Tumor-Derived Vaccines That Harbor 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF (Publicado) Link: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01150/full	92
4.14 Artigo II: (Submetido) Development Of A Flow Cytometry Assay Which Allows To Evaluate The Efficiency Of Immunomodulatory Vaccines To Enhance T Cell-Mediated Antitumor Response.	105
5. DISCUSSÃO	124
5.1 Utilização de candidatos de RNAi para induzir o silenciamento transcricional em células T regulatórias.....	124
5.2 Diferentes estratégias de veiculação de candidatos para TGS baseadas em vetores virais e aptâmeros quiméricos, servem para fazer entrega dos candidatos a células Treg.	126
5.3 O fator de transcrição FOXP3 pode ser inibido em células humanas por meio de vetores virais alvo-dirigidos carreando o sistema CRISPR/CAS	128
5.4 A combinação de vacinas imunomodulatórias pode atuar em sinergia, favorecendo a imunidade antitumoral e induzindo uma proteção duradoura em animais redesafiados.	130
6. CONCLUSÃO	131
7. REFERÊNCIAS	133
8. APÊNDICES.....	167
9. ANEXOS	171

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer, uma das principais causas de morte

“No livro de Lewis Carroll, Alice através do espelho e o que ela encontrou por lá, a rainha vermelha diz a Alice que o mundo gira tão rápido baixo seus pés que tem de correr o mais que pode só para continuar no mesmo lugar. Esse é o nosso problema com o câncer pois estamos obrigados a continuar correndo só para permanecer no mesmo lugar”

-Siddhartha Mukherjee

O imperador de todas as doenças, uma biografia do câncer, 2011 (1)

O câncer não pode ser representado como uma única doença, devido a existência de tantas manifestações dele, como diferentes tipos de células existem no corpo humano (2). Porém, todas estas manifestações que podemos agrupar como câncer compartilham sua origem na acumulação de mutações genéticas e epigenéticas que permitem uma divisão incontrolável, adquirindo diferentes mecanismos para evitar a morte e adquirindo a capacidade de fazer metástase. Além disso, os tumores apresentam heterogeneidade e plasticidade fenotípica e funcional, sendo cada célula o resultado de diferentes fatores e mutações capazes de responder de maneira diferente ao ambiente e existindo dentro do tumor células tronco capazes de formar novos tumores rapidamente (3), o que faz com que um tratamento consiga só eliminar algumas das células do tumor, em quanto outras permaneçam imutáveis sendo resistentes.

O câncer é a segunda causa de morte no mundo inteiro com 14 milhões de casos novos e 8 milhões de mortes relacionadas em 2012 (4), sendo que esse número aumentou para 8.8 milhões em 2015, onde uma de cada seis mortes é causada pela doença (5). Já no Brasil, no ano de 2016, se apresentaram 600 mil novos casos estimados pelo Instituto Nacional do Câncer, INCA Brasil, sendo a segunda causa de morte na população com 225 mil mortes anualmente (6).

Sendo uma doença com altos índices de mortalidade, é necessário compreender melhor as bases moleculares que a causam e que se mantem comuns a todos os tipos. Isso foi o objetivo dos cientistas Hannahan e Weinberg os quais, no ano 2000, e depois de estudar múltiplos casos clínicos, identificaram seis características comuns a todos os tipos de câncer: autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade para sinais de inibição de crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial ilimitado de replicação; angiogênese sustentada e capacidade de invadir tecidos e criar metástases (7).

Vale a pena observar que no ano 2000, ainda as evidências do relacionamento do sistema imune com o câncer não conseguiram convencer os autores de colocar essa relação no trabalho. Porém, isso mudaria com os experimentos realizados na próxima década, especialmente pelo grupo do Schreiber como veremos no próximo item.

1.2 O câncer e o sistema imune, uma guerra infinita

“Tantos homens e mulheres já deram tanto na batalha contra o câncer no passado. Suas energias, talentos e sacrifícios têm construído os alicerces em que todos os progressos futuros devem descansar”

- Richard Nixon

"Statement About the National Cancer Act of 1971," December 23, 1971 (8).

Já para o ano de 2011, com os novos descobrimentos feitos durante essa década foram incluídas quatro novas características em um novo artigo chamado *“The hallmarks of cancer, next generation”* (9). As novas características incluíam a habilidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular, a promoção da inflamação, a instabilidade genômica e finalmente a evasão da destruição pelo sistema imune. Esse último ponto foi discutido com mais profundidade por Chen e Mellman em 2013, formulando a hipótese do ciclo imunológico do câncer, o lugar onde a oncologia encontra a imunologia (10). Esse ciclo consiste numa

série de eventos que começam quando o tumor produz antígenos que são capturados pelas células dendríticas as quais apresentam esses antígenos ligados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I ou II, o que resulta na ativação e proliferação de células T efectoras. As células ativadas migram e infiltram os tumores reconhecendo os antígenos que lhes foram apresentados e, deste modo, matando as células tumorais. Esse último passo gera a liberação de novos antígenos o que reativará o ciclo novamente. É interessante notar que antes do processo descrito acontecem eventos de inflamação derivados do fato dos tumores aumentarem em tamanho e o sangue não ser suficiente para oxigenar e nutrir todas as células, o que resulta em necrose e liberação de moléculas pro-inflamatórias que facilitam a migração de células apresentadoras de antígenos para o local tumoral (11). O efeito da inflamação pode afetar o desenvolvimento e progressão do câncer assim como a resposta à terapia, devido à relação com a apresentação antigênica e com os ambientes imunossupressores que podem determinar a infiltração e função das células efectoras.

A história que subjaz a descoberta de como o sistema imune pode interferir com o crescimento tumoral começou a desenvolver-se em 1909 com o cientista Paul Ehrlich. Ele realizou uma revisão sobre os conhecimentos existentes até o momento na área, observando que o câncer ocorreria em altas frequências se o hospedeiro não tivesse um mecanismo de defesa natural contra novas transformações (12). Essa foi a base da hipótese da imunovigilância que seria postulada por Lewis Thomas, quem considerava que a principal função da imunidade não era proteger contra o transplante de órgãos mas sim contra o câncer (13), e por Sir. Macfarlane Burnet, quem assegurava que as células tumorais que possuísem novos antígenos seriam eliminadas pelo sistema imune rapidamente sem deixar evidência clínica da doença (14). Em 1970 Burnet descreveu a imunovigilância como:

“O conceito da imunovigilância pode ser expressado como segue: em grandes animais de longa vida, como na maioria dos vertebrados de sangue quente, mudanças genéticas herdadas devem ser comuns em células somáticas e uma proporção dessas mudanças representará um passo em direção à malignidade. É uma necessidade evolutiva que deva haver algum mecanismo

para eliminar ou inativar essas células mutantes potencialmente perigosas e postula-se que esse mecanismo é de caráter imunológico” (15)¹.

Com a finalidade de demonstrar que o sistema imunológico exerce um papel fundamental no controle antitumoral, pensou-se inicialmente em fazer comparações entre animais imunocompetentes e animais com deficiências na resposta imune. Desta maneira poderia observar-se o papel do sistema imune no desenvolvimento dos tumores. Inicialmente os testes foram realizados com o modelo do camundongo “*Nude*” (chamado assim pela ausência de pelo) (16,17), ao ser um camundongo que carecia de timo e que contava com uma escassa presença de células T e anticorpos.

Porém, experimentos desenvolvidos entre 1973 e 1979 com tumores induzidos pelo cancerígeno 3-Methylcholanthrene (MCA) realizados por Stutman (18) e Outzen (19) e um seguimento de tumores espontâneos realizado por Rygaard (20), foram muito desanimadores a respeito dessa hipótese mostrando que esses camundongos não exibiam um aumento no número de tumores induzidos nem espontâneos, escrevendo inclusive Rygaard e Povlsen:

“Era de esperar-se que... mudanças malignas espontâneas no “nude” fossem frequentes se a imunovigilância fosse a resposta imune mediada pelas células. Mas não foram observadas tais mudanças. As implicações são obscuras mas parecem apontar a uma dissociação entre a imunidade mediada por células e a imunovigilância fazendo um chamado para uma redefinição da última” (20)²

Tais experimentos pareciam ter deixado claro que não era o sistema imune o responsável pela eliminação de tumores. Não obstante, como foi

¹ Texto na língua original: “The concept of immunological surveillance can be stated as follows: In large long-lived animals, like most of the warm-blooded vertebrates, inheritable genetic changes must be common in somatic cells and a proportion of these changes will represent a step toward malignancy. It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for eliminating or inactivating such potentially dangerous mutant cells and it is postulated that this mechanism is of immunological character.”

² Texto original “Thus it was to be expected... that spontaneous malignant change in the nude would be of frequent occurrence if immune surveillance was a cell mediated immune response. No such malignant change was observed. The implications of this are obscure, but seem to point to a dissociation between cell-mediated immunity and immune surveillance, calling for a redefinition of the later”

demonstrado depois, o problema não estava no sistema imune, mas em várias presunções sobre o camundongo *nude*. Em primeiro lugar, apesar de possuir menos células T que o camundongo selvagem, ainda possui populações de células T com receptores α e β funcionais, além de outras células que podem mediar respostas antitumorais e não são dependentes do timo como *Natural Killers* (NK), células T γ e δ , e células B. Em segundo lugar, a linhagem que foi usada nos experimentos era altamente sensível ao efeito do MCA por possuir uma isoforma da enzima que metaboliza o composto com uma alta atividade. Em terceiro lugar, o tempo de seguimento de sete meses pode não ser suficiente para observar a formação de tumores espontâneos em camundongos que possuem a maquinaria genética de supressores de tumores intacta (21).

Agora, fazendo-se um breve exercício, se considerarmos que o corpo de um humano adulto saudável possui 3.72×10^{13} células (22), cada uma com um genoma que contem 19.000 genes (23), dos quais 140 quando alterados por mutações podem levar ao processo de carcinogênese onde as células tumorais teriam entre dois a oito mutações desses 140 genes (24). Se ignoramos as taxas de mutação, nas que podem influir diferentes fatores ambientais e todas as demais variáveis a probabilidade de ter duas mutações dentre desses 140 genes por célula é igual a 1,42%, agora se pensamos em cada vez que essas 3.72×10^{13} células se dividem o risco desse indivíduo ter câncer aumenta consideravelmente. Afortunadamente, o desenvolvimento do câncer é muito mais complexo e não depende só das mutações para começar, precisa também de uma série de fatores extrínsecos, e ainda muito mais importante, ele precisa escapar do sistema imune.

No final da década de 90 o grupo de Schreiber, na Universidade de Washington, realizou estudos mostrando que linhagens murinas de fibrossarcoma que careciam do receptor do IFN- γ cresciam vigorosamente contrário à linhagem selvagem, quando se induziam tumores usando os carcinógenos MCA e Meth A (25). Posteriormente o mesmo grupo mostrou que camundongos *knockout* para o receptor do IFN- γ ou knockouts para o fator de transcrição STAT1 mostravam um crescimento maior e mais agressivo em tumores induzidos com MCA e um aumento no número de tumores espontâneos comparados com o selvagem (26). Estudos realizados usando knockouts para

p53 e uma das subunidades do IFN- γ mostraram também mais tumores nos duplo mutantes do que nos camundongos knockouts somente para o p53 (26). Além do interferon, um estudo utilizando camundongos knockouts para a perforina (27) apresentou resultados similares aos observados com IFN- γ mostrando que componentes da imunidade estavam envolvidos no controle dos tumores.

Interessantemente, o grupo de Schreiber repetiu os experimentos de indução de tumores com MCA, mas desta vez usou camundongos *knockout* para o gene ativador da recombinação 2 (RAG2) que é expresso somente em linfócitos. Nesses experimentos eles observaram um aumento significativo na progressão de tumores e na ocorrência de tumores naturais similar ao observado nos experimentos com camundongos *knockout* para os genes do receptor do interferon gama ou STAT-1. Eles decidiram então desenhar um camundongo duplo *knockout* para o receptor do interferon e para o gene RAG2 que chamaram de *Rksk*, os resultados mostraram um incremento no número de tumores induzidos comparado com os camundongos selvagens, mas não comparado com os knockouts individuais. Nos tumores que ocorreram naturalmente, os animais que eram *RkSk* tiveram tumores em 82% dos casos, uma percentagem parecida com os animais que eram *knockout* só para o gene RAG2. Eles depois usaram esses tumores para transplantá-los em camundongos imunocompetentes e em *RkSk*. Os resultados foram fascinantes, os tumores desenvolvidos em condições normais do sistema imune eram mais imunogênicos do que os tumores produzidos em camundongos com ausência de linfócitos ou interferon (28). Essa última observação foi feita pelo Engel *et al.* comparando camundongos SCID e imunocompetentes mas ainda sem entender a base imunológica dessa diferença (27). E é aqui que se comprova o papel paradoxal do sistema imune em câncer, pois efetivamente é possível observar uma imunovigilância, como foi demonstrado pelos experimentos com *knockouts* dos diferentes componentes do sistema imune, mas ao mesmo tempo, é possível observar também que quando o sistema imune está funcionando perfeitamente os tumores que sobrevivem são muito mais imunogênicos por terem passado por uma pressão seletiva.

Em pacientes que sofrem de AIDS (29), que foram imunossuprimidos para aceitar um transplante (30) e pacientes que sofrem de alguma imunodeficiência primária (PIDs) (31) observam-se uma taxa maior de desenvolvimento de tumores, especialmente tumores de origem viral. Essas observações fortaleceram o desenvolvimento do conceito da imunoeedição.

1.3 Imunoeedição em câncer; evolução e pressão seletiva.

“Nada na biologia faz sentido a não ser à luz da evolução”

- Dobzhansky

Biology, molecular and organismc, 1964 (32)

Proposto pelo grupo do Schreiber (28,33,34) a imunoeedição é um processo sequencial que contém três etapas principais; (i) Eliminação, (ii) Equilíbrio e o (iii) Escape. Como ele chama “os três Es da imunoeedição do câncer”.

A eliminação é o equivalente ao conceito inicial da imunovigilância, onde os tumores ao começarem a crescer causam um dano no tecido que promove a inflamação e a migração de células NK, NKT, células T γ e δ , macrófagos e células dendríticas. Essas células dão início ao ciclo imunológico produzindo diversas citocinas e migrando a linfonodos para ativar células efetoras, que migraram para reconhecer e eliminar as células com os antígenos que lhes têm sido apresentados no contexto do MHC. Com a destruição das células tumorais, os detritos das células mortas vão promover de novo o ciclo entrando numa fase de equilíbrio. Nessa etapa acontece a imunoeedição e as células tumorais sofrem uma pressão adaptativa que leva a que somente as menos imunogênicas consigam crescer. Além de selecionar-se mutações que favorecem a expressão de fatores imunossupressores como TGF- β e IL10. Também apresenta-se um aumento das células supressoras derivadas de células mielóides que facilitam a migração e indução de células T regulatórias, as quais poderão suprimir diferentes tipos de células efetoras (35). Essa fase vai selecionar as células mais

agressivas, porém, pode durar bastante tempo sem mostrar evidências clínicas da doença, mas à medida que o tumor vai ficando com células menos imunogênicas e vai acumulando mais fatores imunossupressores começa a fase do escape com um sistema imune exausto e com múltiplos fatores imunossupressores que debilitam o ciclo imuno-oncológico e favorecem o crescimento e metástases dos tumores (36).

Se pensarmos nos tecidos como ecossistemas os cânceres podem ser observados como espécies em evolução. Dentro de uma neoplasia, um mosaico de células mutantes compete pelo espaço e recursos, evade a predação pelo sistema imune e coloniza novos ecossistemas (37). O aspecto evolutivo no câncer permite explicar a dificuldade de encontrar terapias que permitam “curar”. As células evoluem por um processo reiterativo de expansão clonal, diversificação genética e seleção clonal dentro dos cenários adaptativos dos ecossistemas de tecidos, onde acumulam mutações que favorecem seu rápido crescimento e evasão da morte. A intervenção terapêutica pode fornecer inadvertidamente uma pressão seletiva potente para a proliferação de células resistentes, mas também pode conter a chave para um controle mais efetivo (38). Em 1976 Peter Nowell propôs a teoria evolutiva do câncer (39), isso sem conhecer ainda a imunoeedição, a qual é a maior pressão seletiva que existe nos tumores antes de começar a terapia. Sendo a imunossupressão a principal resposta a essa pressão.

1.4 Mecanismos de eliminação de células tumorais mediados por células T

“Uma melhor compreensão de como os CTLs matam células tumorais durante a imunoterapia ajudará a prever as respostas dos pacientes e a selecionar os melhores protocolos para obter CTLs ativados que matam eficientemente células tumorais sem induzir outros efeitos indesejáveis”

-Martínez-Lostao et al.

How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells?, 2015 (40)

Os linfócitos T citotóxicos (CTL) e células *natural killers* (NK) são os protagonistas no processo de eliminação de células tumorais, mediando a imunovigilância. Outros tipos de células, como macrófagos ou células dendríticas, podem fagocitar células tumorais e desempenham um papel importante na apresentação antigênica para ativação de células T (41). Ambos CTL e NK utilizam dois mecanismos básicos para destruir as células tumorais: (i) grânulos citotóxicos com perforina e granzima, e (ii) sinalizações pró-apoptóticas mediadas pela interação ligante/receptor de proteínas Fas ligante (FASL) e o ligante indutor de apoptose relacionado com TNF (TRAIL) (42).

Com relação ao primeiro mecanismo de citotoxicidade linfocitária, os grânulos de linfócitos citotóxicos contêm proteínas citotóxicas e pró-apoptóticas que causam a morte das células alvo e são liberados através da exocitose em uma sinapse transitória, limitada, e formada entre a célula citotóxica e seu alvo. As principais proteínas nesses grânulos são perforinas e granzimas.

A perforina é uma proteína formadora de poros de ~ 67 kDa que é armazenada em vesículas chamadas de grânulos. Existem duas hipóteses sobre a função da perforina. A primeira propõe que a perforina forma diretamente um poro na membrana plasmática, e com isso as granzimas se espalham para dentro da célula alvo. A segunda sugere que a perfuração interrompe os endossomos das células-alvo que contêm granzimas (43). O efeito dos grânulos citotóxicos é totalmente dependente da perforina para entrar na célula. Camundongos *knockout* para esta proteína são 1000 vezes mais susceptíveis a alguns tipos de câncer como linfomas (44).

A granzima B é uma protease que pode atuar de várias maneiras, clivando proteínas pró apoptóticas como Bcl-2 (B-celllymphoma2), clivando em geral proteínas de células-alvo em locais que seguem determinados resíduos de aspartato; ativando as caspases 3 e 7, induzindo a fragmentação do DNA através da DNase activada caspase -3 (CAD), e ativando a via mitocondrial de apoptose via citocromo C (45).

A granzima A é uma serina protease que ativa apoptose via mitocôndria, onde cliva proteínas relevantes no complexo do transporte de elétrons interrompendo o metabolismo mitocondrial e gerando espécies reativas de

oxigênio (ROS) que vão produzir dano do DNA de cadeia simples. A granzima A cliva nos locais que seguem a resíduos básicos e não requer caspases para induzir a morte das células-alvo. A granzima A regula a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL1b) por um mecanismo dependente da caspase-1 contribuindo para a formação do “*inflamosomo*” (46).

Outras granzimas (M,K) podem regular a produção de citocinas pró-inflamatórias e a indução de morte celular por translocação de fosfatidilserina (40).

Além das granzimas e perforinas, conforme já mencionamos, o linfócito citotóxico também pode induzir morte celular pela interação de seus ligantes com receptores na célula alvo. Os ligantes FASL e TRAIL pertencem a um subgrupo da superfamília do TNF que induz a apoptose, após ligação com os receptores Fas para FasL e TRAIL-R1/2 para TRAIL. A agregação dos receptores Fas e TRAIL envolve os domínios de morte dos receptores (DDs) que recrutam a molécula adaptadora FADD que em consequência ativa a caspase-8 que desencadeia duas vias apoptóticas, a mitocondrial via citocromo C e a que ativa a caspase-3 (47,48).

Ao ativar várias vias de morte celular, as células citotóxicas proporcionam uma proteção contra uma variedade de agentes patogênicos e tumores. Porém as células tumorais utilizam como mecanismo de defesa a imunossupressão para fugir das vias citotóxicas.

1.5 Imunoterapia para câncer, uma resposta natural a um problema complexo

“No entanto, como uma estratégia terapêutica emocionante que merece uma consideração séria tanto pela indústria biofarmacêutica como pela comunidade de oncologia clínica, os resultados recentes permitiram que a imunoterapia contra o câncer finalmente chegasse à idade certa”

- Ira Mellman, George Coukos & Glenn Dranoff
Cancer immunotherapy comes of age, 2011 (49).

Após a compreensão de alguns dos mecanismos que estão envolvidos na resposta imune, desenvolvemos a capacidade de inferir mecanismos nos quais poderíamos intervir para reativar a resposta (50). No ano de 2013 a revista *Science* reconheceu a imunoterapia como o “avanço do ano” (51).

Mas essa ideia começou em 1890 quando o médico William Coley do *Memorial Sloan Kettering Center* em New York observou uma série de regressões em pacientes com sarcomas inoperáveis após uma infecção causada por *Streptococcus pyogenes* que produzia Erisipela (cuja sintomatologia característica consiste em marcas vermelhas na pele). O médico decidiu infectar um paciente que se encontrava num estado avançado de sarcoma com essa bactéria, obtendo uma regressão do tumor principal e metastático e uma sobrevida de 8 anos antes da reaparição do tumor. Desafortunadamente, de 10 pacientes que Coley tentou infectar só três foram infectados até o ponto de mostrar Erisipela. Desses três, um sobreviveu por 8 anos, outro por 3 anos e meio e a outra por 6 meses (52). Por esses motivos Coley começou a tentar novos protocolos, um deles consistia em misturar o *Streptococcus pyogenes* com o *Bacillus prodigiosus* o qual aumentava a “virulência” da primeira. Por motivos de segurança e para tentar incrementar a reprodutibilidade Coley começou a trabalhar só com as toxinas cultivando as bactérias e depois esquentando-as até 58° C e filtrando o lisado antes de injetar nos pacientes (53). Seus resultados mostraram notáveis avanços no tratamento dos sarcomas inoperáveis e abriram a porta à possibilidade de estimular o sistema imune para tratar o câncer fazendo-o merecedor do título de “Pai da Imunoterapia” (54).

Contudo, seus aportes não terminaram aí. A ideia de Coley deu origem ao atual tratamento do câncer de bexiga aprovado pela FDA quando Lloyd Old e Baruj Benacerraf demonstraram que o *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), inibia o crescimento de tumores transplantados em camundongos (55). Após essa observação, em 1976, Morales *et al.* mostrou que o BCG poderia ser usado para o tratamento de câncer de bexiga mostrando regressões significativas (56), as mesmas reações foram observadas em sarcomas e melanomas (57). Atualmente esse tratamento é amplamente usado como a primeira opção terapêutica para o câncer de bexiga superficial. A ação terapêutica se deve à

internalização do BCG nas células de câncer de bexiga. Após a injeção, aumentam a expressão do MHC de classe II e ICAM-1 e secretam-se várias citocinas, incluindo IL-6. Além das células tumorais, as células dendríticas recrutam granulócitos, seguidos por macrófagos e linfócitos. Os TLRs poderiam ter um papel no reconhecimento do BCG pelas células uroteliais e células imunes e na secreção de citocinas pró-inflamatórias. A resposta observada pelos linfócitos é predominantemente uma resposta TH1. A citotoxicidade direta pelo BCG também pode ter um papel no recrutamento de células imunes ao induzir mais antígenos e morte de células tumorais (58).

Na última década, os ensaios clínicos de fase III com medicamentos destinados a melhorar a resposta imune alcançaram uma melhora na sobrevivência global de pacientes (59). O trabalho com imunoterapia contra câncer consiste em estimular o sistema imunológico para aumentar a resposta antitumoral.

Essa abordagem permite melhorar a resposta imune de várias maneiras:

Uma delas é usando moléculas que promovem (i) a apresentação de antígenos tumorais e maturação de APC como GM-CSF, CD40 e agonistas de TLR e (ii) a proliferação de células T efectoras, chamadas de moléculas coestimuladoras, estas incluem moléculas como 4-1BBL, OX40L, CD40, GITR. Essas moléculas podem ser veiculadas usando diferentes estratégias que vão desde anticorpos até vacinas feitas com células tumorais transduzidas e irradiadas. Para esse objetivo também estão sendo usadas vacinas de DNA e nanopartículas que carregam diferentes moléculas na membrana, além de vacinas personalizadas usando neoantígenos tumorais do próprio paciente (60–62). Citocinas como IL2, um dos primeiros tratamentos em imunoterapia a serem aprovados para pacientes com melanoma e câncer renal avançado (63). Desde meados da década de 1990, vários anticorpos contra antígenos tumorais como Her2/neu (64) e CD20 foram aprovados para uso concomitante com quimioterapia.

Outra estratégia é o uso de moléculas que inibem o ambiente imunossupressor, ou “pontos de verificação imunológicos” (em inglês *Immune-checkpoints*), estes referem-se a uma infinidade de vias inibitórias ligadas ao

sistema imunológico que são cruciais para manter a auto tolerância e a modulação da duração e amplitude das respostas imunes fisiológicas nos tecidos periféricos, a fim de minimizar os danos colaterais nos tecidos (65). Algumas moléculas de interesse são PD1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 e TIGIT (60). Esta abordagem tem um impacto importante em vários tratamentos contra o câncer no momento, especialmente, o uso de anticorpos para bloquear moléculas inibitórias de células T como CTLA-4 e PD-1 (66) as quais vem sendo aprovadas para diferentes tipos de câncer, incluindo uma recente aprovação para uso em qualquer tipo de tumor que apresente instabilidade genômica.

Uma tendência da terapêutica consiste em desenvolver estratégias antitumorais personalizadas. A engenharia de células T, por exemplo, consiste em modificar linfócitos provenientes do próprio paciente, para que estas células de defesa possibilitem um fortalecimento da resposta imune antitumoral. Neste sentido, as células T podem apresentar receptores engenheirados específicos para antígenos tumorais, inclusive alterando-se a porção citoplasmática do receptor para amplificar sinais de coestimulação, fortalecendo-se a atividade linfocitária e potencializando-se a imunidade antitumoral. Essa estratégia é chamada de CARs ou *Chimeric antigen receptors* pelas siglas em Inglês. São “medicamentos biológicos” que tem mostrado excelentes resultados em leucemias e que foram aprovados nesse ano para o uso na clínica para o tratamento da leucemia mielóide crônica (67). Outra estratégia utilizada, consiste em isolar células T de sítios tumorais a partir de biopsias, enriquecer esta população *in vitro* e depois reintroduzir estas células no paciente. Esta terapia, conhecida como transferência de células T adoptivas (ACT) foi desenvolvida por Rosenberg, alcançando respostas completas em melanoma metastático (68).

Essas terapias anteriormente mencionadas podem ser combinadas obtendo uma resposta em sinergia. Alguns trabalhos já foram realizados combinando, por exemplo, CTLA-4 e PD1 para melanoma, com resultados muito promissores, o objetivo dessas combinações é principalmente beneficiar pacientes que não poderiam ter benefício terapêutico com as monoterapias. (69,70).

É interessante ressaltar que muitas dessas imunoterapias para câncer estão envolvidas na inibição do ambiente imunossupressor, de fato muitos dos

anticorpos bloqueadores de *checkpoints* imunológicos que estão em teste clínico ou já foram aprovados, também apresentam efeitos inibitórios na atividade imunossupressora das células T regulatórias (Treg) o que faz delas uma população de alto interesse como alvo terapêutico para contra restar a imunossupressão. Porém existem outras estratégias que intentam potencializar a resposta de células T e ao mesmo tempo a apresentação antigênica, como as vacinas antitumorais.

1.5.1 Vacinas terapêuticas antitumorais, terapias feitas com o mesmo tumor

“Ao contrário das vacinas profiláticas que geralmente são administradas a indivíduos saudáveis, as vacinas terapêuticas para câncer são administradas a pacientes com câncer e desenhadas para erradicar as células cancerosas através do fortalecimento da própria resposta imune do paciente”

- Guo et al.

Therapeutic Cancer Vaccines, 2013

As vacinas para câncer podem agrupar diferentes tipos de estratégias que incluem exossomos produzidos por células tumorais ou dendríticas, células tumorais mortas, lisados tumorais, peptídeos de antígenos tumorais, vetores virais, DNA e células irradiadas (71,72).

Essas últimas podem ser células autólogas (provenientes do paciente) ou linhagens celulares já estabelecidas. O uso dessas células tem vários benefícios, o principal é a apresentação antigênica que pode dar-se via MHC de classe I e II, além de que estas células apresentaram muitos mais antígenos tumorais do que as outras estratégias de vacinas e isto pode levar a uma resposta mais efetiva a longo prazo (73). A história do uso de células irradiadas começou em 1970 quando Hanna fez experimentos misturando células hepáticas irradiadas com a bactéria do *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) para tratar micro metástases em cobaias (74).

Após esses experimentos, em 1993, o Dr. Glenn Dranoff fez um *screening* dos efeitos antitumorais que poderiam ter células irradiadas de melanoma (B16F10) expressando individualmente 10 citocinas diferentes no modelo murino de C57BL6. Ele observou que o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos ou GM-CSF era o mais potente produtor de resposta antitumoral (75). A partir desse momento a GVAX, como depois se chamaria, tem sido uma das estratégias mais amplamente usada com vários estudos clínicos. Segue uma breve descrição dos achados em alguns deles.

O GM-CSF foi testado como agente, em ensaios clínicos fase I e II, sempre concomitantemente com outras terapias (e.x. IL2 e IFN α) (76). Também foi usado em combinação com Temozolomida (77). Esses estudos foram realizados em câncer renal e melanoma. As respostas com estes tratamentos foram pouco satisfatórias. Agora o uso de células tumorais transduzidas para expressar GM-CSF supunha um efeito melhor do que a administração do fator solúvel, dado que ia aumentar também a apresentação antigênica direta dos antígenos tumorais. Contudo, existem alguns problemas nesse quesito, pois as células tumorais são difíceis de cultivar e muitas não conseguiam o suficiente material para poder fazer o regime completo de vacinação. Para superar esses problemas começaram a ser usadas linhagens tumorais produtoras de GM-CSF junto com as células autólogas o que resolveu parcialmente os problemas de quantidade de material (78,79). A continuação seguem alguns exemplos de ensaios com vacinas em diferentes tipos de câncer:

Câncer avançado de pulmão de células não pequenas (NSCLC Non-Small Cell Lung Cancer). Neste estudo (80) foram misturadas células autólogas que foram transduzidas com vetores adenovirais usando uma linhagem produtora de GM-CSF (alogênica). Desafortunadamente não tiveram o resultado esperado, possivelmente por um excesso de GM-CSF que favoreceu populações de células mieloides supressoras.

Em câncer de pâncreas testaram-se duas combinações de linhagens alogênicas, que mostraram um benefício de sobrevivência associado à indução e aprimoramento de respostas de células T CD8 +. Esses estudos de fases I (81) e II (82) mostraram uma melhora após a remoção cirúrgica dos tumores e tratamento conjunto com quimioterapia, radioterapia e GVAX. Dado que a

sobrevida do carcinoma ductal de pâncreas tratado convencionalmente é de um a cinco anos, somente, a imunoterapia está oferecendo novas alternativas; desde GVAX até anticorpos anti PD1 e CTLA-4. Porém, devido as características imunossupressoras deste tipo de tumores as melhores estratégias seriam as combinações deles para que o efeito sinérgico permita incrementar a apresentação antigênica e a resposta efetora (83). Um exemplo desses é um estudo clínico fase I que mostrou a sinergia entre GVAX e *Listeria monocytogenes* expressando mesotelina, um antígeno deste tipo de câncer. Os pacientes tratados com as duas terapias tiveram uma sobrevida mais prolongada que com as monoterapias (84).

Melanoma é um dos tumores mais estudados em imunoterapia pela alta infiltração de células imunes que possuem os tumores e pela agressividade e capacidade de metástase observada. Reportou-se o ano passado um ensaio clínico de fase II (85) o qual usando vacinas alogênicas que expressam 4-1BBL e HLA-A2 conseguiu obter uma sobrevida média de 26.2 meses para pacientes em estágios IIB-IV sem eventos secundários citotóxicos severos. Outros tipos de vacinas foram testadas também contra esse tipo de câncer usando vacinas do antígeno PRaME (*PREferentially expressed Antigen of MElanoma*) em pacientes em estágio IV com biópsias positivas para esse antígeno. Neste ensaio (86) 16,6% (2 de 12 pacientes) apresentaram efeitos tóxicos severos embora uma resposta humoral e celular específica. Por outro lado, a GVAX foi testada em células autólogas para melanoma em ensaios clínicos fase I com respostas antitumorais evidentes e sobrevida de 3 anos (87), mas com o problema de não apresentar suficientes células para o tratamento completo, como no caso do Luiten *et al.* (88). Nesse estudo menos de 50% dos pacientes (28 de 64) com melanoma em estágio IV receberam o tratamento completo, porém dos pacientes que receberam o regime completo de vacinas (seis) alcançaram uma sobrevida maior de cinco anos. No 2015, um ensaio fase I usando células alogênicas (89) para pacientes com melanoma IIB-IV removido cirurgicamente, mostrou que nenhum dos 20 pacientes avaliados apresentaram efeitos tóxicos severos, esse estudo agora está em fase II.

Em câncer de próstata, van den Eeertwegh *et al.* (90) mostraram em um ensaio clínico em fase I o efeito da GVAX em sinergia com ipilimumab, o

anticorpo anti-CTLA-4 e o anticorpo anti-PSMA (Prostate-specific membrane antigen) em pacientes com câncer de próstata metastático e resistente a castração. Os resultados mostraram uma sinergia entre as terapias, que supera os efeitos delas como monoterapias

Para gliomas, que são tumores caracterizados por crescimento local, resistência a terapias clássicas e ambiente imunossupressor, as vacinas antitumorais são particularmente interessantes (91). Uma das estratégias de vacinação para este tipo de tumor é usando vacinas de células dendríticas, DCVAX. Prins *et al.* (92) mostraram que em pacientes com glioblastomas em estágio IV pode-se ter um incremento significativo da sobrevida de pacientes novos e pacientes com doença recorrente inclusive após a remoção cirúrgica dos tumores, radioterapia e tratamento com temozolomida. Eles chegaram a esse resultado mediante a inoculação de células dendríticas provenientes do lisado do tumor do paciente. O resultado foi muito promissor pois três pacientes conseguiram sobreviver após seis anos, tendo em conta que a sobrevida para esses pacientes é normalmente de 14 meses. A DCVAX está em desenvolvimento na fase III (93)

Contudo, até o momento só duas imunoterapias de câncer baseadas em GM-CSF foram aprovadas pelo FDA; Sipuleucel-T e T-VEC. A primeira é uma proteína recombinante de GM-CSF fusionada com o antígeno PAP (fosfatase ácida prostática), um antígeno expresso em células tumorais de próstata (94). A segunda é um vírus oncolítico, derivado do vírus herpes simplex tipo-1 recombinante que infecta células tumorais e transfere um cassete de expressão da GM-CSF (95). Essas terapias foram aprovadas para o câncer de próstata e melanoma, respectivamente (96). Os resultados mostram que as vacinas podem ser interessantes para serem usadas em combinações com anticorpos imunomoduladores e outras estratégias de tratamento (97).

1.5.2 A família de receptores do fator de necrose tumoral constitui um grupo de ligantes para coestimulação de células efetoras que podem ser usados em vacinas antitumorais.

“O nome “fator necrotizante do tumor” foi utilizado pela primeira vez em 1962 para relatar a atividade necrotizante do tumor de algum fator no soro obtido de camundongos, após a injeção de polissacarídeo de Serratia marcescens”

-Aggarwal et al.

Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily : 25 years later, a golden journey, 2012 (98)

Os membros da família do fator de necrose tumoral são 19 ligantes que se unem a uma ou mais moléculas dos 29 receptores. Os receptores são expressos em linfócitos ativados e seus ligantes específicos são expressos em células apresentadoras de antígenos profissionais (APC), neutrófilos, macrófagos e células do estroma. (99). Estas moléculas podem transmitir diferentes sinais como; sobrevivência, inflamação, crescimento neural e apoptose.

Os membros desta família que têm sido estudados em câncer, tanto inibindo sua função como estimulando-a são: BAFFR, TACI, BCMA–BAFF, APRIL, FN14–TWEAK, TRAILR–TRAIL, CD30–CD30L, CD40–CD40L, OX40–OX40L, 4-1BB-4-1BBL, CD27–CD70, GITR–GITRL, DR3 e LIGHT (99–102). A indução dos receptores de OX40, 4-1BB e DR3 ocorre 24 horas após o reconhecimento do antígeno por uma célula *naive* e mais rápido por células de memória. Esta expressão pode durar por dias dependendo dos estímulos (103–105).

Como os receptores OX40 e 4-1BB são induzidos em resposta a estimulação antigênica, estes tem sido propostos como marcadores de células efetoras, que se consideram patogênicas em doenças autoimunes e protetoras em infecções e câncer (106). Nós usamos os ligantes destes receptores nas

vacinas terapêuticas derivadas de células tumorais B16F10 com o efeito de costimular linfócitos T e NK.

O receptor OX40, também conhecido por CD134, foi descoberto em 1987 usando um anticorpo que se une a células CD4 ativadas de rato (107). OX40 possui 4 domínios ricos em cisteína e um truncado o qual é uma característica da família TNFR. Seu ligante foi caracterizado em 1994 usando uma biblioteca de cDNA de linfoma (108). OX40 é predominantemente expresso em células T ativadas incluindo CD4, CD8, Th1, Th2, Th17, NKT, NK, neutrófilos e Tregs, sendo que a expressão em CD4 é mais prolongada do que em CD8 e constitutiva em nTreg murinas e induzível em nTreg humanas (109–111). OX40L é expresso principalmente em células apresentadoras de antígenos APC (112,113). A ligação destas moléculas regula a proliferação e a sobrevivência destas células o qual foi demonstrado com camundongos que expressavam constitutivamente OX40 em células T e OX40L em APC com aumento nos números de CD4 e decorrentes doenças autoimunes (114,115). Pelas características coestimuladoras, OX40 tem sido usado em estratégias antitumorais, principalmente com anticorpos agonistas. No modelo murino foram observados um aumento no número de células efectoras no infiltrado tumoral (116), além do fato de poder ser usado como marcador de células T efectoras dentro dos tumores primários e nos nódulos infiltrados de pacientes com câncer de mama (117). Também foi testada no modelo murino uma proteína de fusão de OX40L que apresentava um efeito sinérgico com um vírus recombinante derivado de herpes que era administrado intratumoralmente e codificava a sequência da GM-CSF (118). Foi demonstrado um aumento na resposta antitumoral usando vacinas antitumorais com efeito sinérgico com (i) a combinação de GVAX com o anticorpo anti-OX40 (119), e (ii) o uso de GVAX com células derivadas de tumores expressando OX40L (120). Inclusive, observou-se um efeito antitumoral independente de CD8 quando os camundongos receberam vacinas de lisado tumoral junto com uma proteína de fusão de OX40L e se depletaram diferentes populações de células (121).

Como as células Treg expressam OX40, o uso de anticorpos tem mostrado que esse receptor pode ser usado para inibir a população de Treg (122–124), porém, também existem trabalhos mostrando proliferação de Treg

após estimulação com anticorpos anti-OX40, e interessante parece que o efeito é dependente do contexto de citocinas (125). Um relato de ensaio clínico fase I com o anticorpo teve toxicidade leve e proliferação de células efectoras, mas os autores consideraram que eram necessárias maiores doses para ter um efeito mais forte (126).

O receptor 4-1BB, também conhecido por CD137 foi descoberto usando uma biblioteca de RNA de células T murinas em 1989 (127). Ele é expresso nas células T e NK e após a ativação transmite sinais que inibem a apoptose ao mesmo tempo que aumentam a proliferação e sobrevivência. Também, estimulam as funções efectoras e de memória dos linfócitos e estimulam a citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC) em NK (128–131). Seu ligante é expresso principalmente em APC (132). Dado que 4-1BB pode potencializar as respostas efectoras de vários linfócitos e gerar memória imunológica, é atualmente uma das moléculas coestimuladoras mais interessantes em imunoterapia. A parte intracitoplasmática do receptor 4-1BB transduz uma potente sinalização de ativação e por esse motivo tem sido utilizada para a engenharia de receptores quiméricos de células T, gerando as CAR T cells. O receptor quimérico apresenta portanto um domínio extracelular que interage com o complexo MHC-antígeno e transduz sinalização por meio do domínio intracitoplasmático de 4-1BB (133). Outra aplicação interessante está relacionada a coestimulação de células T utilizando anticorpos agonistas dirigidos ao receptor 4-1BB. Neste sentido, esta estratégia atua em sinergia a transferência adoptiva de células CD8 para o tratamento de melanoma (134). A estimulação com o anticorpo agonista de 4-1BB durante o protocolo de enriquecimento linfocitário *in vitro*, na presença de IL2 melhorou o fenótipo e função dos linfócitos CD8 (135).

Em modelos murinos o uso do anticorpo agonista em modelos tumorais mostrou efeitos antitumorais relevantes tanto em monoterapia (136) como em sinergia com anticorpos anti-PD1 (137), GVAX (138,139) e anticorpos anti-CTLA-4 (140) entre outros (128). Na clínica os efeitos não foram tão favoráveis dado que o uso do anticorpo agonista exacerbou as toxicidades (141) que em um estudo fase II, pacientes tratados para melanoma manifestaram hepatites grau IV, o que é potencialmente fatal, porém com respostas de remissão parcial em pacientes que superaram as toxicidades (142). Contudo, os ensaios clínicos

não conseguiram avançar as fases clínicas seguintes e o protocolo foi interrompido.

O receptor 4-1BB também é expresso de forma constitutiva em células Treg, sendo que estudos com doenças autoimunes(143) e estudos com transplantes (144) mostraram um benefício terapêutico com a administração do anticorpo agonista anti-4-1BB. Mas também foram observados efeitos de inibição de Treg (145). Esses efeitos de proliferação ou supressão de Treg parecem estar relacionados com o ambiente de citocinas no momento do contato com as Treg (146).

Os receptores OX40 e 4-1BB são considerados importantes alvos já que podem mediar o incremento da proliferação de várias populações com efeitos antitumorais, inibir células Treg, além de aumentar a expressão de moléculas como a *survivin* diminuindo a expressão de moléculas pro apoptóticas como BIM (109,147–150). Estas moléculas já foram usadas em sinergia em modelos antitumorais favorecendo a proliferação de células CD8 (151). Estudos com camundongos *knockout* para os receptores 4-1BB ou OX40, mostraram que apesar dos dois exercerem um efeito sobre células CD4 e CD8, e parecerem redundantes, o OX40 pode estar mais implicado com regulações em células CD4 em quanto o 4-1BB com às células CD8 (104).

1.5.3 Imunossupressão como alvo de imunoterapia

“Evidências emergentes indicam que a subversão da imunossupressão relacionada ao tumor é um passo essencial para permitir a indução de uma resposta imune eficiente do hospedeiro contra o tumor”

Frumento et al.

Targeting tumor-related immunosuppression for cancer immunotherapy, 2006

Por mais que as estratégias de imunoterapia para câncer, tenham chegado a converter-se hoje numa revolução promissora da terapia para o câncer,

especialmente os bloqueadores de *checkpoints* imunológicos, esta terapia só beneficia de 15 a 25% (152) dos pacientes. Isso é causado principalmente pela expressão tumoral dos ligantes associados aos inibidores e pelos mecanismos de imunossupressão. Esses mecanismos têm sido selecionados a partir da imunoeedição e podem enumerar-se assim (153):

- 1- Modificação na maquinaria de apresentação de antígenos. Sem antígenos a serem apresentados as células tumorais passam inadvertidas pelas células do sistema imune, se rompe o primeiro passo do ciclo imunológico de detecção e eliminação tumoral (10) e apesar destas células estarem com mutações que produzem proteínas defeituosas e, por tanto, altamente antigênicas, se a maquinaria de apresentação não funciona elas serão invisíveis ao sistema imune.
- 2- Expressão de ligantes de *checkpoints* inibitórios como PD1L e CTLA-4. Os receptores dos checkpoints, limitam as funções efectoras das células T dentro dos tecidos. Ao regular os ligantes para PD1 (PDL1 e PDL2) e CTLA-4 (B7-1, B7-2 ou CD80, CD86), as células tumorais bloqueiam as respostas imunes antitumorais no microambiente tumoral (65).
- 3- Secreção de fatores imunossupressores, algumas células tumorais expressam citocinas como IL10 e TGF- β que alteram a maturação de células dendríticas e regulam a expressão de proteínas da maquinaria de apresentação antigênica; os pacientes que tem tumores com uma alta expressão de TGF β apresentam maior incidência de metástases e diminuição na sobrevida (154).
- 4- Modulação do catabolismo de triptofano: A enzima indoleamina 2,3-dioxygenase (IDO) é altamente expressa em tumores. Em camundongos *knockout* para essa enzima as massas tumorais são menores e encontram-se mais infiltrados de linfócitos nos tumores (155).

- 5- Expressão e/ou liberação de microvesículas com Fas-L ou TRAIL, que levam a morte de células T efetoras que expressam Fas.
- 6- Incremento na concentração de células supressoras mielóides, esta é uma população heterogênea de células mielóides composta por macrófagos imaturos, granulócitos, células dendríticas entre outras de origem mieloide, que se caracterizam por estar num estado inicial de diferenciação. Esta população inibe interferon, induz anergia em células efetoras e induz Treg.
- 7- Promoção da expansão, recrutamento e ativação de células Treg. Um estudo de metanálise com 15.512 casos de câncer encontrou, de forma geral, uma correlação inversa entre a presença de células T regulatórias e a sobrevida de pacientes com câncer (156). As células T regulatórias são capazes de suprimir células efetoras que poderiam atacar o tumor. É interessante observar que o TGF β produzido pelas células tumorais pode induzir células T regulatórias, convertidas a partir de células efetoras. Assim esta população de Treg pode constituir um dos mecanismos de imunossupressão para beneficiar o crescimento tumoral e evasão do sistema imunológico.

O estudo destes mecanismos pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para potencializar a resposta imune antitumoral (36,157).

Na Figura 1, apresentamos um resumo gráfico dos principais processos descritos anteriormente desenvolvendo-se a partir do início do câncer. Estratégias de imunoterapia podem produzir uma mudança no balanço destes processos potencializando a morte de células tumorais, mudando da fase do escape para o equilíbrio e eliminação. A imunoedição pode induzir, por pressão seletiva, células cada vez menos imunogênicas e ambientes mais imunossupressores com um aumento no número das células Tregulatórias.

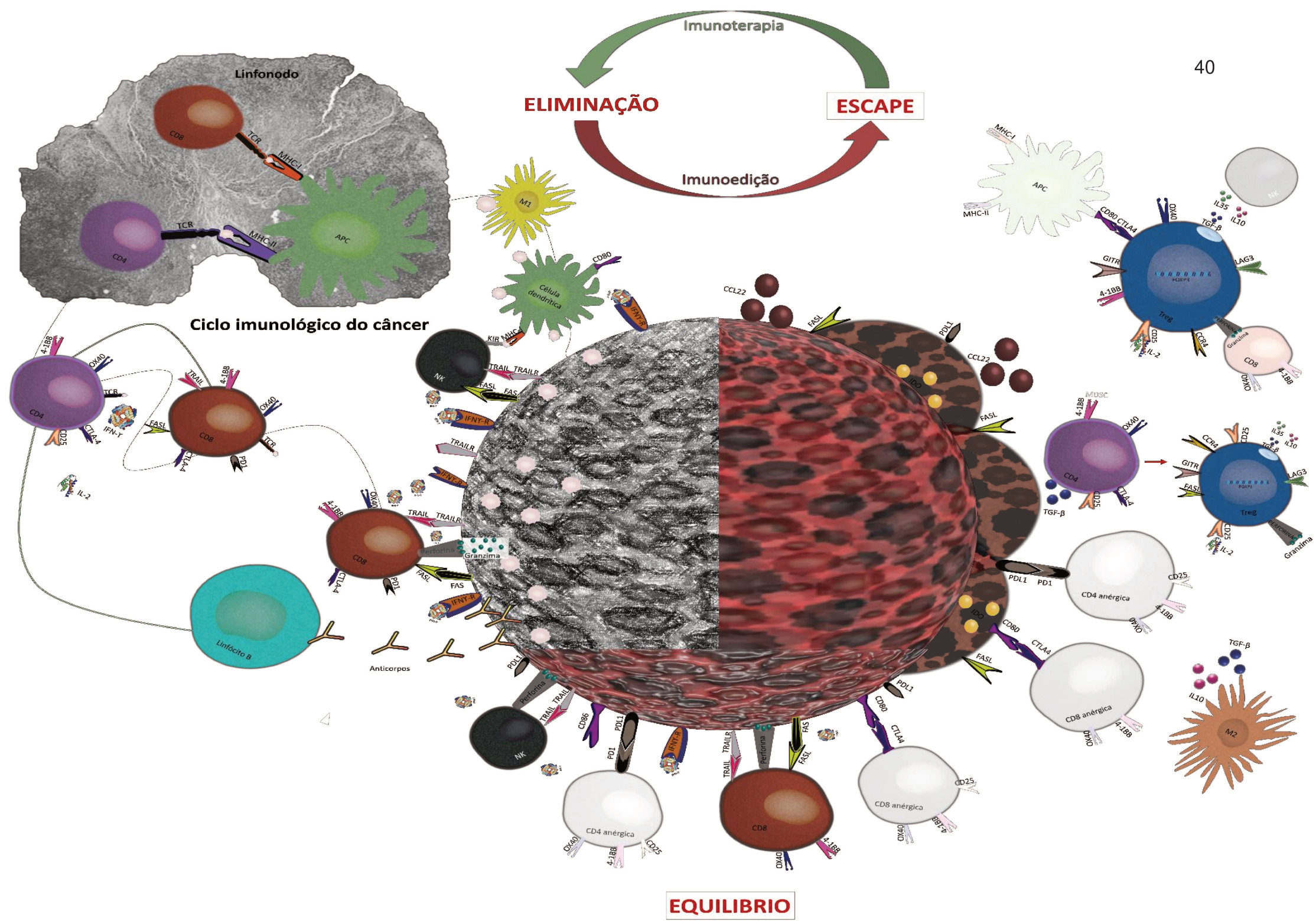


Figura 1 Os principais acontecimentos no complexo processo de resposta imune em câncer: Quando o processo tumoral inicia começa também, uma resposta imune promovida pela alteração do tecido no qual as células tumorais estão crescendo. Inicialmente estas células são reconhecidas por macrófagos ou células dendríticas que reconhecem antígenos tumorais e migram a linfonodos para apresentá-los a células T CD4 e CD8. Essas células T agora ativadas, começam a proliferar e migram para o tumor encontrando e destruindo células tumorais, junto com as células NK. Estas células citotóxicas matam as células via mecanismos de perforina granzima, TRAIL e FASL e estimulando a apresentação antigênica via IFN- γ . Quando as células tumorais morrem liberam novos antígenos que são reconhecidos por macrófagos ou células dendríticas que repetem os passos anteriores. Este processo se conhece como o ciclo imunológico do câncer e é o primeiro passo da imunoeedição: a fase de eliminação. Nesta fase as células citotóxicas conseguem matar células tumorais podendo inclusive acabar com a neoplasia, embora nesta fase, também começam a selecionar-se células menos imunogênicas e alguns mecanismos de imunossupressão como expressão do ligante de PD1. É aí quando começa a segunda fase a Imunoedição: a fase de equilíbrio. Nesta fase, embora ainda as células citotóxicas estejam matando células tumorais as células tumorais estão defendendo-se com ligantes que deixam as células citotóxicas em estados de anergia como CD80 o ligante de alta afinidade de CTLA-4 ou PDL1, elas também diminuem a expressão de MHC tornando-se invisíveis para as células apresentadoras de antígenos. Somente sobreviveram células baixamente imunogênicas que dão início a última fase, o escape, nessa fase as células tumorais geram um ambiente amplamente imunossupressor, secretando fatores como TGF- β que induz Treg que vão a imunossuprimir as células efetoras e as células dendríticas. O tumor também induz macrófagos tipo 2 que secretam TGF- β e IL10. Aqui pode observar-se um aumento do IDO que remove o triptófano que é indispensável para as células efetoras e um aumento da quimocina CCL22 que atrai entre outras células as Treg ao tumor. Neste panorama global a imunoterapia pode mudar a fase de escape pela fase de eliminação ou equilíbrio, prolongando a vida dos pacientes. NK: Natural Killer, APC: célula apresentadora de antígenos profissional, IFN- γ : Interferon gamma, M1: macrófago tipo 1, TRAIL: tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAILR: receptor do tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, PD1: Programmed cell death protein 1, CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, TGF- β : Transforming growth factor beta, GITR: glucocorticoid-induced TNFR family related gene, LAG-3: Lymphocyte-activation gene 3, IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase. Estruturas de IL2 e IFN- γ foram retiradas do banco de dados de proteína (PDB)

1.6 Células T regulatórias protagonistas da homeostase imune

“O sistema imunológico evoluiu para montar uma defesa efetiva contra agentes patogênicos, para minimizar a inflamação mediada por microrganismos comensais, para montar respostas imunes contra antígenos próprios ou exógenos e solucionar distúrbios inflamatórios metabólicos. A supressão mediada pelas células T Reguladoras (Treg) é um mecanismo vital de regulação negativa do sistema imune”

-Josefowicz et al.

Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function, 2012 (158)

Em 1982 Sakaguchi, Takahashi e Nishizuka observaram que camundongos timectomizados entre 2 ou 4 dias depois de nascer apresentam uma série de doenças autoimunes mediadas por células T (159). Experimentos com linhagens demonstraram que o timo é o responsável pela tolerância aos transplantes, quando os pesquisadores, além de transplantar uma extremidade, transplantavam também epitélio do timo em embriões timectomizados conseguindo uma tolerância ao transplante da extremidade (160). Esses mesmos resultados foram observados em camundongos com transplantes de pele, sendo essa tolerância dependente de células CD4 (161). Em 1995, Sakaguchi caracterizou a população responsável pela tolerância como sendo células T CD4 que caracterizam-se pela expressão da cadeia alfa do receptor da Interleucina-2 (também chamada de CD25) (162). Um ano depois, ao depletar as células usando um anticorpo anti-CD25 determinaram que existe uma população de células produzidas depois do terceiro dia de vida que podem prevenir a autoimunidade e induzir tolerância chamando-as de células T supressoras (163). Porém já se sabia dessa população que o marcador CD25 não era suficiente para obter muita informação pelo fato de ser expresso também em células CD4 ativadas. Precisava-se de um marcador específico de células T regulatórias.

1.7 Células T regulatórias e câncer, as cúmplices?

“Com todos os dias, e de ambos os lados da minha inteligência, moral e intelectual, eu me aproximava cada vez mais da verdade, por cuja descoberta parcial eu fui condenado a um naufrágio tão terrível: esse homem não é verdadeiramente um, mas verdadeiramente dois”

-Robert Louis Stevenson

O caso estranho do Dr. Jekyll e do Sr. Hyde, 1886

A infiltração de linfócitos no tumor é um indicio de ação da resposta imune, pois células T podem ser atraídas para o sítio tumoral mediando sua eliminação.

Apesar disso, células T regulatórias também podem ser atraídas para o sítio tumoral, sendo que um enriquecimento desta população imunossupressora têm sido associado a um prognóstico pouco favorável em casos clínicos de câncer, como carcinoma hepatocelular (164), adenocarcinoma ductal pancreático (165), câncer gástrico (164,166), câncer de mama (167–169), de tireoide (170), de ovário (171), de próstata (172), entre outros (173). Apesar disso, alguns estudos descritos na literatura sugerem dados controversos, em que a infiltração de células com fenótipo de Treg estaria associada a um prognóstico favorável em câncer colorectal (174,175) contudo, outros estudos relacionados apresentam conclusões antagônicas (176,177). Este cenário foi investigado no trabalho descrito por Saito *et al* (178), em que os autores demonstram que neste tipo de câncer existe uma infiltração de células que expressam instavelmente *Foxp3* (nomeadas como FOXP3^{lo}), que carecem da expressão do CD45RA e que têm uma expressão pouco estável de *Foxp3* sem características imunossupressoras. Essas células estavam em alto número em alguns pacientes e favoreceram a inflamação ao secretar citocinas pro-inflamatórias o que pode estar associado a uma melhor resposta antitumoral.

Baseados nos dados de correlação do prognóstico desfavorável com a infiltração de células Treg, a inibição de células Treg em câncer é uma alternativa interessante para melhorar a resposta imune antitumoral.

As primeiras tentativas de depleção de Treg foram realizadas por o grupo de Shimon Sakaguchi, usando o anticorpo anti-CD25 (179). Neste trabalho eles observaram que com uma aplicação única já era possível observar regressão de diferentes tipos de tumores singênicos (leucemias, sarcomas e mielomas) sugerindo que células CD4+CD25+ immunoreguladoras (Treg) estavam envolvidas no crescimento desses tumores. Uma observação interessante deste trabalho foi que se o anticorpo era administrado após o segundo dia da inoculação do tumor, o efeito antitumoral da regressão já não era mais observado sugerindo um efeito de depleção nas células ativadas CD4+CD25+ que não eram reguladoras e estavam envolvidas na resposta antitumoral. Em outro trabalho do mesmo grupo foi mostrado que a transferência de uma suspensão de células onde as Treg eram depletadas *in vitro*, e logo eram transferidas a

camundongos imunocomprometidos promovia respostas antitumorais, porém potencializava a autoimunidade (180).

Outra forma de inibir as Treg infiltradas em tumores é através do bloqueio do receptor da quimiocina CCR4, a qual é expressa por Treg e Th2, enquanto seus ligantes são expressos em macrófagos e células tumorais. O grupo de Sakaguchi usou um anticorpo monoclonal anti-CCR4 que mostrou resultados similares aos induzidos pelo anti-CD25 promovendo uma resposta antitumoral pronunciada *in vitro* e *in vivo* com indução da atividade de CD4 e CD8 (181).

O fato das Treg expressarem constitutivamente CTLA-4, faz com que as terapias atuais que utilizam o anti-CTLA-4 tenham um efeito inibitório nessa população imunossupressora e atuando em sinergia ao bloqueio de mecanismos antagônicos a ativação de células T efetoras, constituindo-se portanto como uma das principais razões do sucesso desta terapia (182).

A administração do agente alquilante ciclofosfamida em altas doses (200mg/kg) é usado como um quimioterapêutico que interfere com a replicação do DNA de células em proliferação (todas as células)(183), mas em baixas doses (20mg/kg) foi observada uma diminuição específica de células T regulatórias (184–186). Atualmente a ciclofosfamida é usada no tratamento para câncer concomitantemente com outros quimioterapêuticos ou radioterapia. Mas por ser um agente alquilante, pode apresentar efeitos adversos, como a indução de citotoxicidade que afeta o pulmão, coração e bexiga (187), sendo que por essa razão deve manter-se uma estrita avaliação clínica dos pacientes sob terapia com ciclofosfamida.

1.8 FOXP3, o regulador das reguladoras

“Foram 65 anos desde que a mutação “scurfy” surgiu em camundongos no Laboratório Nacional de Oak Ridge nos Estados Unidos, e são 13 anos desde que foi relatada a clonagem molecular do gene do Foxp3. Esses eventos impulsionaram e continuaram a conduzir o extenso esforço de pesquisa para

entender completamente o papel das células T reguladoras no sistema imunológico.”

Ramsdell et al.

FOXP3 and scurfy: how it all began, 2014 (188)

Em 1949, no Laboratório de Genética de Mamíferos do Laboratório Nacional Oak Ridge, realizou-se um experimento para explorar os efeitos da radiação ionizante em camundongos. Neste experimento foi gerada a conhecida linhagem "*scurfy*", na qual foi relatada a primeira doença ligada ao X em camundongos causada por uma mutação recessiva letal, caracterizada por uma doença autoimune pronunciada (188). Em 2001, após o mapeamento e o sequenciamento, descobriu-se que o gene mutado nos camundongos *scurfy* era *Foxp3* (nome dado por ser parte da família de fatores transcricionais *forkhead / winged-helix* (189).

O gene *Foxp3* está localizado no braço curto do cromossomo X, possui 11 exons e codifica uma proteína de 431 aminoácidos. Essa proteína possui quatro domínios funcionais: um domínio FKH que permite a ligação do DNA e a localização nuclear; um domínio zíper de Leucina (*leucine zipper*) que é crucial para a dimerização; um domínio repressor comprometido na repressão da transcrição de vários genes; e um domínio de dedo de zinco (zinc finger) que está envolvido na repressão, mas não é indispensável (190). O mesmo fenótipo observado nos camundongos era observado nos humanos com a síndrome de desregulação autoimune, poliendocrinopatia, e enteropatia, relacionadas ao cromossomo X (IPEX) os quais, também carregam uma mutação no cromossomo X (191). *Lahl et al.* geraram um camundongo transgênico chamado de "DEREG" (DEpletion of REGulatory T cell) que expressa o receptor da toxina da difteria controlado pela expressão de GFP e FOXP3. Assim, era possível ter uma depleção das Treg após a administração da toxina. Camundongos DEREG neonatos após da administração da toxina desenvolveram os mesmos sintomas dos "*scurfy*" mostrando outra prova de que a ausência destas células é a responsável pela doença (192). Outra demonstração da importância do FOXP3 veio de transdução de células CD4 com um retrovírus que continha o cassete de

expressão do *Foxp3* conferindo o fenótipo imunossupressor as células transduzidas, geradas *in vitro*, com a capacidade de controlar desordens autoimunes como dermatite (193).

Com base nessas observações, grupos envolvidos no estudo das células supressoras verificaram que havia expressão do gene FoxP3 em células CD4+CD25+, concluindo-se que somente as células CD4+CD25+FOXP3+ cumpriam funções supressoras e que o FOXP3 é indispensável para esse fenótipo, caracterizando-se a células T regulatórias (194–197).

O FOXP3 é um fator de transcrição que atua como ativador e repressor de genes. Com aproximadamente 2800 sítios de união é capaz de unir-se a mais de 700 genes em células Treg (198,199) e aproveitando os *enhancers* que ficam disponíveis depois da ativação pelo TCR estabelece uma série de modificações epigenéticas que levam ao fenótipo imunossupressor das Treg (200).

Existem duas populações de células T regulatórias: as naturais ou derivadas do timo (tTreg) e as induzidas na periferia (pTreg). A população que é gerada *in vitro* no laboratório, difere dessas duas e se conhece como células Treg induzidas (iTreg) (201). Todas caracterizam-se pela expressão do *Foxp3* e possuem características imunossupressoras, mas é a estabilidade da expressão do *Foxp3*, a ativação pelo TCR e o lugar no qual são encontradas o que caracteriza as populações. A expressão do *Foxp3* fora do timo está condicionada a vários fatores como a ativação pelo TCR e a presença de IL2, TGF- β e Ácido retinóico (202). Usando esses três fatores é possível induzir célula Treg após ativação, porém é necessária uma sinalização constante do TGFB para conseguir um efeito duradouro. As Treg podem suprimir CD4+, CD8+, células natural killer (NK), linfócitos B, células dendríticas e mastócitos. Os mecanismos moleculares de supressão incluem: secreção de citocinas supressoras, como a interleucina IL10, IL35 e TGF- β , citólise mediada pela granzima-B, expressão de moléculas de superfície celular como galectina-1, LAG-3, CD39, e Nrp1 (203–205). As Treg são totalmente dependentes de IL2 produzido por células efectoras, já que FOXP3 se une a AML1 e NFAT, os fatores de transcrição indispensáveis para a transcrição de IL2 (190,206), ao possuir o receptor de alta afinidade da IL2 as Treg consomem a IL2 necessária para as T

efetoras proliferar (207). A expressão de CTLA-4 tem uma alta afinidade, maior do que o CD28, pelos ligantes CD80 e CD86 em APC, regulando negativamente estas células (208).

As Treg também estão envolvidas em vários processos imunes relacionados à homeostasia, inflamação e infecção, onde inibem a resposta efetora uma vez que o perigo foi controlado. Um fato que demonstra a plasticidade e especificidade das Treg é o mecanismo pelo qual conseguem identificar as células alvo e migrar para o lugar onde é necessário a ação. Após ativação pelo TCR, que é um evento indispensável na função das Treg (209), e com a finalidade de controlar respostas mediadas por células efetoras Th1, Th2, Th17 ou Tfh, as Treg expressam além do *Foxp3*, T-bet, IRF4, STAT3 e Bcl-6, junto com quimiocinas específicas para cada população (210,211). No entanto, às vezes, as células Treg podem inibir, indesejadamente, a resposta efetora como ocorre no caso do câncer, onde essa resposta supressora precoce pode favorecer a progressão tumoral. Por outro lado, sem uma eliminação oportuna de células efetoras por Treg, as células efetoras podem iniciar processos de autoimunidade.

1.8.1 A regulação do regulador

“Regular do Latin regulatus, início de uso 15aC., definição: "ajustar por regra, controle", "regra, peça de madeira reta", "liderar, dominar", "governar por restrição”

-Online Etymology Dictionary (212)

O fator de transcrição FOXP3 determina o fenótipo imunossupressor em Treg, sendo que a inibição deste fator pode inativar o fenótipo imunossupressor (213) e a expressão de *Foxp3* exógeno induz o fenótipo imunossupressor (214). A expressão de *Foxp3* também pode ser induzida na presença de fatores como TGF- β (215), ou mesmo por agentes que modulem alterações epigenéticas

como inibidores de metiltransferasas (216). A regulação de *Foxp3* está associada a mecanismos moleculares conforme descreveremos a seguir:

- a. *Regulação por fatores transcripcionais derivados de citocinas e ativação do TCR*: Análise bioquímica e de espectrometria de massas revelou que FOXP3 forma complexos de 400-800 kDa com 361 proteínas associadas das quais 30% são fatores de transcrição, gerando evidencia de uma rede de regulação que controla as Treg (217). Fatores relacionados aos sinais indispensáveis para a função das Treg ativam fatores de transcrição que vão se ligar diretamente ao promotor e *enhancers* do *Foxp3*. Assim a ativação pelo TCR, ativa as vias dos fatores de transcrição NFAT, AP1, e junto com FOXO e o elemento responsivo a cAMP (CREB), complexam-se na região do promotor do *Foxp3* e ativam a transcrição. A ligação do CD25 com a IL2 libera STAT5 que se unirá ao *enhancer* chamado de CNS2 e a união do TGF-B com seu receptor ao igual que o sinal pelo ácido retinóico, liberaram SMAD3 que se liga ao *enhancer* CNS1 (218–223). *Foxp3* possui várias regiões de *enhancers* que são indispensáveis para sua expressão. Nessas regiões se ligam fatores como REL, ATF1, CREB, RUNX1, ETS1, STAT5, SMAD3 e o mesmo FOXP3 o que faz com que o FOXP3 se autorregule. Também o FOXP3 possui cofatores: EOS, IRF4, SATB1 e GATA que exercem um papel protagonista na orquestração do programa das Treg (224). O FOXP3 forma dímeros e seu principal parceiro funcional é o fator NFAT, como foi demonstrado por meio de cristalografia (225).
- b. *Mecanismos epigenéticos*: experimentos com CHIP mostraram que a expressão de genes induzidos em células T regulatórias como CD25, CTLA4, GITR e FOXP3 apresentam uma alta incidência de metilação na histona 3 e na lisina 4 H3K4me3 e uma baixa metilação nos sítios CpGs, características associadas com regiões altamente expressas. Enquanto genes como IL2 e IFN- γ apresentam uma perda na acetilação da Histona 3 junto com metilação de DNA. O padrão de hipometilação desses genes é estável e pode inclusive ser considerado como um biomarcador da população de Treg. É interessante ressaltar que o FOXP3 forma

complexos com proteínas que facilitam modificações epigenéticas (211,226,227). Mas o próprio *Foxp3* é também regulado por esses mecanismos, apresentando regiões de desmetilação específicas e zonas com marcada acumulação de desacetilases, fazendo com que o FOXP3 seja regulado e regule via mecanismos epigenéticos (228–231). A prova disso foi quando demonstrou-se que em camundongos *knockout* para a *Dnmt1*, uma enzima que se encarrega de metilar regiões novas, só o sinal do TCR era suficiente para ativar transcricionalmente o *Foxp3* (232).

- c. *Modificações pós-transcricionais*: dentre as mais importantes podemos citar a acetilação de lisinas, com uma função especialmente estabilizadora da proteína e que permite acesso mais fácil à cromatina, a ubiquitinação da lisina 48 que nivela os níveis da expressão de proteína em relação a estímulos externos, levando a degradação pelo proteassoma e a deubiquitinação que tem o efeito contrário, aumentando os níveis da proteína e, finalmente, a fosforilação no C terminal que leva a um aumento na afinidade para ligação ao DNA (233). De fato, um estudo reportou que a inibição da *DUB ubiquitin-specific peptidase 7*, USP7 inibia FOXP3 e diminuía a ação imunossupressora das Treg (234).

Na figura 2 observam-se as principais características da indução do *Foxp3* via fatores de transcrição, os produtos de proteínas derivados da ativação do FOXP3 e a estrutura da proteína em união com o DNA.

O fator de transcrição FOXP3 é considerado uma chave mestra na regulação do fenótipo imunossupressor de Treg. A hipótese central deste trabalho consiste em produzir o silenciamento específico de *Foxp3*, com o objetivo de inibir seletivamente células Treg, sem comprometer a funcionalidade de células T efectoras.

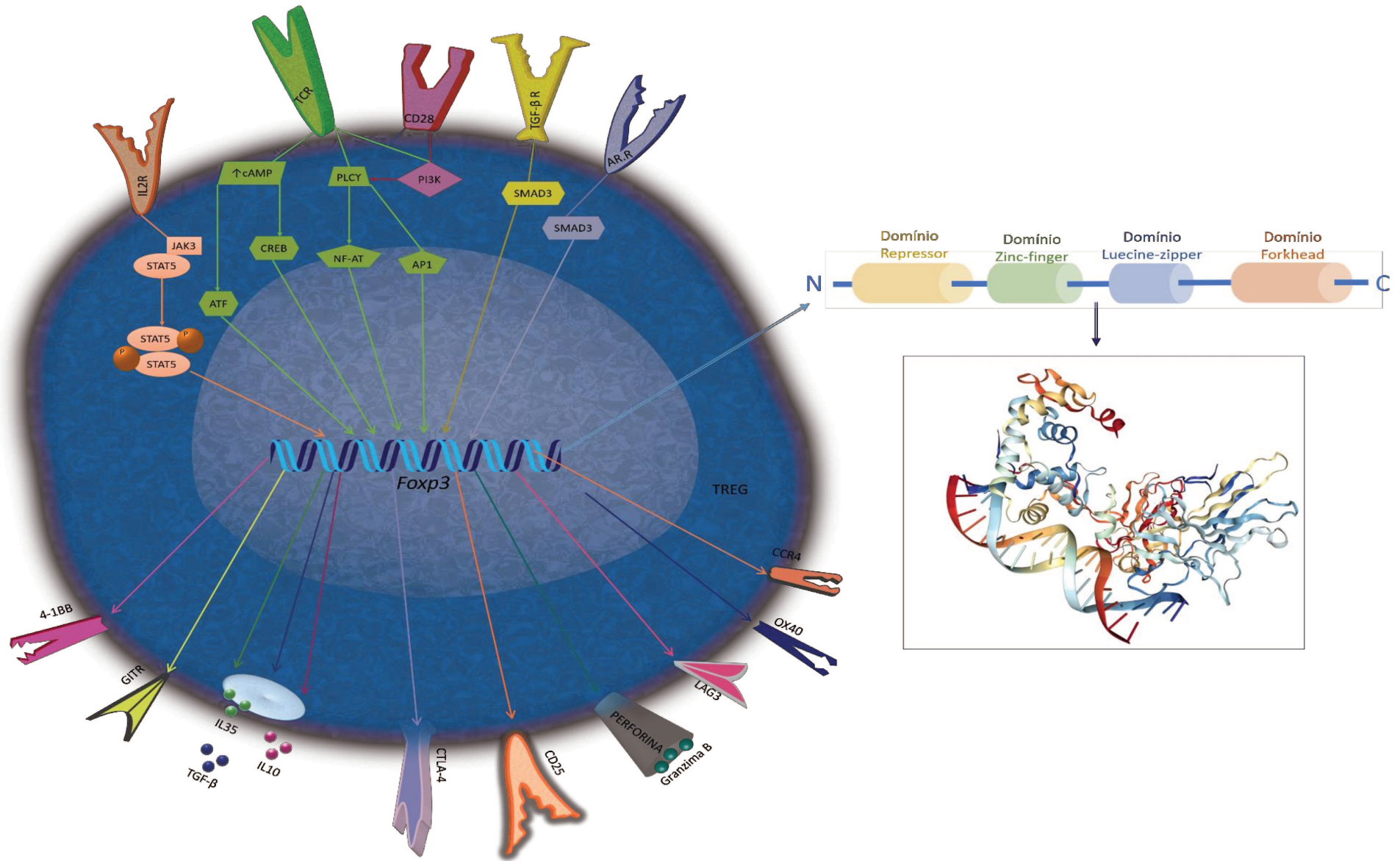


Figura 2 Indução do gene *Foxp3* por via de fatores de transcrição através do ambiente imunológico. A indução e estabilidade da transcrição do *Foxp3* depende de vários sinais que devem ser transmitidos concomitantemente como a apresentação antigênica via TCR e o sinal de coestimulação de CD28, além de sinais via citocinas como IL2 e fatores como TGF- β e ácido retinóico. Estes sinais ativam os fatores de transcrição necessários para iniciar a transcrição do gene. As primeiras sinais de estimulação são produzidas pelo TCR e o CD28, estes ativaram via AMP cíclico o CREB, ATF, NF-AT e AP1. O receptor da IL2 via JAK quinase ativa STAT5, em quanto o TGF β - e o ácido retinoico ativam diretamente SMAD3. A expressão do *Foxp3* regula genes positiva e negativamente para manter o fenótipo imunossupressor das células. Dentro das proteínas reguladas positivamente encontram-se o CD25, que permitirá a absorção de IL2 as interleucinas IL10 e 1L35 que suprimem respostas inflamatórias, o TGF- β que pode converter mais células efectoras em Treg, o CTLA-4 que está relacionado com a inibição das células apresentadoras de antígenos o GITR que influencia a proliferação de Treg e o LAG-3 que potencializa a imunossupressão. O gene *Foxp3* codifica uma proteína de 431 aminoácidos que possui 4 domínios, um domínio FKH que permite a ligação do DNA e a localização nuclear; um domínio zíper de Leucina (*leucine zíper*) que é crucial para a dimerização; um domínio repressor comprometido na repressão da transcrição de vários genes; e um domínio de dedo de zinco (zinc finger) que está envolvido na repressão. Uma estrutura cristalográfica do FOXP3 mostra a união em dímero ao promotor do CD25 (225). CTLA- 4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 , TGF- β : Transforming growth factor beta , GITR: glucocorticoid-induced TNFR family related gene, LAG-3: Lymphocyte-activation gene 3, CREB: cAMP-responsive-element-binding protein, NFAT: Nuclear activating transcription factor, AP1: activator protein 1, SMAD3: mothers against decapentaplegic homologue 3, STAT5: signal transducer and activator of transcription 5, JAK: Janus kinase, PLC γ , phospholipase C γ .

1.9 Silenciamento transcricional

“Porque todo o furor sobre DNA e as proteínas? Eles são simplesmente os serventes que permitiram que o RNA fizesse seu caminho neste planeta”

- James Darnell

RNA: Life's Indispensable Molecule, 2011(235)

Em 1998 foi descrito o RNA de interferência como ferramenta para manipular a expressão gênica em *Caenorhabditis elegans* (236). Oito anos depois, dois dos autores deste artigo foram homenageados com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina por "descobriram um mecanismo fundamental para controlar o fluxo de informações genéticas" (237). Esta importante ferramenta foi amplamente utilizada para entender a função de diferentes genes e até mesmo usada como opção terapêutica para várias doenças (238).

O silenciamento da transcrição usando RNA pode ser conseguido de duas maneiras, transcricional e pós-transcricional. O silenciamento de genes pós-transcricional (PTGS) é o mais frequentemente usado e consiste na inibição do mRNA alvo por união com pequenos fragmentos de um RNA de cadeia dupla, denominado RNA de interferência pequeno (siRNA). Neste processo, o siRNA de cadeia dupla é clivado pela DICER e, em seguida, uma das fitas do dúplice é carregada no complexo de ribonucleoproteína conhecido como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), ligando-se ao mRNA alvo que será inibido (239).

O silenciamento gênico transcricional (TGS) é baseado na complementaridade entre RNA e DNA, induzindo alterações epigenéticas que resultam em silenciamento gênico (240). Estas modificações epigenéticas são baseadas na metilação de DNA e modificação de histonas para um estado menos acessível (241,242).

Este efeito pode ser conseguido por ao menos dois tipos de RNAi:

shRNA (do inglês short hairpin RNA) e sasRNA (do inglês small antisense RNA). Conforme trabalhos da literatura, esses RNAs de interferência podem induzir complexos de silenciamento epigenéticos para atingir eventualmente qualquer *loci* em células humanas e, portanto, modular a transcrição de genes alvo induzindo metilação sempre que o alvo seja o promotor (243–246).

Outro mecanismo que pode ser usado é o de silenciamento transcricional direto por siRNA (RdT) aqui chamado de sistema de interferência da transcrição tiRNA (247), que é complementar à região de início da transcrição o que bloqueará a união da polimerase com a cadeia de DNA (248,249). Na Figura 1 é possível ver as diferenças principais entre as estratégias TGS que serão usadas neste trabalho.

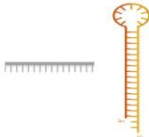
	ESTRUTURA	DESENHO	CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES PARA O FUNCIONAMENTO
shRNA 21-29 bp	 Short-hairpin	São desenhados como os shRNA para silenciamento post-transcricional mas a sequência alvo é o promotor e não o RNAm.	▪ Comprimento ▪ Presença de sobreposição ▪ Estabilidade do fim do duplex ▪ Termodinâmica ▪ Conteúdo de GC
sasRNA 17-20 bp	 Fita simples	São complementares à sequência antisenso da fita de DNA que codifica o promotor.	• Cadeia de purinas de 4 a 12 pb na região visando a sequência do promotor • Conteúdo de GC • Comprimento
tiRNA		São complementares à sequência equivalente ao sítio de início da transcrição	Complemento específico do TSS (Dependendo da classe, os mesmos requerimentos para shRNA ou sasRNA)

Figura 3: Diferentes tipos de RNA para indução de TGS. Descrição das principais características de cada um dos RNAs que podem ser usados para TGS

1.10 Sistema CRISPR / CAS para edição de genes e supressão da expressão de *Foxp3*

“O sistema CRISPR-Cas defende procariotos contra bacteriófagos e elementos genéticos móveis, servindo como a base da revolução de ferramentas para a engenharia genética.”

-Murugan et al.

The Revolution Continues: Newly Discovered Systems Expand the CRISPR-Cas Toolkit, 2017

Além do RNAi, outra forma de inibir a expressão gênica pode ser feita com o sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated*). Esta estratégia causaria uma deleção direta no genoma e também consideramos uma alternativa interessante para inibir a expressão do FOXP3. Originalmente, o sistema CRISPR/CAS existe em bactérias e atua na defesa de infecções virais. A caspase 9 associada ao CRISPR (Cas9) medeia a edição genômica específica da sequência alvo e funciona naturalmente como o sistema imunológico das bactérias e algumas Archaeas (250). Cas9 é uma nuclease guiada por RNA que reconhece seu DNA

alvo por complementaridade, com aproximadamente 20 nucleotídeos (nt), entre um único RNA guia (sgRNA) e sua cadeia de DNA. Cas9 também interage com o motivo adjacente ao *protospacer* (PAM) do seu alvo de DNA através do seu domínio de interação PAM (PI) em seu extremo terminal C. Cas9 corta o DNA de cadeia dupla, criando uma ruptura de dupla cadeia que desencadeia o reparo do DNA através de mecanismos celulares intrínsecos, como a junção final não homóloga (NHEJ) ou o reparo direcionado por homologia (HDR). Esses sistemas de reparo resultam em inserções ou deleções (INDELS) na sequência, gerando um códon de parada ou uma mudança no quadro de leitura (251,252). Uma das principais vantagens deste sistema é que proporciona uma inibição de genes a longo prazo, é eficiente, e produzirá INDELS que permanecerão nas próximas gerações de células.

Além de ser uma plataforma versátil que permite modificar o genoma, é possível também manipulá-lo e visualizá-lo usando modificações específicas da CAS9 (251). Recentemente o grupo do Feng Zhang no MIT (253) desenvolveu uma estratégia chamada de REPAIR (*RNA Editing for Programmable A to I Replacement*) que permite modificar especificamente as bases do RNA. Esta ferramenta junto com o fato de poder editar bases especificamente de A•T para G•C sem fazer cortes no DNA (254) permite prever o uso de múltiplas opções terapêuticas usando o sistema CRISPR/CAS. Esta estratégia de edição foi testada nesse trabalho para avaliar seu potencial de inibição de *Foxp3*.

Como se observa na figura 4, nós usamos quatro mecanismos para inibir transcripcionalmente *Foxp3*, três deles dependem de RNAi dirigidos contra o promotor ou o enhancer (Figura 4A) e o outro depende do complexo entre o sgRNA e a caspase 9 (Figura 4B). Os mecanismos de ação propostos para os RNAs e o TGS ainda precisam de mais exploração para definir com certeza todas as proteínas envolvidas.

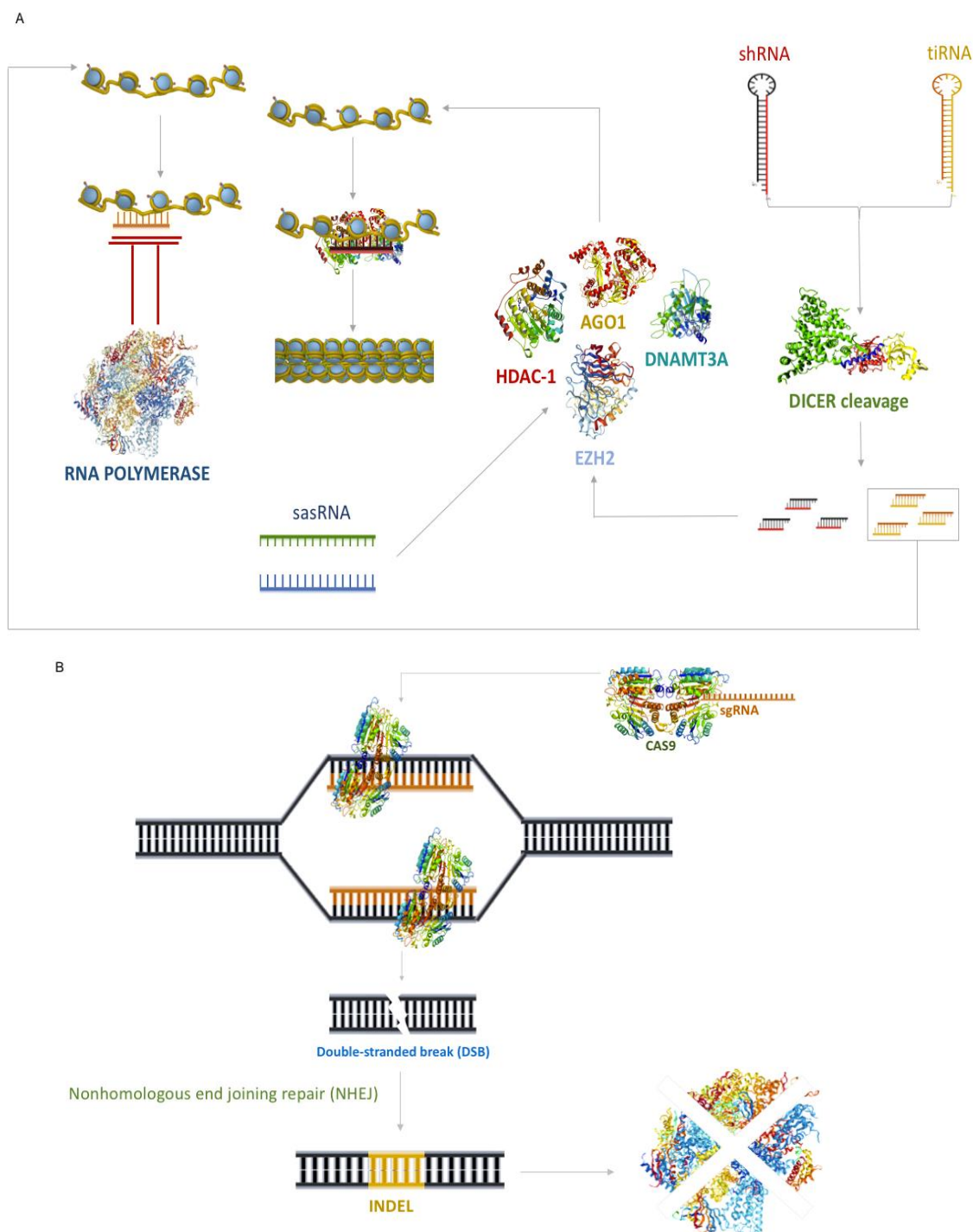


Figura 4 Mecanismos utilizados para a inibição de Foxp3. (A) sistema dependente de RNAi; estamos usando três sistemas de RNA, shRNA, sasRNA e tiRNA. Cada um desses sistemas difere do alvo e da forma como eles são desenhados. Esses RNAs têm três mecanismos possíveis de ação, um consiste na ligação direta ao DNA depois de ter sido clivado pelo DICER, esta estrutura de DNA-RNA recrutaria metiltransferases de DNA (DNMT) e os modificadores de histonas como HDAC para o site alvo, os outros mecanismos possíveis são onde eles se associam diretamente com AGO1, DNMT3A, EZH2 e HDAC-1 formando um complexo que vai diretamente para o alvo e modifica a cromatina com metilação e desacetilação de DNA de histonas (255). O tiRNA pode bloquear o acesso da RNA polimerase ao DNA. (B) sistema CRISPR / CAS, onde um sgRNA está associado com a Cas9, direcionando a enzima para um alvo e gerando rupturas de cadeia dupla (DSB) que ativam os caminhos de reparo de junção final não-homogênea (NHEJ). O NHEJ provoca inserções ou deleções aleatórias (INDELs) em seu site alvo produzindo um códon de parada ou uma mudança no quadro de leitura (251). Estruturas foram retiradas do banco de dados de proteína (PDB)

1.11 Sistemas de entrega de candidatos para TGS que podem ser usados *in vitro* e *in vivo*

"Veículos do latim vehiculum "um meio através do qual uma droga ou medicamento é administrado", também "qualquer meio de transporte ou transmissão", "para carregar, transportar, transmitir,"

-Online Etymology Dictionary

Devido a seu tamanho e carga negativa, os candidatos de RNAi para TGS necessitam de um sistema de veiculação. Neste trabalho exploramos duas estratégias para transferência do RNAi às células alvo, baseadas em vetores lentivirais e também em aptâmeros de RNA. Ambas estratégias já têm sido usadas na clínica para Terapia gênica.

1.11.1 Vetores virais

"Os vírus são naturalmente muito eficientes na transdução de sua própria informação genética em células hospedeiras visando sua própria replicação. Ao substituir genes virais não essenciais com genes estrangeiros de interesse terapêutico, os vetores virais recombinantes podem ser usados para transduzir o tipo de célula que eles normalmente infectariam com essa mesma alta eficiência"

-Bouard et al

Viral vectors: from virology to transgene expression, 2009 (256)

Os vetores usados neste trabalho são partículas recombinantes lentivirais. O gênero lentivírus pertence à família *Retroviridae*, que se caracteriza por apresentar o genoma de RNA fita simples e integrar-se no genoma através da ação da transcriptase reversa. Os vetores lentivirais são derivados do HIV, e para o aprimoramento de biosegurança, em sistemas de terceira geração foram eliminadas sequências associadas a replicação e patogenicidade viral, tais como vif,

vpr, vpu e nef (257). O genoma lentiviral apresenta alta plasticidade, possibilitando-se alterar regiões promotoras e inserindo-se cassetes de expressão de interesse (258–260). Dentre as principais vantagens do vetor lentiviral, podemos destacar: (i) expressão estável do produto gênico através de integração no genoma; (ii) capacidade de infecção de células em qualquer estado de divisão; (iii) poder de inserir grandes sequências no genoma e (iv) sua produção é rápida e barata. Contudo, dados da literatura indicam que vetores retrovirais podem apresentar riscos de mutagênese insercional, em função de sua integração aleatória no genoma de células-alvo (261,262), sendo que essa possibilidade é mais reduzida para vetores lentivirais (263).

Além da alteração de regiões promotoras e cassetes de expressão, o envelope de uma partícula retroviral também pode ser modificado para dirigir o tropismo viral para um tecido específico (264–267). Neste trabalho nós testamos a eficiência de diferentes envelopes para transduzir células CD4 primárias.

Um dos mais populares envelopes para vetores retrovirais é o revestido com VSV-G (*vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G*) esse envelope foi um dos primeiros a serem usados (268), caracteriza-se por uma alta estabilidade que permite ultra centrifugá-lo para obter altos títulos e um amplo tropismo, incluindo-se células de mamíferos e peixes (269). O envelope VSVG pode apresentar toxicidade quando o vírus é administrado em altos títulos (270). Para restringir o tropismo viral e aumentar o nível de segurança, utilizamos o envelope murino ecotrópico, que apresenta títulos, na ordem dos títulos obtidos com VSVG, mas em contraste, não apresenta toxicidade e seu tropismo é exclusivo para células murinas (266).

Os vetores lentivirais são ferramentas de transferência gênica extremamente versáteis para a modificação de células. Inicialmente os trabalhos com retrovírus apresentaram desafios que deviam ser superados em ordem de estabelecer a terapia gênica com uma alternativa terapêutica segura. O caso que chamou mais a atenção foi um ensaio clínico com 10 pacientes que sofriam de imunodeficiência severa ligada ao cromossomo X (271). Neste ensaio 9 dos 10 pacientes mostraram recuperação após da transdução com um vetor retroviral que fazia a transferência genica do CD34 nas células da medula óssea. Porém, após três anos da terapia, dois dos pacientes apresentaram proliferação clonal

de células T, culminando em leucemia. Os dois pacientes foram submetidos a extensivos estudos que mostraram a integração do genoma do vector nas proximidades do promotor do *proto-oncogene* LMO2, o que sugeriu a ativação da proliferação celular descontrolada e indução do quadro leucêmico. É interessante observar que os vetores retrovirais utilizados neste trabalho eram derivados de retrovírus murino de primeira geração e apresentavam o LTR viral intacto. Além disso, o transgene codificado no vírus também conferia uma vantagem proliferativa. Somando-se estes aspectos à possibilidade de mutagênese insercional, verificou-se a necessidade de desenvolver vetores mais seguros para terapia gênica, sendo necessário estudar-se o vetor, sequências promotoras e cassetes de expressão, com alvo de aprimorar sua biossegurança (271–276). Inicialmente, vetores retrovirais foram os mais usados em imunoterapia para câncer. Em 1990 o grupo de Stephen Rosenberg foi o primeiro em usar esta ferramenta (277). Neste trabalho linfócitos infiltrados em tumores de melanoma eram transduzidos *ex-vivo* com vetores retrovirais que induziam a expressão do gene da IL2 e o *cassette* de resistência para neomicina. Após a seleção dos linfócitos, usando G418 (análogo de neomicina) os linfócitos eram injetados nos pacientes. O protocolo mostrou um efeito antitumoral sem toxicidades associadas.

Em função de sua alta eficiência e estabilidade, vetores lentivirais têm sido utilizados para a engenharia de linfócitos T. Esses vetores podem codificar TCR ou CARs (receptores antigênicos quiméricos) e utilizados para a produção de células T autólogas engenheiradas *ex vivo*. Esses CARs são compostos de um ou dois domínios coestimuladores intracelulares que podem ser 4-1BB e CD28, e um domínio extracelular que é o receptor (TCR) específico para um antígeno tumoral. Em ensaios clínicos foram testados CARs contra o antígeno CD19, altamente expresso em células de leucemia de linfócitos B. Em resumo, o protocolo consiste em isolar células T do paciente, transduzi-las usando vetores lentivirais, expandi-las e injetá-las de volta no paciente. Essas células serão capazes de reconhecer e destruir células de leucemias expressando CD19. Os ensaios clínicos usando o CAR19 mostraram excelentes resultados, com mais de 85% dos pacientes com respostas completas contra as células de leucemia. Porém não é um protocolo simples, pois apresentou problemas derivados da

síndrome de liberação de citocinas. Nele as células reinseridas liberavam altas quantidades de citocinas e os pacientes precisavam de atenção clínica, sendo que alguns pacientes apresentaram edema cerebral o qual foi derivado do uso da combinação com quimioterápicos (67,278). Tendo em vista o sucesso dos resultados clínicos, foi aprovado recentemente pela FDA um medicamento biológico baseado em engenharia de células T com o CAR-CD19, denominado de *YESCARTA* (279), sendo a primeira terapia deste tipo aprovada para tratamento de câncer e abrindo uma porta para o uso de CAR-Tcells contra outros tipos de tumores.

1.11.2 Aptâmeros, o futuro?

“Considerando que os aptâmeros demonstraram unir-se a alvos com afinidades e especificidades semelhantes às dos anticorpos, os aptâmeros têm várias vantagens que podem superar a tecnologia de anticorpos e abrir novas oportunidades para melhores soluções médicas e de diagnóstico”

-Rozenblum et al.

Aptamers: current challenges and future prospects, 2016 (280)

Apesar da grande eficácia dos sistemas de transferência gênica lentivirais, existem outros sistemas não virais que podem apresentar um maior nível de segurança para viabilizar uma futura aplicação clínica. Neste trabalho, desenvolvemos aptâmeros quiméricos de RNA para veiculação de moléculas de RNAi por meio da ligação e internalização dos aptâmeros com receptores de superfície nas células alvo.

Os Aptâmeros são fitas de ácidos nucleicos que possuem uma estrutura e conformação tridimensional. De forma similar aos anticorpos, podem unir-se a proteínas com alta afinidade (281) e por isso podem ser chamados de anticorpos sintéticos. Em comparação aos anticorpos, apresentam diversas vantagens como seu menor tamanho, estrutura flexível, produção rápida, versatilidade para modificações químicas, alta estabilidade e baixa imunogenicidade, além do fato

de serem internalizados e permitir a veiculação de outras moléculas de interesse como RNAs interferentes (280,282,283). Em função das características moleculares dos aptâmeros, que em contraste aos anticorpos, são constituídos de ácidos nucleicos, é possível reverter seu efeito de ligação ao alvo usando um “antídoto”: um óligo complementar que inativa o aptâmero efetor impedindo sua ligação ao alvo. Com isso, é possível evitar efeitos secundários gerados depois do que aptâmero efetor tenha concluído sua função. Dados da literatura já mencionam o desenvolvimento de antídotos universais que permitem inativar vários tipos de aptâmero com a mesma molécula e evitar respostas imunes indesejadas (284).

O desenvolvimento dos aptâmeros é recente e começa em 1988 quando Feng e Holland mostraram que o RNA TAR interage e modula, em um *loop*, a proteína TAT, controlando a replicação do HIV (285). Sendo uma das primeiras evidências de que ácidos nucleicos podem interagir com proteínas e modular a sua função. No dia três de agosto de 1990 Tuerk and Gold publicaram o primeiro trabalho de seleção de ácidos nucleicos de alta afinidade, nesse caso contra a T4 DNA polimerase. O estudo foi publicado na revista *Science* (286). Vinte e sete dias após, na revista *Nature*, foi publicado o artigo de Ellington e Szostak com uma descrição similar da mesma estratégia, que depois seria conhecida como evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (*SELEX*). Eles mostraram a seleção de ligantes de RNAs com alta afinidade por corantes orgânicos e cunharam a palavra Aptâmero proveniente do latim “*aptus*” por adequado (287) e o grego “*meros*” por região. Vinte e sete anos depois, temos um aptâmero aprovado pela FDA para tratar a degeneração macular e múltiplos ensaios clínicos em desenvolvimento com estas ferramentas.

Além da sua especificidade, o fato de que os aptâmeros são internalizados faz deles o veículo perfeito para conjugar RNAi (288). Já existem trabalhos mostrando entrega de RNAi acoplado a aptâmeros usando principalmente dois aptâmeros: o PSMA e o gp120, um para câncer e o outro para HIV.

O grupo do Dr. John Rossi, City of Hope, desenvolveu vários aptâmeros contra a proteína viral gp120 (289), e descreveu também o uso de uma “ponte” para unir os siRNAs aos aptâmeros. Essa estratégia permite unir qualquer tipo

de RNA aos aptâmeros sem alterar sua conformação, e inclusive abre a porta a possibilidade de colocar mais de um RNA (290).

O aptâmero contra o antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), uma molécula expressa majoritariamente em tecidos tumorais de próstata, foi desenvolvido por Lupold *et al.* (291). Mc. Namara *et al.* (292) usaram-no pela primeira vez para fazer a veiculação de moléculas de RNAi contra os genes Plk1 e Bcl2, genes essenciais para o crescimento do tumor. Esses aptâmeros mostraram morte nas células PSMA positivas, mas apresentam a limitação de ter que ser administrados intratumoralmente. Posteriormente, Dassie *et al.* fizeram modificações no mesmo aptâmero, adicionando 2'-fluoropyrimidines e diminuindo o tamanho para conseguir maior estabilidade e viabilizando-se sistemicamente, com excelentes resultados (293).

Atualmente existem diversos trabalhos na literatura que descrevem a geração de aptâmeros agonistas de moléculas imunomoduladoras como OX40 (294), 4-1BB (295), ou mesmo aptâmeros antagonistas dirigidos a IL10 (296), CTLA-4 (297), PD1 (298) e TRIM 3 (299), entre outros. A tecnologia dos aptâmeros permite a manipulação do sistema imune em diferentes níveis, quer seja dirigida para as células do sistema imune ou mesmo dirigida diretamente para os tumores.

Podemos utilizar aptâmeros como agentes antagonistas, agonistas e como veículos para transportar moléculas entro da célula. Os Aptâmeros são uma ferramenta que pode ser explorada amplamente na imunoterapia para câncer (300).

1.11.2.1 Aptâmero de 4-1BB

O aptâmero de 4-1BB foi desenvolvido pelo grupo do Dr. Eli Gilboa, Universidade de Miami, no 2008 (301). No artigo o grupo mostra a seleção dos melhores candidatos de aptâmeros contra a proteína 4-1BB usando o método de *SELEX*. Além disso, eles demonstram que a versão monovalente se une ao 4-1BB, mas não consegue induzir um efeito de coestimulação. Assim eles constroem um aptâmero bivalente, unindo dois monômeros com uma sequência

de 21 nucleotídeos. Esse aptâmero consegue ter um efeito de coestimulação em células CD8 e causar um efeito antitumoral, sem efeitos adversos de toxicidade ou autoimunidade.

Como a versão monovalente une-se especificamente ao 4-1BB, pode ser usada para a veiculação de siRNA. No trabalho de Berezhnoy *et al.* fizeram uma quimera desse aptâmero junto com um siRNA contra mTORC1 (Raptor), que facilita a indução de células CD8 de memória e melhora a resposta antitumoral (302). Também usando esse aptâmero para coestimulação e um aptâmero quimera de PSMA com um siRNA para inibir o *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), o grupo do Dr. Gilboa conseguiu mostrar uma potente resposta antitumoral (303).

Neste trabalho, propomos utilizar aptâmeros quiméricos de RNA, dirigidos ao receptor 4-1BB, com alvo de veicular moléculas de TGS-RNAi para células T regulatórias, que apresentam expressão constitutiva deste receptor. O RNAi tem como objetivo o silenciamento transcricional de FoxP3, podendo desta forma, induzir a inativação do fenótipo imunossupressor de Treg e contribuindo para a potencialização da resposta imune antitumoral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- 2.1.1 Desenhar e testar diferentes estratégias de silenciamento transcricional de *Foxp3* que permitam inativar seletivamente o fenótipo imunossupressor de células T reguladoras usando diferentes plataformas de entrega celular.
- 2.1.2 Desenvolver e avaliar uma estratégia para testar vacinas antitumorais usando combinações de moléculas estimuladoras (OX40L, 4-1BBL e GM-CSF), em modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Analisar por bioinformática a sequência do gene *Foxp3* para determinar sequências alvo para TGS.
- 2.2.2 Desenhar e clonar vetores recombinantes expressando os candidatos de RNA (shRNA, sasRNA, tiRNA, sgRNA) nas regiões alvos.
- 2.2.3 Realizar ensaios de inibição de *Foxp3* com todos os candidatos de RNA em células primárias murinas.
- 2.2.4 Verificar o fenótipo imunossupressor das Treg após ação dos RNAs.

- 2.2.5 Testar candidatos eficientes em aptâmeros quiméricos e avaliar a expressão de *Foxp3* junto com o fenótipo imunossupressor das Treg.
- 2.2.6 Determinar se o mecanismo pelo qual os RNAs induzem o silenciamento é a metilação de DNA.
- 2.2.7 Estabelecer células derivadas de tumores que expressem as moléculas OX40L e 4-1BBL e avaliar a sua ação antitumoral *in vitro* e *in vivo* junto com uma célula que expressa GM-CSF.
- 2.2.8 Avaliar possível sinergia entre as vacinas antitumorais *in vitro* e *in vivo* com ênfase na resposta de diferentes tipos celulares imunes.
- 2.2.9 Avaliar *in vivo* a ação dos aptâmeros e as vacinas em sinergia.

3. METODOLOGIA

3.1 Análise bioinformática da sequência do gene *Foxp3*

Inicialmente, buscamos regiões de alta homologia entre camundongo e humano, que compartilhassem uma alta quantidade de CpGs dentro delas. Depois de selecionar as regiões do *hotspot* do gene *Foxp3* usando rVISTA (304), nós criamos candidatos sasRNA de acordo com Ackley *et al.* 2013 (305), utilizando-se um algoritmo disponibilizado pelo Dr. Morris, University of New South Wales, Australia. Os candidatos shRNA foram gerados com um algoritmo disponibilizado pelo Dr. John Rossi, City of Hope, EUA, descrito previamente na literatura por Heale *et al.* 2005 (306). Para candidatos do sistema CRISPR/CAS, utilizamos um algoritmo computacional disponibilizado pelo grupo do Dr. Zhang, MIT, para o desenho de sequências de sgRNA, conforme descrito em Sanjana *et al.* (307). Os números de acesso das sequências usadas neste trabalho são AF277994.1 para o *Foxp3* murino e NG_007392.1 para o *Foxp3* humano, conforme NCBI.

3.2 Desenho e clonagem de candidatos de RNA para TGS em *Foxp3*

Após desenhar os candidatos de RNAi com alta afinidade e menor possibilidade de efeitos *off-target* para as regiões selecionadas, os candidatos de sasRNAi e shRNAs tiveram suas sequências de DNA sintetizadas como oligonucleotídeos, flanqueados por extremidades coesivas e clonados no vetor PLKO THY1.1 usando *BamHI* e *EcoRI*. As sequências de sgRNA do sistema CRISPR/CAS foram sintetizadas como oligonucleotídeos flanqueados por extremidades coesivas e clonados no vetor *Lenticrispr* v2 (plasmídeo Addgene # 52961) usando *BsmI*. Após realizar a ligação, bactérias DH5 α foram transformadas e cultivadas por 16 horas a 37°C. Aquelas colônias que crescessem foram utilizadas para PCR de colônia. Os clones positivos foram selecionados para miniprep e confirmação de sequenciamento, aqueles que tivessem os candidatos de RNA confirmados por sequenciamento foram depois isolados com kit de midiprep (Quiagen) e usados para as preparações virais (Apêndices figuras 8.1 e 8.2)

3.3 Produção de aptâmeros

Inicialmente os aptâmeros foram amplificados numa PCR convencional usando os oligos da tabela 8.1 em apêndices. Os produtos de PCR foram purificados usando as colunas QIAprep Spin (Qiagen, Valencia, CA). O ARN foi transcrito usando a polimerase T7 (Y639F). Os produtos foram purificados por electroforese em gel de poliacrilamida e concentrados numa coluna 30 Kda Amicon Ultra-4 (Millipore, Billerica, MA). Após disso foi medida a concentração no nanodrop (Thermo)

3.4 Produção viral e titulação

A produção e titulação viral foram feitas de acordo com o Laboratório de Vetores Virais no LNBIO, CNPEM, os vetores lentivirais, foram concentrados usando colunas Amicon (Millipore) para incrementar o título. Para comparação de envelopes foram usadas os envelopes Ecotrópico (308), VSVG, 4-1BB e o Tr-712 que foi gentilmente cedido pela Dra. Barbara Schnierle, Paul-Ehrlich-Institut, Alemanha (309).

3.5 Aprovação da Comissão de Ética e Biossegurança

O presente trabalho recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Unicamp (protocolo nº 2661-1) e da Comissão Interna de Biossegurança do LNBio (processo nº MCB3-090114) (Copia em Anexos).

3.6 Isolamento imunomagnético de células primárias T CD4 e CD8

O isolamento de CD4 e CD8 foi feito usando baços de camundongos C57BL/6, provenientes de machos saudáveis dentre 8 e 12 semanas. Nós isolamos as células usando o kit de enriquecimento de células T CD4/CD8 *EasySep™*. Estes kits são usados para isolar células T CD4(+) e células T CD8(+) de suspensões celulares de esplenócitos por seleção negativa. Os resultados destes isolamentos sempre tiveram uma pureza superior a 90%.

3.7 Ensaio *in vitro* para avaliar candidatos para TGS

As células T CD4 foram ativadas durante 24 h com os anticorpos CD3e (*TONBO biosciences clone 145-2C11*) e CD28 (*TONBO biosciences clone 37,51*) a uma concentração de 1 µg / mL. As células foram cultivadas em um meio RPMI completo (CM) (1% de penicilina / estreptomicina, 1% de HEPES,

1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de glutamina, 10% de soro fetal bovino e 50 μ M de β -mercaptoetanol). As preparações de vírus concentradas que codificam candidatos ou controles de RNAi foram utilizadas para transduzir estas células T CD4 (+) usando um MOI de 10. Uma vez que células T CD4 (+) expostas ao TGF β adquirem um fenótipo positivo de FOXP3, os vetores virais foram incubados com polibreno 1mg/mL, IL2 100U/mL, TGF β 1mg/mL, e ácido retinoico, 0,1mg/mL por 24 horas, depois o meio foi trocado para remover os vetores virais e continuar com uma segunda indução de Treg, usando IL2 100U/mL, TGF β 1mg/mL, e ácido retinoico, 0,1mg/mL. Estas células foram incubadas por 72 horas.

3.8 Citometria de fluxo para ensaio de inibição de *Foxp3*

Após 72 horas, as células foram marcadas com o anticorpo de membrana CD90.1 (thy1.1) -FITC (BD) e após 24 horas de permeabilização e fixação, foram marcadas para FOXP3-APC (*eBiosciences*), consistente com as instruções do fabricante (TONBO) e usando o isotipo IGGk2a-APC (*eBiosciences*). Após duas horas, as células foram analisadas por citometria de fluxo, (*FACScantoll*, *Becton-Dickenson*, *EUA*), do LNBio, CNPEM. Para a análises foram selecionadas inicialmente as células THY1.1 positivas e nesse Gate se avaliou a expressão do FOXP3.

3.9 Ensaio de imunossupressão usando Treg tratadas com candidatos TGS e células CD8 efetoras

Baços de camundongos C57BL6 foram dissociados separando os esplenócitos, que foram tratados com ACK por 5 minutos 4° C e depois de lavar com PBS 1X, 1×10^7 células foram incubadas com Mitomicina C por 45 minutos a 37°C (essas células as chamaremos de APCs). O restante dos esplenócitos foram usados para separar células CD8 positivas, que foram isoladas usando o kit da *stemcell* como foi descrito em 3.6. Estas células foram depois marcadas com CFSE um marcador de membrana que vai perdendo-se com cada divisão celular.

Usando células Treg tratadas com os vetores virais como foi descrito em 3.7 se realizou um ensaio de imunossupressão no qual foram cultivadas células Treg (que foram transduzidas com os diferentes vetores virais), células CD8,

APCs e o anticorpo antiCD3 murino 0,5mg/mL. Nestes experimentos se deixaram como controles células CD8 só com CD3, só com APC e células Treg com CD3, além de células CD8 com CD3 e APCs que mostrariam a proliferação natural das células CD8, como pode observar-se na tabela 8,2 dos apêndices. Após 72 horas as células foram marcadas com CD8-PE e se avaliou a proliferação das células CD8 pelo perfil do CFSE. A marcação com CD8-PE permite excluir da análise células Treg.

3.10 Ensaios de inibição de *Foxp3* e imunossupressão usando aptâmeros

Para os aptâmeros foram usados os mesmos protocolos descritos para os vírus com a única diferença de que não é usado polibreno na incubação e que foram testadas diferentes concentrações de aptâmero para fazer os testes.

3.11 Análises de metilação

Após 72 horas da transdução fizemos *Sorting*, separando só as células positivas para THY1.1 (nosso repórter de transdução). O DNA destas células foi isolado e convertido com bisulfito (*Epitek kit qiagen*). O tratamento com bissulfito é usado para desaminar citosinas não metiladas convertendo em uracila, dessa maneira as citocinas metiladas continuam como citocinas, podendo detectar-se as mudanças por meio de sequenciamento ou outras técnicas como PCR metil específica. Após a conversão, o TSDR e o promotor foram amplificados por PCR, esse produto foi purificado e sequenciado no LNBIO. Usamos como controle o *Sorting* de uma célula ITR sem transdução que era positiva para FOXP3. As análises de metilação foram feitas com a ferramenta BISMA (310).

3.12 Linhagens celulares MCF7 - FOXP3-CRISPR

Utilizamos a linhagem celular de câncer de mama MCF7 para análise da inibição de *Foxp3* humano com candidatos CRISPR. O MCF7 foi modificado com lentivírus, usando o envelope VSVG, codificando os candidatos de sgRNA e o cassete de expressão de puomicina. Para a transdução inicial, células MCF7 foram incubadas com polibreno e vírus com MOI = 0.5. Uma vez que selecionamos as células resistentes à puomicina, isolamos RNA para PCR em tempo real para cada candidato CRISPR-FOXP3 e para as células com o vetor vazio.

3.13 Isolamento de RNA e perfil de expressão de genes.

Depois do estabelecimento das linhagens estáveis com puromicina (1mg/ml). Extraímos RNA com o *kit RNAeasy (Qiagen)*. O RNA foi então convertido em cDNA usando o kit de transcrição de cDNA de alta capacidade (Qiagen). As bibliotecas de cDNA resultantes de cada amostra foram então submetidas a PCR em tempo real utilizando primers para os genes *housekeeping* GAPDH e ACTB e para o FOXP3. A placa foi lida e a análise foi feita usando o software 7500 v 2.6 (*Applied Biosystems*).

3.14 Estabelecimento de linhagens celulares para modelos *in vitro* e *in vivo* derivado de B16F10

Todas as linhagens celulares para ensaios murinos *in vitro* e *in vivo* foram derivadas da linha celular B16F10 de melanoma murino, a qual caracteriza-se por ser pouco imunogênica e produzir tumores subcutâneos visíveis depois do décimo dia de injeção. Esta célula foi modificada com retrovírus que codificavam o transgene (OX40L ou 41BBL) e o gene de resistência à G418. Para a transdução inicial, a linha celular B16F10 foi incubada com polibreno e vírus com MOI = 0,3. Uma vez que selecionamos as células resistentes ao G418, realizamos a clonagem celular e selecionamos os principais clones com os maiores níveis de proteína por citometria de fluxo (anticorpo OX40L e BIOSCIENCES RM134L e anticorpo 4-1BBL e BIOSCIENCES clone TKS-1). Após esta seleção, as linhagens celulares estabelecidas (B16F10: OX40L, 4-1BBL, GM-CSF) foram transduzidas novamente, mas agora com um vetor lentiviral que codifica eGFP e um cassete de expressão de puromicina. Após a clonagem celular, os clones foram selecionados pela expressão mais alta de eGFP e do transgene. A linha celular B16F10 GM-CSF foi gentilmente cedida pelo Dr. Dranoff (Harvard).

3.15 Camundongos

Os camundongos usados neste trabalho foram C57BL/6 (fêmeas e machos de 8 semanas de idade). As fêmeas que foram usadas nos experimentos das vacinas foram adquiridas do CEMIB-UNICAMP, e os machos usados nos experimentos de FOXP3 foram adquiridos no laboratório de modificação do genoma (LMG) do LNBIO. Todos os animais foram mantidos em micro isoladores e tratados de acordo com os regulamentos de cuidados com animais do

laboratório CNPEM, no biotério do LNBio - CNPEM. Os experimentos para este estudo foram aprovados pelo CEUA, Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da UNICAMP (conforme seu comprovante em anexos)

3.16 Ensaios dos efeitos das vacinas *in vitro*

Para medir o efeito dos imunomoduladores expressados pelas células tumorais, na estimulação de esplenócitos e células T, plaqueamos um total de 1400 células B16F10-GFP; parental, OX40L, GM-CSF, 4-1BBL e as possíveis combinações derivadas (GM-CSF mais OX40L, GM-CSF mais 4-1BBL, OX40L mais 4-1BBL, GM-CSF mais OX40L mais 4-1BBL). 24 horas após o plaqueamento, adicionamos em triplicata, para cada linhagem celular ou combinação 1400 das células do sistema imune a serem avaliadas; esplenócitos recém-isolados ou CD4 ou CD8 (CD4 e CD8 previamente ativados por 24 horas com CD3e (clone 145-2C11 de eBioscience) e CD28 (clone 37,5 de eBioscience) em RPMI completo. As células foram co-cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24,48,72 ou 96 horas. Após desse tempo foram feitas as análises de citometria ou operetta.

3.16.1 Aquisição e análise da imagem (*operetta*).

O meio foi removido da placa, e as células foram fixadas usando 4% de paraformaldeído. Após uma lavagem com PBS, o corante DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, SIGMA) foi adicionado por 20 minutos. Após lavagens com 1X PBS, as placas foram digitalizadas com o sistema de imagem de *Operetta* HTS (PerkinElmer), do LNBio, CNPEM usando uma objetiva de 20X com 27 campos de visão/poço. Usando os canais de excitação 360-400 e 460-490 e os canais de filtragem de emissão 410-480 e 500-550 para eGFP e para DAPI. As imagens foram então analisadas com o *Columbus* (versão 2.4.0 PerkinElmer), do LNBio, CNPEM.

3.16.2 Citometria de fluxo

O sobrenadante contendo esplenócitos foi centrifugado e lavado com PBS contendo 5% de soro bovino fetal, após disso foi marcado com anti-CD4-FITC (clone GK 1.5 Ebiosciences) e anti-CD8a-PE (Biolegend clone 53-6.7). O sobrenadante contendo CD4 foi analisado com anti-CD25-PE (clone PC61.5 do eBiosciences) e o sobrenadante contendo CD8 foi analisado com anti-ki67-

PE (556027 eBIOSCIENCES) As amostras foram analisadas no citometro de fluxo FACScanto II (BD) do LNBio-CNPEM e a análise de dados foi realizada usando o software *FCS express 5*.

3.17 Inoculação e tratamento de tumores

Os camundongos foram injetados no flanco direito s.c. com 5×10^4 células B16F10 em 100 μ L de PBS, depois foram tratados nos dias um, quatro e sete com 1×10^6 células irradiadas derivadas de B16F10 expressando os imunomoduladores (vacinas). A dose de irradiação foi 50 Gy e foi realizada no hospital das clinicas, UNICAMP. As vacinas consistiam em células B16F10 que expressam GM-CSF (Gvax), OX40L, 4-1BBL ou as combinações das anteriores. Estas vacinas foram aplicadas no flanco esquerdo dos animais ($n = 10$). O crescimento tumoral foi expresso em porcentagem de camundongos sem tumor entre camundongos injetados totais, enquanto o tamanho do tumor foi medido com um paquímetro e calculado como o diâmetro mais longo x diâmetro menor x diâmetro diagonal dividido por $3.141599/2$ (em milímetros cúbicos). Os camundongos cujos tumores não eram detectáveis foram re-desafiados s.c. com 5×10^4 células B16F10 no flanco inferior esquerdo, e a progressão foi documentada também em dias alternados.

3.18 Histologia e imunofluorescência

A inoculação e tratamento de tumor foram realizadas como descrito anteriormente. Para a coloração de H&E, os animais foram sacrificados no dia 28 após a primeira injeção, os tumores foram fixados em paraformaldeído 4% durante 24 horas, incorporados em parafina e corados com hematoxilina e eosina. As imagens foram capturadas com uma objetiva de 10x do microscópio Nikon. Para a coloração por imunofluorescência de diferentes tipos de células imunitárias infiltrando-se no tumor, os tumores B16F10 foram incorporados em OCT e congelados em nitrogênio líquido. Os espécimes seccionados foram lavados com 1X PBS (pH 6,8) e incubados com glicina (0,1 M) durante 30 minutos e BSA (1%) durante uma hora. Em seguida, eles foram incubados com anti-CD8a (eBIOSCIENCES 53-6.7). 1: 100 de diluição, a 4 ° C durante a noite. As lâminas foram subsequentemente lavadas e incubadas com um anticorpo secundário conjugado com FITC, usando a diluição 1: 500, à temperatura ambiente durante uma hora. A coloração nuclear foi realizada com Hoechst

33258 (Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram capturadas com um microscópio confocal Leica do LNBio CNPEM e as imagens foram analisadas usando o software LAS AF (LEICA), do LNBio CNPEM.

3.19 Citometria de fluxo de linfócitos infiltrados por tumores (TILs)

Após todos os animais serem sacrificados, os TILs foram obtidos a partir dos tumores. Os baços também foram coletados. O tumor e os baços foram dissociados com um filtro e depois foram incubados 10 minutos com ACK para eliminar eritrócitos. TILs e esplenócitos foram analisados por citometria de fluxo para a expressão de CD4, CD8 e FOXP3. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACScanto II (BD Biosciences) e a análise de dados foi realizada usando as edições de pesquisa de FCS express 5.

3.20 Análise estatística

Os dados foram analisados com Prisma 7.0 (*software GraphPad*). Os experimentos foram repetidos de duas a quatro vezes. O significado estatístico foi determinado pela ANOVA unidirecional e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnet. Os dados de sobrevivência do tumor foram analisados com o método de Kaplan-Meier. O teste Mantel-Cox de log-rank foi utilizado para comparar curvas de sobrevivência para diferentes grupos. (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.001$).

4. RESULTADOS

4.1 Análise de bioinformática de *Foxp3*

Com o objetivo de fazer silenciamento transcricional, é necessário ter áreas com alta densidade de CpG no gene *Foxp3*, já que nossa hipótese é que essas áreas seriam suscetíveis a metilação de DNA induzindo o silenciamento transcricional. Além disso, e pensando numa futura alternativa terapêutica, o ideal seria que as áreas destinadas ao silenciamento fossem compartilhadas entre humanos e camundongos assim poderia ser mais factível reproduzir os efeitos observados em células humanas. Por isso analisamos a sequência do gene *Foxp3* à procura de regiões altamente conservadas, entre camundongos e humanos, onde fosse possível gerar RNAi para o silenciamento transcricional.

A análise das sequências de RNAi foi feita utilizando-se a plataforma VISTA (<https://r Vista.dcode.org/>) do NIH. Estabelecemos, os seguintes parâmetros no *Software VISTA*: regiões maiores de 500 pb e com mais de 76% de homologia entre humanos e camundongos. As regiões são categorizadas como Elementos de Sequência Não Codificantes Conservados (CNS) e são numeradas pela ordem em que aparecem na sequência (Figura 6). A primeira região é de fato o promotor já que contém as TATA box e CAAT box com o sítio de início da transcrição, as duas seguintes CNS1 e CNS2 estão no segundo íntron, enquanto o CNS3 está entre os exons 1 e 2. Essas regiões também possuem vários sítios de ligação a fatores de transcrição e além de serem altamente conservadas apresentam uma alta quantidade de citosinas seguidas por guaninas (CpG) as quais são susceptíveis de metilação por metiltransferases que poderiam induzir o TGS (Tabela1).

Tabela 1. Caracterização das regiões encontradas na análise feita com rVISTA.

CNS	CPG HUMANO	CPG CAMUNDONGO	CPG DE HUMANO E CAMUNDONGO	FATORES DE TRANSCRIÇÃO ASSOCIADOS
Promoter	5	3	5	NFAT, AP1, FOXO, CREB/ATF
CNS1	1	5	0	NFAT, RAR/RXR, SMAD 3
CNS2	5	5	8	CREB/ATF, STAT5, STAT3, FOXP3, ETS1, REL, RUNX1
CNS3	8	2	4	C-REL

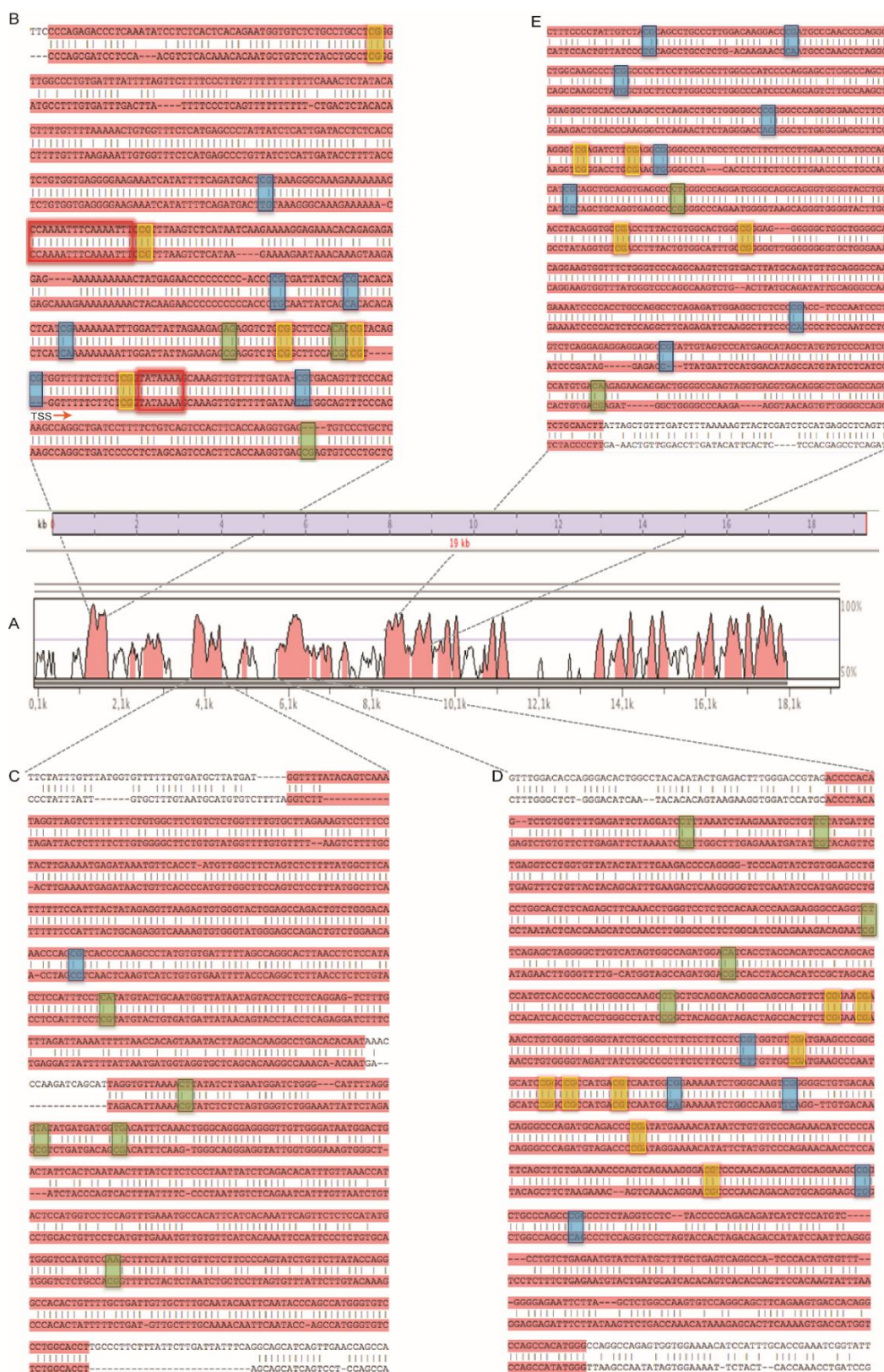


Figura 5 Análise da sequência comparativa do gene *Foxp3* detecta elementos de sequência não codificantes e conservados (CNS). (A) Alinhamentos de sequência do FOXP3 humano e de camundongo. (B) Vista ampliada do promotor contendo a caixa TATA e CAAT, (b) CNS1, (C) CNS2 e (D) CNS3. As caixas mostram CpG; presente em humanos e camundongos (amarelo), apenas em camundongos (verde) e apenas em humanos (azul). Estes são apresentados como representações VISTA derivadas de SLAGAN. As sequências conservadas estão em rosa. Os critérios de alinhamento foram de 500 pb e 75% de corte de conservação.

4.2 Desenho e clonagem dos candidatos de RNAi

Com esses resultados, decidimos trabalhar com o promotor e a região CNS2, também conhecida como região específica desmetilada das Treg, em este trabalho referida como TSDR (*Treg-specific demethylated region*). Esta região adquiriu seu nome por encontrar-se totalmente desmetilada em Treg e metilada em células T convencionais (230). Decidiu-se para testar o silenciamento transcricional desenhar três tipos de RNAi que poderiam induzir metilação: shRNA, sasRNA e tiRNA complementares a essas duas regiões no *Foxp3*. Inicialmente a análise das regiões permitiria usar 60 candidatos TGS-RNAi., entretanto, selecionamos 27 candidatos para serem avaliados. (Figura 7).

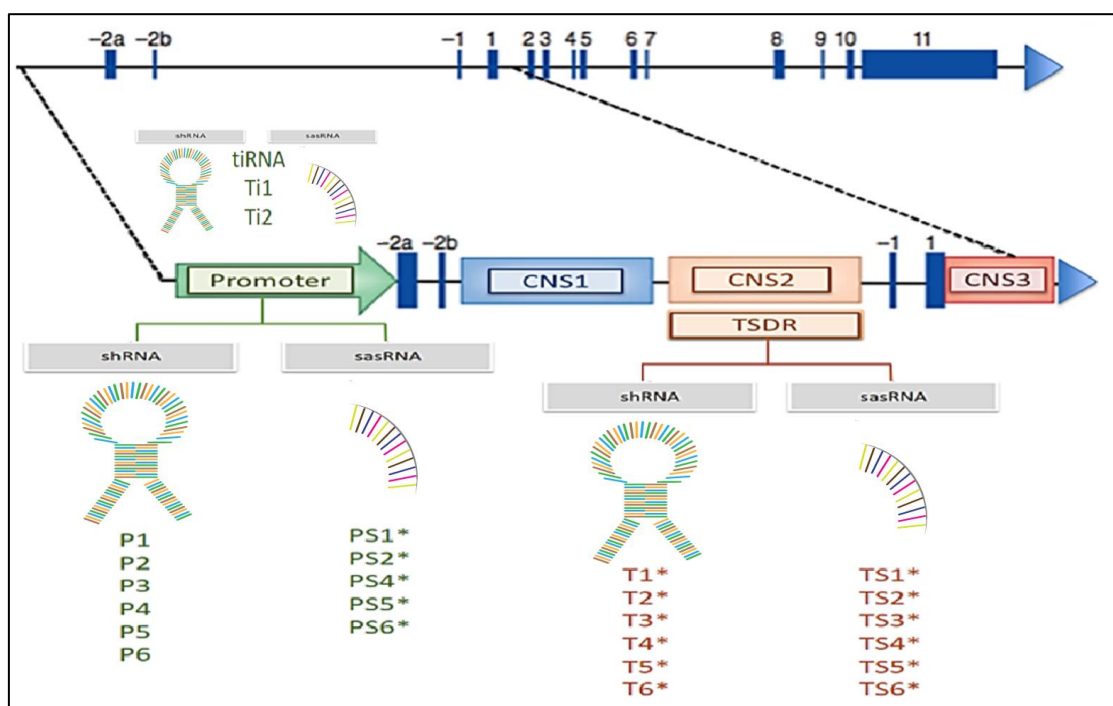


Figura 6 Distribuição dos candidatos de RNA selecionados para TGS no gene *Foxp3*. Os candidatos selecionados estão distribuídos em todo o promotor e o CNS2, além de dois candidatos de ti que são complementares ao sítio de início da transcrição.

Os critérios de seleção dos shRNAs foram baseados na acessibilidade relativa prevista e no duplex e diferencial que foram gerados com o algoritmo (306). No caso dos sasRNAs, o critério mais relevantes foi o número de purinas (305). No caso dos tiRNA foram desenhados dois tipos; um shRNA e um sasRNA que eram complementares ao sítio de início da transcrição. Além desses

critérios, usamos o número de CpG dentro dos candidatos e a posição dentro da região, tentando ter uma variedade na quantidade de CpG em diferentes áreas do promotor e o TSDR (Tabela 2).

Tabela 2. Lista de candidatos usados para fazer TGS no gene *Foxp3*. Os candidatos estão sendo complementares a duas regiões o promotor e o CNS2 ou TSDR. Três classes de RNAs foram usados shRNA, sasRNA e tiRNA.

NOME	REGIÃO	RNA	CpG	FITA SENSO
P1	Promoter	shRNA	0	GAACCCCCCCCCCACCCTGCA
P2	Promoter	shRNA	0	CCCCACCAGACACAGCTCTG
P3	Promoter	shRNA	1	GTCTCTACCTGCCTCGGGATG
P4	Promoter	shRNA	2	ACCCAGCGATCCTCCAACGTC
P5	Promoter	shRNA	3	TCTGCGGCTTCCACGCCGTGG
P6	Promoter	shRNA	1	TCCCACAAGCCAGGCTGATCCG
P7	Promoter	shRNA	1	CTTCTCGGTATAAAAGCAAAGCT
PS1	Promoter	sasRNA	0	TGATTTCTTCCCCTCACCACA
PS2	Promoter	sasRNA	0	GTTTATTCTTTTCTTATGAGA
PS4	Promoter	sasRNA	1	AGACCTCGCTCTTCTAATAAT
PS5	Promoter	sasRNA	0	AAACCACAATTTCTTAAACAA
PS6	Promoter	sasRNA	0	AAAACAACCTTTGCTTTTATAC
T3	TSDR	shRNA	1	GTCACCTACCACATCCGCTAG
T4	TSDR	shRNA	0	CTCCAGGTCCCTAGTACCACT
T5	TSDR	shRNA	2	GCCACTTCTCGGAACGAAACC
T6	TSDR	shRNA	1	CAGATGTAGACCCCGATAGGA
T7	TSDR	shRNA	0	GTGGATCCATGCACCCTACAG
T8	TSDR	shRNA	1	GCCATGACGTCAATGGCAGAA
TS1	TSDR	sasRNA	0	AGAAATCTCCTCCTTAAATAC
TS2	TSDR	sasRNA	0	GATTCTGTCTTTCTTGGATGC
TS3	TSDR	sasRNA	0	TGGATCCACCTTCTTACTGTG
TS4	TSDR	sasRNA	1	AGAATATGTTTTCTTATCGGG
TS5	TSDR	sasRNA	1	ACGATATCATTTCTCAAAGCC
TS6	TSDR	sasRNA	0	TTTGACTGTTTCTTAGAAGC
TS7	TSDR	sasRNA	0	TTTGAAGTGCTCTTTATG
Ti1	Over TSS	tiRNA-sh	0	TCCCACAAGCCAGGCTGATCCC
Ti2	Over TSS	tiRNA-sas	0	GGCAGTTTCCCACAAGCCAGG

4.3 Avaliação dos candidatos para silenciamento transcricional em células primárias

As células T CD4 pré-ativadas e cultivadas na presença de TGF β , IL2 e ácido retinóico expressam *Foxp3* e são imunossupressoras (196,214,311). Essas células são conhecidas como células T regulatórias induzidas *in vitro* e são as células utilizadas para testar os nossos candidatos, sendo que a expressão de *Foxp3* deve ser silenciada em células que foram traduzidas com vetores lentivirais que codificam os candidatos de RNAi. Além do TGS-RNAi, também estamos usando um controle positivo chamado de M183, que é um shRNA que causa silenciamento pós transcricional de *Foxp3*, desenvolvido pelo nosso grupo. Também usamos dois controles negativos, shGFP (codifica shRNA contra GFP) e M231 (codifica shRNA contra a luciferase), além das células não traduzidas.

Nosso objetivo com estes experimentos é comparar a quantidade de FOXP3 em células traduzidas com vetores lentivirais de envelope Ecotrópico. Um dos principais problemas encontrados foi a dificuldade de padronizar o protocolo para conseguir ver o efeito do TGS nas células primárias pré-ativadas, esse problema é devido principalmente ao tempo necessário para induzir as modificações epigenéticas necessárias para conseguir fazer TGS e ao fato de encontrar o melhor momento para fazer a transdução viral. Depois de vários ensaios foi possível ver o efeito dos nossos candidatos ajustando o protocolo da transdução viral por 24 horas e a leitura só depois de 72 horas. O protocolo que era usado inicialmente estabelecia uma transdução viral de 6 horas e a leitura 48 horas depois, mas segundo os nossos resultados apesar desse tempo ser suficiente para observar silenciamento pos-transcricional, como o observado com o candidato M183, não é suficiente para o TGS.

Conforme apresentamos na Figura 7, os candidatos sasRNA foram mais efetivos na indução de TGS, sendo que isso foi observado tanto para candidatos dirigidos ao TSDR quanto ao promotor, e inclusive no candidato dirigido a região de início da transcrição, o TP2, atingindo até 75% de silenciamento. Conforme já mencionamos, além dos candidatos SAS, também geramos candidatos de shRNA, os quais apresentaram melhor resultado de silenciamento quando dirigidos a região do promotor, ainda melhor que candidatos dirigidos ao TSDR,

ou mesmo superiores aos candidatos de shRNA dirigidos ao sítio de início da transcrição. Para os candidatos TGS baseados em shRNA atingimos valores máximos de silenciamento de 60% no TSDR e 75% no promotor.

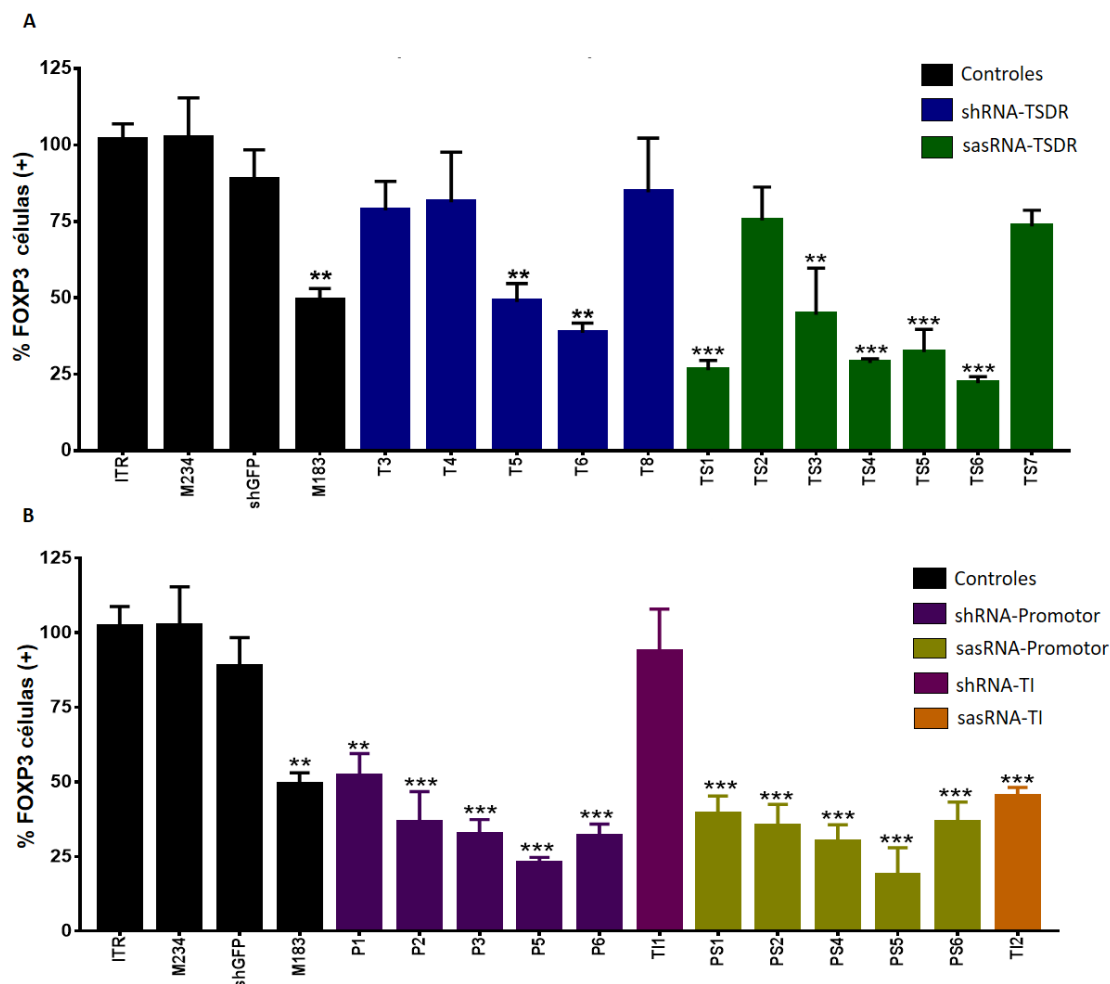


Figura 7. Análises de inibição de FOXP3 em células Treg transduzidas com vetores virais. Células transduzidas com RNAs para TGS no (A) TSDR e (B) promotor. Comparação contra células T regulatórias induzidas (ITR) células com RNAs irrelevantes M234 e shGFP e um controle de silenciamento PTS M183. (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.001$)

Os candidatos de cada classe nos quais observou-se a maior diminuição, foram selecionados para posteriores análises, sendo para o TSDR: o T6 e TS6 e para o promotor o P5, PS5 e TP2.

4.4 Teste de utilização de diferentes envelopes heterólogos para otimizar a veiculação de transferência gênica lentiviral

O uso de vetores virais para fazer entrega de moléculas de RNAi, tem sido amplamente documentado na literatura (312–315). Em nossos experimentos precisamos de vetores virais com alto poder de transdução e baixa toxicidade, razão pela qual testamos três modelos de envelopes, que apresentam diferenças no tropismo e eficiência da transdução. Nesses experimentos, a produção dos vírus foi feita ao mesmo tempo, com os mesmos vetores e a mesma estratégia de titulação. Usando um MOI de 10 encontramos pequenas diferenças entre os envelopes utilizados (Figura 8).

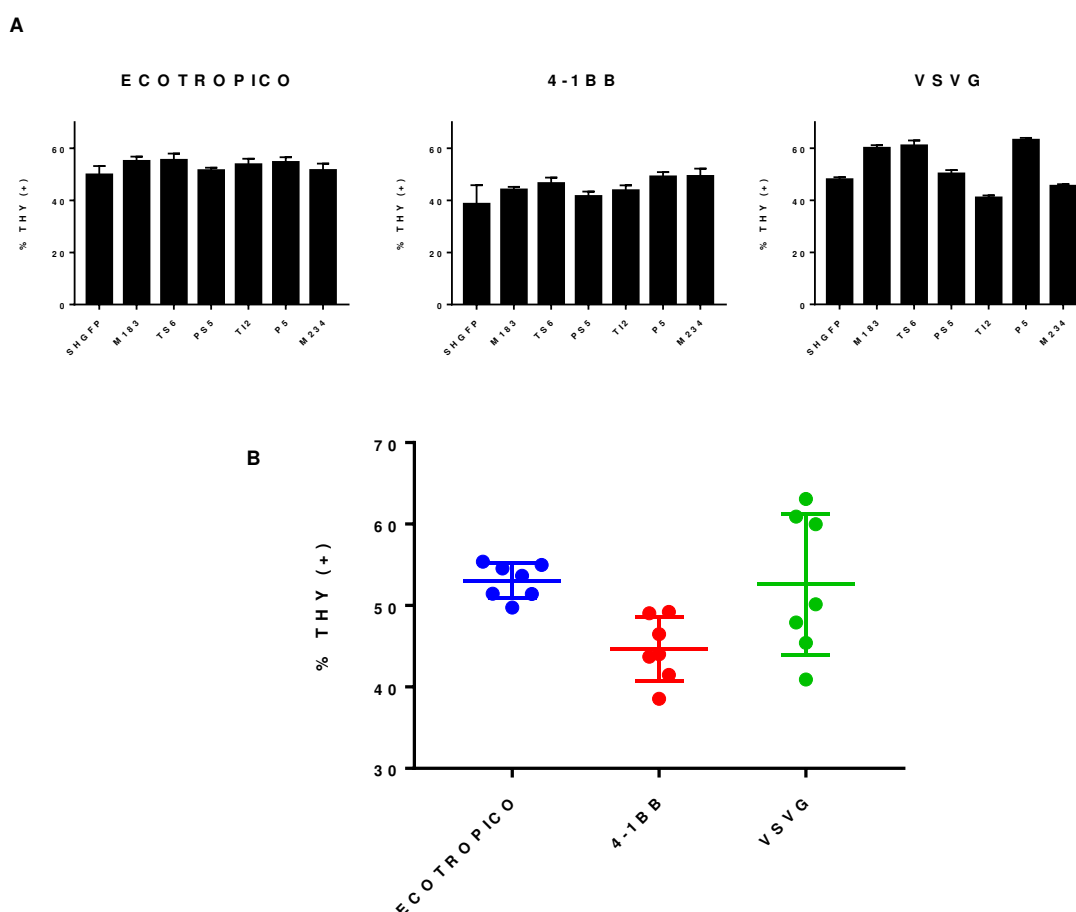


Figura 8. Comparação de diferentes envelopes para entrega de TGS. Quando o vírus entra nas células elas começam a expressar o marcador de membrana CD90.1 (Thy1.1), e assim podemos ter um controle da eficiência da transdução. (A) Valores individuais de expressão de thy1.1 para cada candidato. (B) Análise da variação da eficiência da transdução dos vetores analisados.

O envelope Ecotrópico, que confere tropismo por células murinas (308) apresentou uma eficiência mais estável na transdução. O envelope de VSVG,

que apresenta amplo espectro de transdução (316) apresentou uma variação muito grande na eficiência da transdução em quanto o envelope de 4-1BB, desenvolvido em nosso laboratório, apresentou uma menor eficiência de transdução, comparada aos outros. Contudo, considerando-se dados de nosso grupo, verificamos que este envelope confere alta especificidade por células T ativadas e, portanto, é o mais interessante para o desenvolvimento de um protocolo para veiculação de RNAi *in vivo*.

4.5 O silenciamento transcricional do gene *Foxp3* permite evitar a imunossupressão mediada por Treg.

O principal efeito deletério da ação de Treg em câncer está relacionado a sua habilidade de inibir células efetoras que poderiam atuar no combate ao tumor. Dessa forma, decidimos testar nossa hipótese de que o silenciamento de *Foxp3* em Treg induziria uma alteração fenotípica, inibindo-se a atividade imunossupressora de Treg. Para isto, desenvolvemos um ensaio *in vitro*, monitorando-se o potencial de imunossupressão de Treg cultivadas em presença de células efetoras T CD8. Como nossas células Treg induzíveis apresentam o fenótipo CD4+, isso viabilizou a sua diferenciação de células CD8 por citometria de fluxo. Neste ensaio de imunossupressão, as células CD8 são marcadas com o fluoróforo CFSE, e assim foi possível determinar especificamente a interferência na proliferação causada pelas células Treg transduzidas com nossos melhores candidatos de RNAi. Se as células Treg apresentavam o fenótipo imunossupressor era possível observar uma diminuição na proliferação. (Figura 9).

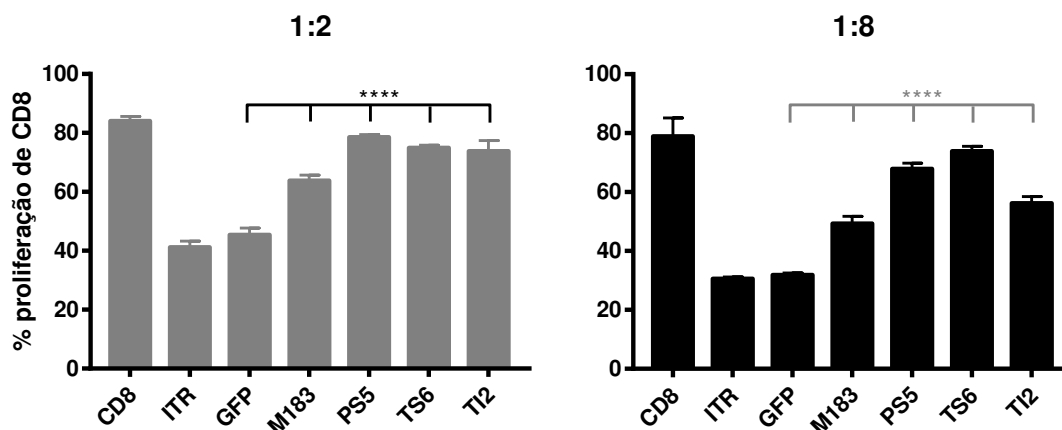


Figura 9. Experimento de imunossupressão de células CD8 usando células Treg transduzidas com nossos candidatos. Análise usando duas proporções de células Treg para CD8 1:2 e 1:8.

A proliferação das células CD8 com os candidatos de TGS-RNAi denominados PS5, TS6 e TI2 foi melhor que a observada com o nosso controle positivo M183 (PTGS-RNAi) chegando a níveis comparáveis de células que cresceram sem a presença de células Treg.

4.6 Candidatos de TGS-RNAi induzem metilação de DNA nas regiões alvo

Após observar os efeitos na diminuição do *Foxp3* e a inibição do fenótipo imunossupressor das Treg tratadas com os nossos candidatos de TGS-RNAi veiculados por vetores virais, quisemos comprovar o mecanismo do silenciamento transcricional, que baseado na literatura pode ser induzido pela metilação de sequências de DNA associadas ao controle transcricional.

Dessa forma, efetuamos uma análise do perfil de metilação de regiões genômicas, contendo ilhas CpG, de células tratadas com vetores de TGS-RNAi e controles (Figura 10), separadas por sorting usando o marcador CD90.1 ou THY1.1.

Analisando-se estes resultados, podemos classificar 4 grupos, de acordo com o estado de metilação.

No primeiro grupo encontram-se a célula ITR não transduzidas e células transduzidas com o RNAi M183, que faz silenciamento pos-transcricional (o que

não deve alterar os padrões de metilação) e um shRNA não relevante shGFP. Este grupo caracteriza-se por ter uma baixa metilação e uma alta expressão de FOXP3, exceto pelo candidato M183 que faz silenciamento postranscricional (Figura 8).

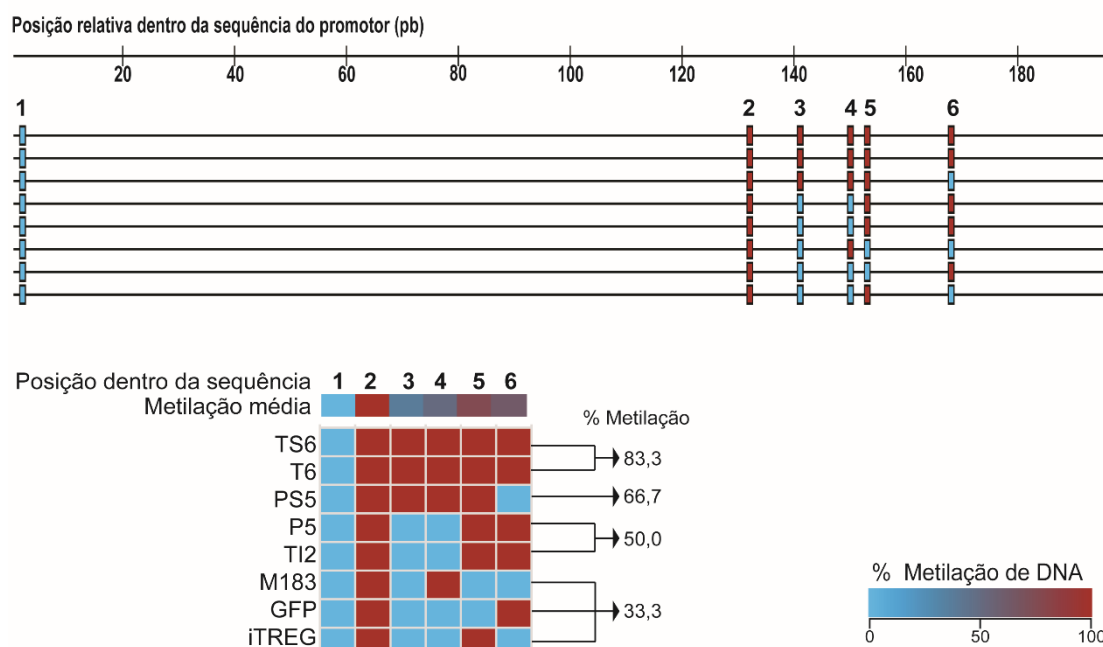


Figura 10. Os candidatos de TGS apresentam uma maior percentagem de metilação que os controles e as células não transduzidas. Resultados do status de CpGs presentes no promotor, posição relativa e metilação média de cada CpG.

O segundo grupo que seria composto pelo candidato sasRNA-TI2 de inibição transcricional e o shRNA P5 contra o promotor, apresentando 50% de metilação. Já o terceiro grupo só tem um membro que é o candidato sasRNA PS5 dirigido ao promotor que apresenta 66% de metilação. Por último temos o grupo com a maior incidência de metilação que está constituído pelos candidatos T6 e TS6. Através destas análises podemos inferir que os efeitos dos nossos candidatos estão relacionados com a metilação de CpGs em regiões como o promotor (Figura 10).

4.7 Geração de um aptâmero quimérico de RNA para inibir o fator de transcrição FOXP3 em células Treg

Como foi discutido anteriormente, os vírus apresentam uma boa eficiência na entrega celular dos candidatos, entretanto, sistemas não virais podem

aumentar a biossegurança de uma estratégia para inibição de Treg, pensando-se no desenvolvimento de futuras aplicações voltadas a terapia humana. Dessa forma, valendo-se da expertise de nosso grupo, produzimos aptâmeros quiméricos de RNA, contendo sequências de TGS-RNAi. Estes aptâmeros foram baseados no aptâmero 4-1BB, originalmente desenvolvido e otimizado pelo grupo do Dr. Eli Gilboa Universidade de Miami. Como células Treg podem apresentar expressão constitutiva de 4-1BB (235), postulamos que este seria um excelente receptor para internalizar os nossos candidatos de TGS-RNAi. Os candidatos sasRNAs se apresentam como uma fita simples e foram desenhados para serem unidos à extremidade 3' do aptâmero gerando as construções quiméricas (Figura 11).

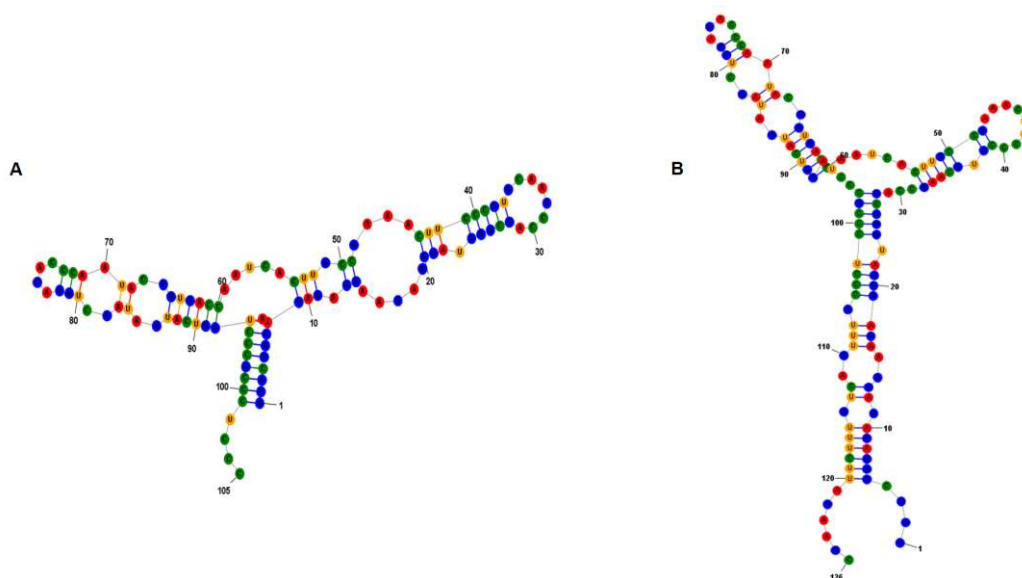
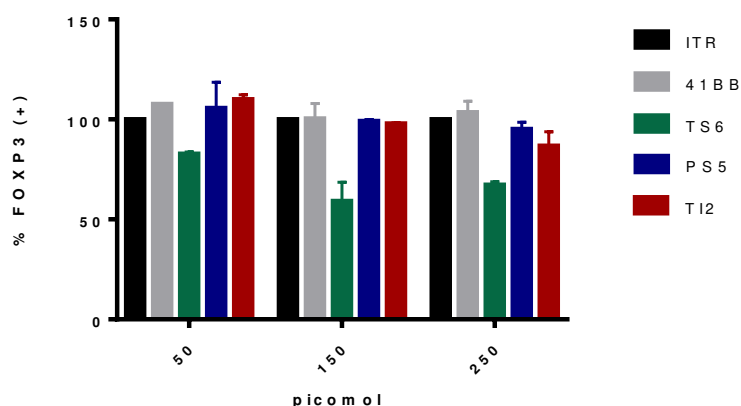


Figura 11. Estrutura secundária dos aptâmeros. (A) estrutura secundária do aptâmero 4-1BB e (B) estrutura secundária do aptâmero quimérico de 4-1BB contendo o SASRNA na porção terminal.

Para avaliar o efeito inibitório dos aptâmeros quiméricos em Treg, utilizamos nosso modelo de silenciamento de *Foxp3* em células iTReg. Assim, células CD4 pré ativadas e induzidas para Treg foram incubadas com os aptâmeros por 24 horas e depois deixadas em cultura por mais 72 horas. Após a incubação, as células foram coletadas, coradas para FOXP3 e analisadas por citometria de fluxo (Figura 12).



	Resumo	Valor P ajustado
ITR vs. m41BB	ns	0,9062
ITR vs. PS5	ns	0,7347
ITR vs. PT12	ns	0,8924
ITR vs. TS6	***	0,0002

Figura 12. Os aptâmeros quiméricos conjugados com os candidatos de sasRNA recapitulam os resultados obtidos com os vírus. A avaliação da inibição do *Foxp3* com os aptâmeros foi feita com várias concentrações (50, 150 e 250 Picomol) sendo que o candidato TS6, mostrou atividade em todas elas. ANOVA bidirecional e teste de múltipla comparação de Dunnet.

Conforme pode ser observado na Figura 12, o candidato TS6 induziu uma significativa inibição na expressão de *FoxP3*, consistente nas diferentes concentrações analisadas.

4.8 O aptâmero quimérico 41BB-TS6 pode mediar inibição do fenótipo imunossupressor de Treg.

Conforme nossos resultados anteriores (item 4,3), observamos que vetores virais codificando nossos candidatos de TGS puderam inibir o fenótipo imunossupressor de Treg. Dessa forma, para avaliar o efeito funcional de aptâmeros quiméricos contendo candidatos de TGS-RNAi, efetuamos um ensaio de inibição de imunossupressão, utilizando um aptâmero controle 41BB sem TGS-RNAi e três aptâmeros terapêuticos contendo os candidatos TGS-RNAi PS5, T12 e TS6. Utilizamos uma concentração de aptâmeros de 250 pmolar, baseados no resultado observado anteriormente para inibição de *Foxp3* (Figura

12). Conforme podemos observar na figura 13, o aptâmero 41BB-TS6 apresenta o melhor potencial inibitório de Treg, evidenciado pela maior taxa de proliferação, equivalente a proliferação de células T efetoras na ausência de Treg.

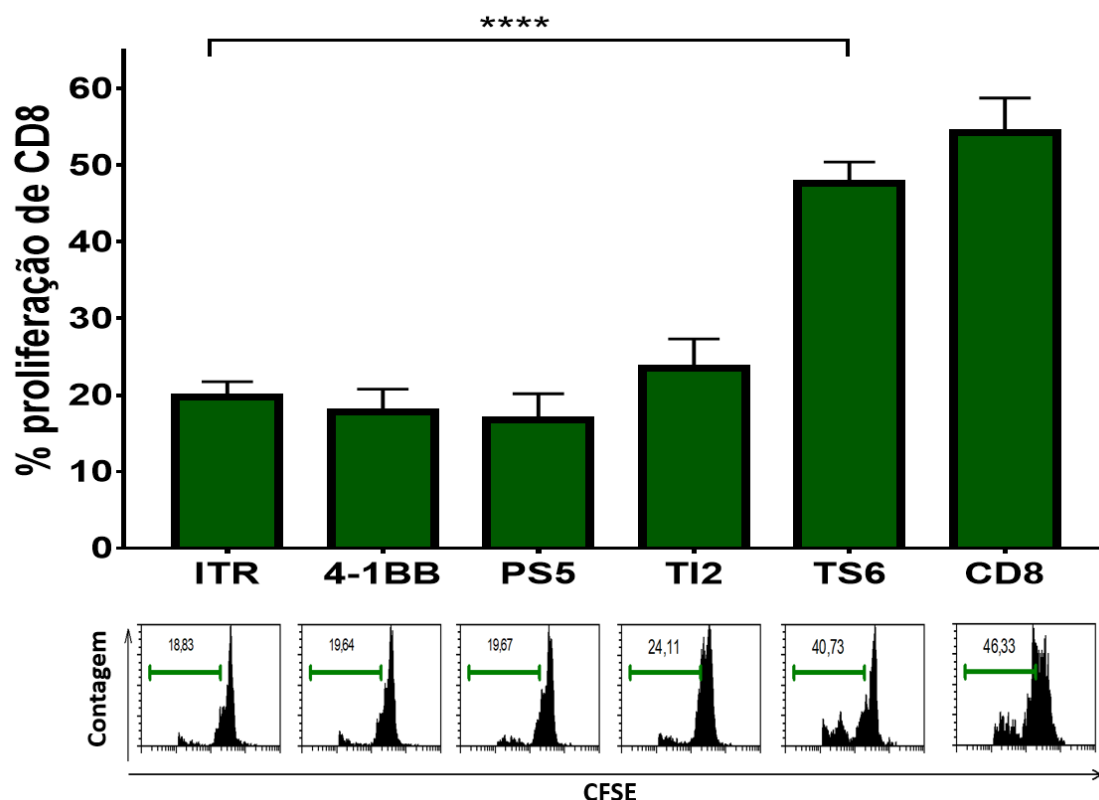


Figura 13. Experimento de imunossupressão de células CD8 usando células Treg tratadas com os aptâmeros numa concentração de 250pmol. Análise usando proporções de células Treg para CD8 de 1:2. Teste de ANOVA e teste de múltipla comparação de Dunnet.

4.9 Ensaios *in vitro* para avaliar a eficiência dos candidatos sgRNA para CRISPR

Além da estratégia RNAi-TGS, como também dispúnhamos de vetores virais codificando o sistema CRISPR/CAS, tentamos avaliar uma estratégia alternativa para inibir o *Foxp3*. O vetor foi gentilmente cedido pela Dra. Angela Saito, do laboratório de modificação do genoma (LMG/LNBio/CNPEM), que também nos auxiliou no entendimento desta tecnologia, possibilitando-se o desenho de sequências de sgRNA, necessárias para o funcionamento do sistema. O sistema CRISPR/CAS permite fazer diretamente uma edição no

genoma das células alvo, produzindo inserções ou deleções (INDELS) no gene de interesse, o que pode levar a um códon de parada prematuro por uma alteração no quadro de leitura (94,95). Sendo assim, desenhamos seis candidatos de sgRNAs de acordo com Sanjana *et al.* 2014 (307) (Tabela 3). Depois de descartar possíveis *offtargets*, escolhemos os melhores candidatos que foram clonados no vetor *lenticriscpr2*. Para o processo de clonagem, utilizamos a estratégia de PCR de colônia e posterior sequenciamento dos clones positivos. Aqueles clones com a sequência perfeita no sequenciamento foram levados para a produção viral.

Tabela 3 Lista de candidatos usados como sgRNA para induzir deleção do gene *Foxp3*. Os candidatos são complementares à sequência que fica depois do sitio de início da transcrição do gene.

CANDIDATO	sgRNA (Fita senso)
CRISPRFOXP3 #1	GCAGGGACACTCGCTCACCT
CRISPRFOXP3 #2	ACTCGCTCACCTTGGTGAAG
CRISPRFOXP3 #3	TTGGTGAAGTGGACTGCTAG
CRISPRFOXP3 #4	TGTGCTCCAAGTGCGTCCAC
CRISPRFOXP3 #5	CTGCTAGAGGGGGATCAGCC
CRISPRFOXP3 #6	CACAGCTCTGCTGGCGAAAG

Os ensaios para avaliar a inibição do *Foxp3* foram realizados usando o mesmo método que usamos para testar os candidatos de RNAi (Figura 14). Essa abordagem nos permitiu observar uma diferença na expressão de *Foxp3* com dois candidatos o FP3 CRISPR#1 e o FP3 CRISPR#2 ao comparar com o controle LentiCRISPR que é o vetor de CRISPR vazio.

Os resultados indicam que o candidato 1 e o candidato 2 conseguem inibir a expressão de FOXP3. Apesar disso, também observamos uma inibição de FOXP3 mesmo com o vetor controle, Lenticriscpr2, que não apresenta sequencias de sgRNA para inibir expressão de FoxP3. Tendo em vista nosso interesse em investigar melhor essa tecnologia de edição genômica, decidimos verificar o que aconteceria em células humanas.

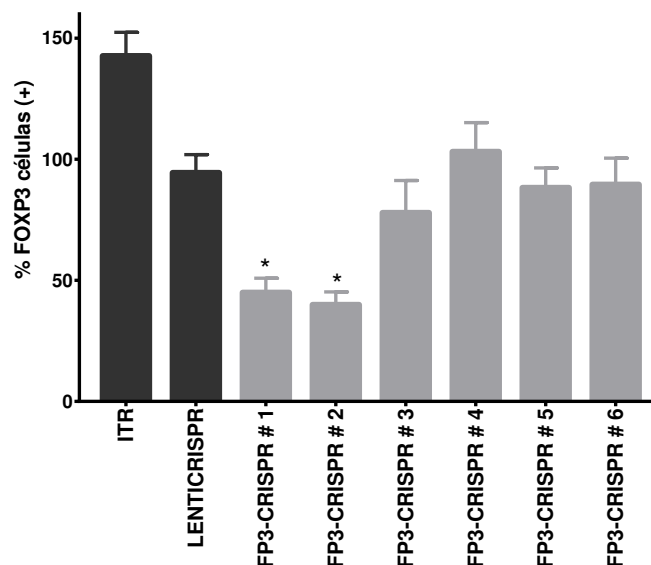


Figura 14 Análises de inibição de FOXP3 em células T regulatórias transduzidas com vetores virais que expressam a caspase 9 e os sgRNAs. Células que não foram transduzidas foram usadas como controles (ITR), assim com células transduzidas com o vetor vazio (LentiCRISPR). Teste de ANOVA e teste de múltipla comparação de Dunnet.

4.9.1 Análise da expressão de *Foxp3* na célula humana de câncer de mama MCF7

Pelas complicações para usar linhagens primárias humanas, decidimos utilizar uma linhagem tumoral humana que apresenta expressão constitutiva de *Foxp3* e poderia ser utilizada como repórter para avaliação de vetores CRISPR/CAS dirigidos a inibição da expressão de *Foxp3* humano. Dados prévios de nosso grupo demonstraram a possibilidade de utilizar a linhagem MCF7, derivada de câncer de mama, pela sua alta expressão de *Foxp3*, confirmando dados da literatura (317).

Dessa forma, após a produção de vetores lentivirais para o sistema CRISPR/CAS, efetuamos a transdução de células MCF7, selecionadas com puromicina para o estabelecimento de linhagens com cada um dos candidatos de CRISPR, usando como controle o vetor vazio. Dessas linhagens isolamos RNA e analisamos a expressão de *Foxp3* com PCR quantitativo (Figura 15).

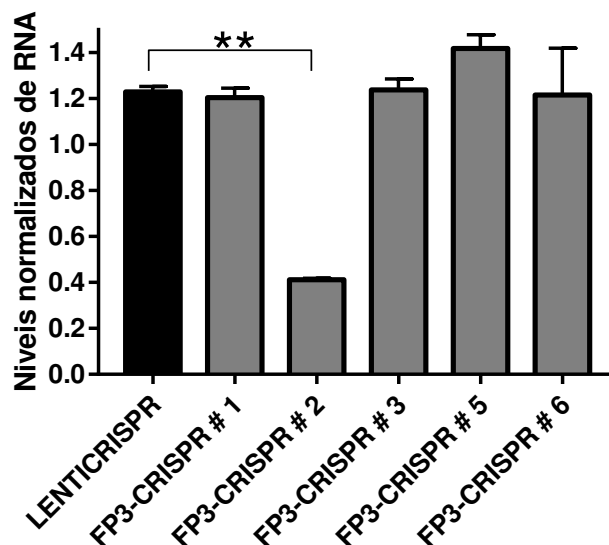


Figura 15 Análise da inibição de *Foxp3* em linhagens derivadas de MCF7 que expressam *Foxp3* e candidatos ssgRNA. Real time de linhagens estabelecidas por seleção com puromicina. Células transduzidas com o vetor vazio (LentiCRISPR). Teste de ANOVA e teste de múltipla comparação de Dunnett.

Conforme mostrado na Fig. 12, a linhagem estabelecida com o candidato FP3-CRISPR#2 apresenta uma diminuição na expressão do *Foxp3* normalizada por GAPDH e ACTB. Esse candidato foi o mesmo que conseguiu fazer inibição em células murinas.

4.10 O FOXP3 pode estar relacionado com a proliferação das células MCF7

O fato de algumas células tumorais apresentarem expressão de *Foxp3* causou curiosidade em investigar um pouco sobre um possível benefício desta expressão para o tumor. Sendo assim, solicitamos ajuda do Dr. Paulo Oliveira, responsável pela biologia computacional do CNPEM, para acessar softwares dedicados à varredura *in silico*, possibilitando correlacionar a expressão de *Foxp3* à expressão de outros fatores pró-tumorais que justificariam um benefício para o tumor. Neste sentido, aventamos que uma possibilidade seria do fator FOXP3 poder relacionar-se ao crescimento celular. Após de verificarmos a diminuição do *Foxp3* nas células tumorais MCF7 decidimos testar se a expressão do *Foxp3* poderia estar relacionada com a proliferação. Para esse experimento nós marcamos todas as linhagens de MCF7, previamente

estabelecidas com vetores lentivirais com os candidatos de sgRNA, com o corante de membrana CFSE e deixamos as células proliferando por 96 horas (Figura 16).

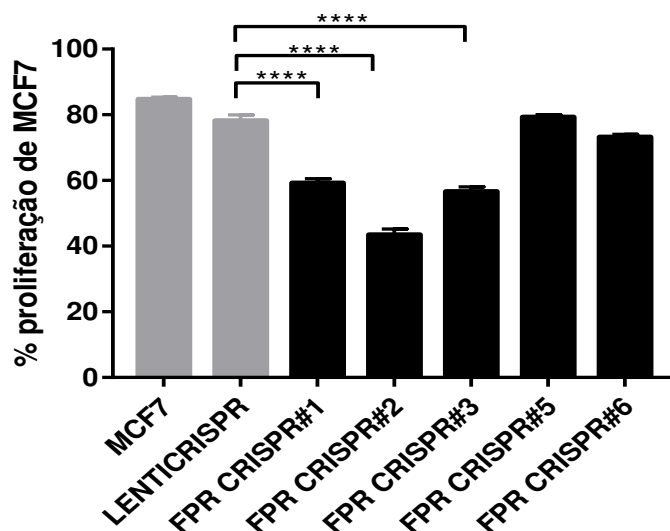


Figura 16 Análise da proliferação de linhagens derivadas de MCF7 que expressam os candidatos de sgRNA e a caspase 9. Análises de proliferação quantificando a expressão do marcador CFSE na membrana das células. Usou-se a linhagem parental MCF7 como controle junto com a linhagem que só expressa a caspase 9 sem nenhum sgRNA.

Conforme observamos na Figura 15, o candidato 2 que mostrou melhor inibição de FOXP3 também induziu uma redução na proliferação das células tumorais MCF-7 (Figura 16). Interessantemente os candidatos 1 e 3 também mostraram uma diminuição na proliferação apesar de não ter sido observado uma perda na expressão do FOXP3. Este resultado pode ser derivado do fato de que as mutações geradas pela CAS9 podem ainda produzir um mRNA que será detectado na análise de qPCR, mas que não é funcional. Estamos pesquisando mais sobre esse fato com análise da sequência de DNA.

4.11 O sistema CRISPR/cas pode ser veiculado por vetores retrovirais de forma específica em células CD4 humanas, inibindo-se a expressão de *Foxp3*.

O alvo central deste projeto consiste em inibir células T regulatórias de forma específica, para assim fortalecer a imunovigilância, possibilitando-se a detecção e eliminação de células tumorais. Conseguimos demonstrar, em

camundongos, a possibilidade de utilizar vetores virais e aptâmeros quiméricos para inativar *Foxp3* e inibir o potencial imunossupressor de Treg. Também demonstramos que esta alteração fenotípica fortaleceu a imunidade antitumoral *in vitro*. Como os vetores CRISPR/CAS que desenvolvemos também foram desenhados para silenciamento de *Foxp3* humano e dado que observamos o potencial de silenciamento em células tumorais MCF7 humanas, decidimos testar se conseguiríamos dirigir este vetor de forma alvo-específica para linfócitos humanos.

Sendo assim, verificamos que a linhagem linfocitária tumoral humana Jurkat apresentava expressão de *Foxp3* (317), e então, idealizamos utilizar um vetor viral com envelope derivado do HIV, para a transdução de células JURKAT. Efetuamos um ensaio piloto para medir a expressão de *Foxp3* por qPCR, em comparação a linhagem MCF-7, verificando consistência com a literatura (Figura 17A).

Como nossa preocupação era de utilizar um sistema de transdução próximo a realidade, precisaríamos checar se as células Jurkat seriam permissivas a transdução por vetores com envelope derivado do HIV, o que iria conferir a especificidade desejada, implementando-se um maior nível de segurança. Para isso, verificamos inicialmente se estas células apresentavam expressão de CD4 e CXCR4 (necessário para infecção do HIV), quando realizamos a citometria observamos uma alta expressão de CXCR4 (maior de 85%) mas só 3% eram positivas para CD4. Sendo assim, decidimos efetuar uma clonagem celular para enriquecer a população de células Jurkat CD4 positivas, obtendo cerca de 60% de positividade para CD4, no clone 12 (Figura 17B). Efetuamos um teste utilizando duas preparações virais distintas de um vírus codificando o gene repórter GFP. A primeira preparação continha o envelope VSVG, já descrito por seu amplo tropismo celular, e seria utilizada como controle positivo. A segunda preparação foi produzida com o envelope derivado do HIV, gentilmente fornecido pela Dra Barbara Schnierle, Paul-Echlich Institute – Alemanha. Os vetores foram produzidos no LVV/LNBio/CNPEM e utilizados para transdução de células Jurkat selecionadas. Conforme podemos observar na figura 18, o vetor VSVG possibilita a transdução de 97% das células, enquanto que o vetor com envelope HIV, denominado TR712, possibilita a transdução

dependendo da porcentagem de células CD4 positivas indicadas pela coloração na citometria de fluxo (Figura 17C).

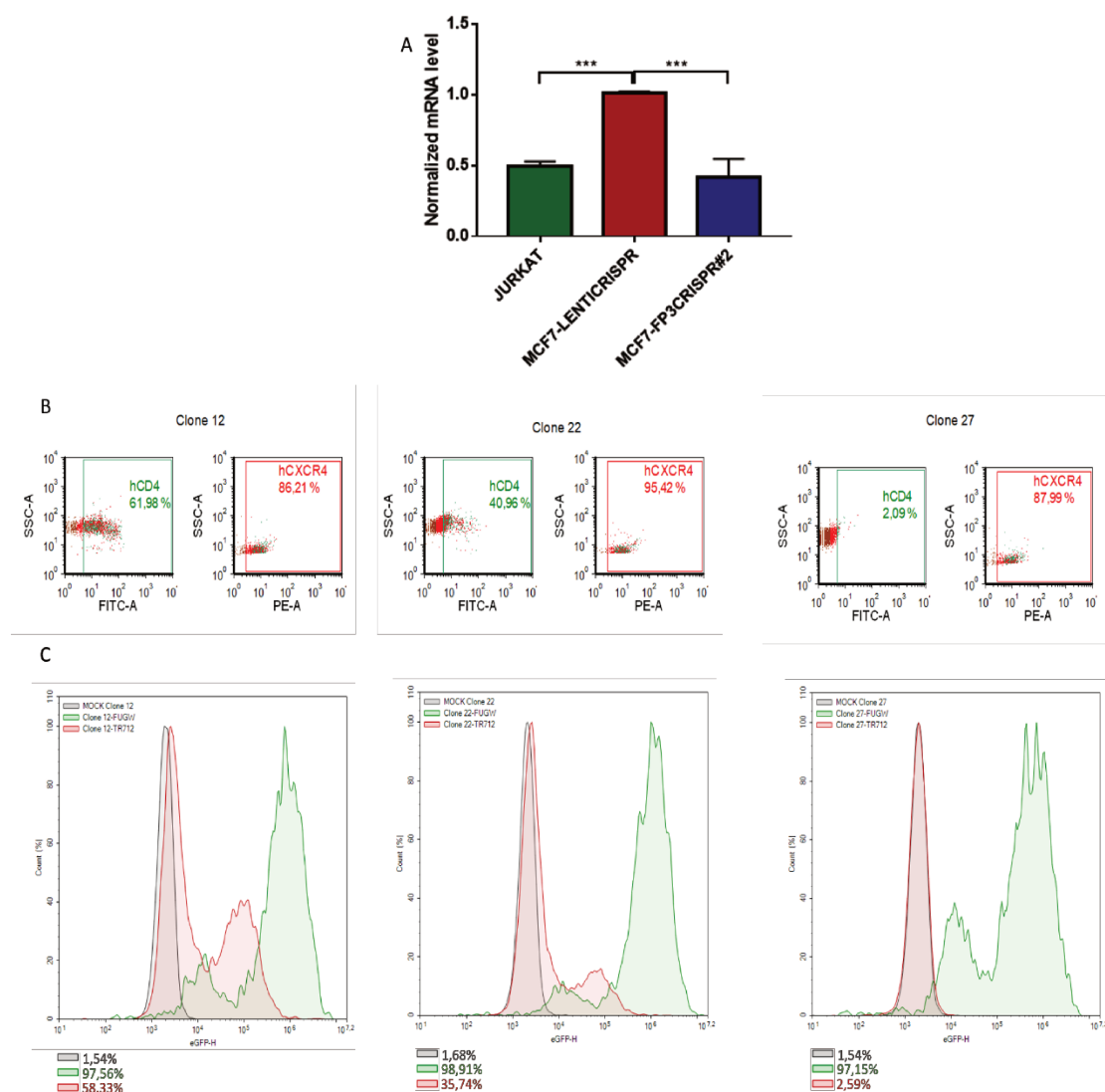


Figura 17 Expressão de Foxp3 e transdução específica da célula JURKAT. Por Real time foi avaliada a expressão do *Foxp3* na célula JURKAT, comparando com a MCF7 lentiCRISPR e a MCF7 FOXP3 CRISPR2 (A). Usando três clones diferentes com diferentes expressões de CD4 e CXCR4 (B) foi possível ver a especificidade do TR712 para transduzir células que expressam só CD4 e CXCR4 (C).

4.12 Experimentos in vivo, padronização de modelos para imunoterapia e exploração de vacinas antitumorais.

O modelo animal é fundamental para testar-se o benefício terapêutico de uma estratégia de imunomodulação antitumoral. Dessa forma, logo no início das atividades do doutorado, em paralelo ao desenvolvimento dos trabalhos com

biologia molecular e cultura de células, começamos a receber um treinamento com modelos animais. Inicialmente, nossa intenção era de padronizar um modelo que utiliza tumores singênicos derivados de melanoma murino. Escolhemos a linhagem de melanoma murino B16-F10, que apresenta o mesmo background genético de animais C57BL6 (318). A inoculação de tumores B16 em animais C57BL6 gera tumores que não são rejeitados pelos animais. Dessa forma, podemos utilizar esses animais imunocompetentes e desafiá-los com tumores singênicos, para avaliar o efeito de abordagens terapêuticas na redução ou eliminação tumoral. Dessa forma, nossa idéia, inicialmente, seria padronizar a injeção de tumor, rota de administração e comparar animais que receberam uma vacina antitumoral controle (GVAX, gentilmente cedida pelo Dr. Dranoff, Harvard) com animais não tratados, que receberam apenas tumores.

Como dispúnhamos de um conjunto de vetores construídos para gerar vacinas antitumorais, construídos pela estagiária Camila Marques Beraldo, de nosso grupo, decidimos estabelecer linhagens B16F10 e testar *in vivo*, efetuando combinações vacinais. Além disso, também desenvolvemos alguns ensaios *in vitro* que apresentaram grande correlação com os resultados *in vivo* e têm sido utilizados em outros projetos de nosso grupo.

Esses experimentos culminaram com a publicação de um artigo intitulado “Exploring Synergy in Combinations of Tumor-Derived Vaccines That Harbor 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF” e o preparo de um segundo manuscrito, submetido, intitulado: “Development Of A Flow Cytometry Assay Which Allows To Evaluate The Efficiency Of Immunomodulatory Vaccines To Enhance T Cell-Mediated Antitumor Response”.

Estes artigos são apresentados a seguir, como parte de nossos resultados na exploração de vacinas anti-tumorais e desenvolvimento de ensaios de imunomodulação *in vitro* e *in vivo*.

4.13Artigo I: Exploring Synergy in Combinations of Tumor-Derived Vaccines That Harbor 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF (Publicado) Link: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01150/full>



Exploring Synergy in Combinations of Tumor-Derived Vaccines That Harbor 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF

Andrea J. Manrique-Rincón^{1,2}, Camila M. Beraldo¹, Jessica M. Toscaro¹
and Marcio C. Bajgelman^{1,2,3*}

¹ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPq), Campinas, Brazil; ² Medical School, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ³ Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Shervin Sharma,
VA Greater Los Angeles
Healthcare System (VHA),
United States

Reviewed by:

Kawaji Kaur,
University of California, Los Angeles,
United States
Anna Karolina Kozłowska,
Poznan University of Medical
Sciences, Poland

*Correspondence:

Marcio C. Bajgelman
marcio.bajgelman@lnbio.cnpq.br

Specialty section:

This article was submitted to Cancer
Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 20 June 2017

Accepted: 31 August 2017

Published: 19 September 2017

Citation:

Manrique-Rincón AJ, Beraldo CM,
Toscaro JM and Bajgelman MC
(2017) Exploring Synergy in
Combinations of Tumor-Derived
Vaccines That Harbor 4-1BBL,
OX40L, and GM-CSF.
Front. Immunol. 8:1150.
doi: 10.3389/fimmu.2017.01150

Recent studies have demonstrated that combination of modulatory immune strategies may potentiate tumor cell elimination. Most strategies rely on the use of monoclonal antibodies that can block cell surface receptors to overcome tumor-induced immunosuppression or acting as costimulatory ligands to boost activation of T cells. In this study, we evaluate the use of combinations of genetically modified tumor-derived cell lines that harbor the costimulatory T cell ligands 4-1BB ligand, OX40L, and the cytokine GM-CSF. The aim of these treatments is to boost the activation of T cells and the elimination of cancer cells. These tumor-derived cells are able to activate or reinforce T cell activation, thereby generating a potent and specific antitumor response. We developed a high-content *in vitro* imaging assay that allowed us to investigate synergies between different tumor-derived cells expressing modulatory immune molecules, as well as the influence on effector T cells to achieve tumor cell death. These results were then compared to the results of *in vivo* experiments in which we challenged immunocompetent animals using the B16F10 syngeneic model of melanoma in C57BL/6 mice. Our results suggest that there is a substantial therapeutic benefit to using combinations of syngeneic tumor vaccines that express immune modulators. In addition, we observed that combinations of tumor-derived cells that expressed costimulatory ligands and GM-CSF induced a long-term protective effect by preventing cancer development in both cured and rechallenged animals.

Keywords: Immunotherapy, 4-1BB, OX40, GM-CSF, tumor-derived vaccines, cancer immunotherapy

INTRODUCTION

The development of strategies that induce T cell immune modulation has significantly enhanced the ability to treat cancer. The use of antibodies to block cell surface receptors known to be associated with lymphocyte immune suppression, such as CTLA4 and PD-1, has demonstrated a high degree of efficiency and clinical applicability. Although the outcomes of studies involving these therapies are encouraging, numerous cases of treatment resistance have been documented, leading therefore, to a need for new therapeutic approaches (1–3).

In addition to blocking antibodies, which are used as checkpoint inhibitors, antitumor responses can also be enhanced by agonists that signal costimulatory receptors, such as TNFRSF receptors promoting cell proliferation, inflammatory activity, and cytotoxicity. Among this class of costimulatory receptors, 4-1BB (also known as CD137 or TNFRSF9) promotes survival, clonal expansion, and the enhancement of activated T cells (4, 5). A substantial increase in the number of memory

cells was observed in transgenic animals that expressed the 4-1BB ligand (4-1BBL) and in animals that were stimulated using an anti-4-1BB agonist antibody (6). The 4-1BB receptor is also expressed in dendritic cells and its stimulation leads to increased levels of the cytokines IL6 and IL12, as well as the ligands B7-1 and B7-2A which can bind to CD28 to costimulate T cells (7). A 4-1BB agonist antibody has been shown to stimulate the immune system to eliminate established tumors in animal models (8–10). In light of these results, a human Phase I trial was performed in which human anti-4-1BB monoclonal antibodies were administered to patients with encouraging results, but a subsequent Phase II clinical trial reported severe adverse reactions that resulted from antibody toxicity, leading to the withdrawal of the protocol (11, 12). The recent data suggest that reducing the dose of this antibody and combining it with other therapies may improve its clinical benefits (13). Human clinical trials also have shown that melanoma-derived cells engineered to express 4-1BBL boosted the CD8-mediated antitumor response (14).

OX40 is another costimulatory receptor that also belongs to the TNFRSF family. OX40 (also known as CD134 or TNFRSF4) is constitutively expressed on the surface of activated T cells. Costimulation of OX40 induces proliferation and boosts lymphocyte activation. OX40 signaling enhances T cell longevity. A high level of OX40 expression in tumor-infiltrating lymphocytes has been correlated with decreased metastasis and better prognoses in patients (15, 16). Studies have also demonstrated that using an agonist antibody that targets the OX40 receptor may inhibit the FoxP3 transcription factor, which is associated with the maintenance of an immune suppressive phenotype in regulatory T cells (Tregs) (17, 18). Data in the literature indicate that anti-OX40 antibodies may cause Treg depletion (19, 20). The Phase I clinical trials have demonstrated that treatment with an anti-OX40 agonist antibody increased lymphocyte antitumor activity (21, 22).

Therapeutic strategies aimed at costimulatory T cells and increasing antigen presentation can act in synergy. In this way, the activation of dendritic cells via the cytokine GM-CSF can induce, for example, CTL activation. Genetically modified syngeneic tumor cells that express the cytokine GM-CSF have been used as an anti-tumor vaccine that inhibit the formation of tumors in animals (23). This effect in animals was surprising, but the same result was not observed in clinical trials, indicating that it is necessary to improve therapeutic strategies (24).

Since T cells play a major role in eliminating cancer cells, *in vitro* assays can be used to evaluate enhancement of T cell activity, thereby investigating therapeutic benefits of new approaches. A gold standard assay for measuring the activity of CTLs is based on quantification of the chromium (51Cr), released by tumor cells as they die by the action of the CTLs (25). An alternative to this assay consists in quantifying the incorporation of tritiated thymidine ([3H]-TdR) into target cells (26). To overcome handling issues associated with the use of radioactive materials, other methodologies have been developed that employ measurement of leaking enzymes of dead cells, such as lactate dehydrogenase, associated with enhancement of toxicity (27) and accurate methodologies like the ELISPOT, which allows profiling of T cell response and quantification of cytokines (28). There are also flow cytometry-based methods which use 7-AAD DNA-labeled target cells (29)

or even bioluminescence assays based on luciferase-expressing target cells, which are robust and faster than a Chromium assay (30). The fluorolysometric based assay can employ GFP-expressing cells as target cells. In this way, the killing ability of effector T cells can be estimated by flow cytometry, quantifying GFP-positive cells, with a fluorescence microscope to count GFP-positive cells, or even by a fluorescence plate reader measuring the leak of GFP from dead cells. The fluorolysometric assay is highly sensitive when compared to other assays that use radioactive materials or substrates for bioluminescence reactions (31).

In this work we developed a high-content imaging *in vitro* assay that allows exploration of the cytotoxicity mediated by T cells, induced by immunomodulatory antitumor vaccines. This assay is based on genetically modified tumor cells that simultaneously coexpress a single immunomodulator and the GFP reporter gene. The immunomodulatory GFP-expressing cells can be combined and cocultivated with T cells. If T cells are costimulated, killing of the immunomodulatory target cell is enhanced. The GFP marker is used as a parameter to count live cells by the high-content imaging system.

This *in vitro* assay provides three possibilities to explore: (i) monitoring mediated CTL killing of target cells, (ii) assessment of CTL profiling by flow cytometry, and (iii) quantification of cytokines in the supernatant. In this manner, the high-content imaging assay allowed exploration of the synergistic combination of tumor-derived cells that harbor immunomodulators with the aim of enhancing antitumor responses. We also performed assays using C57BL/6 immunocompetent animals that were challenged with syngeneic melanoma-derived B16 tumors. These combinations of tumor-derived vaccines may provide a substantial therapeutic benefit, contributing to the development of new approaches to treating human cancer.

MATERIALS AND METHODS

Retroviral Vector Preparations

The cDNA encoding the immunomodulators OX40L and 4-1BBL was amplified by PCR from splenocytes isolated from C57BL/6 animals and cloned into pCL retroviral vectors (32). The cDNA of eGFP was isolated from FUGW lentiviral vector (33) and cloned into pBabe retroviral vector (34). Virus preparations were generated by transient transfection on 293 T cells and titrated by flow cytometry (35) by Viral Vector Laboratory at LNBio—CNPEM.

Establishment and Culture of Cell Lines

All the cell lines were derived from the poorly immunogenic mouse melanoma cell line B16F10. Cell cultures were transduced using a retrovirus and selected with G418 or puromycin. The pCL vectors encode G418 resistance and the pBabe vector encodes puromycin resistance. The G418-resistant clones were analyzed by flow cytometry using antibodies anti-OX40L (eBiosciences clone RM134L) and anti-4-1BBL (eBiosciences clone TKS-1). We have chosen high-expression clones to establish the cell lines B16-OX40L and B16-4-1BBL. Next, we transduced B16-4-1BBL, B16-OX40L, and B16-GM-CSF (kindly provided by Dr. Glen Dranoff, Harvard, USA) using the retroviral vector pBabe-eGFP,

which also harbors a puromycin selection cassette. Clones were analyzed using flow cytometry to select cells with a high level of GFP expression and also a high expression level of immunomodulators like 4-1BBL and OX40L. The B16-GM-CSF was also analyzed by flow cytometry for GFP and GM-CSF using a quantitative assay to determine secreted GM-CSF by ELISA (duo set ELISA kit, R&D).

Mice

C57BL/6 mice (female, 8 weeks old, average weight 20 g) were purchased from CEMIB-UNICAMP, maintained in microisolator cages and treated in accordance with CNPEM Laboratory Animal Care regulations. The experiments completed during this study were approved by the Animal Care and Use Committee of the CNPEM, protocol CEUA—15/2015.

Primary T Cell Isolation

In brief, primary CD4 and CD8 T cells were isolated from splenocytes using negative selection via the EasySep mouse CD4+ or CD8+ T cell enrichment kit (STEMCELL Technologies). The purity of CD4 and CD8 was tested after isolation by flow cytometry and was higher than 90%. These CD4 and CD8 T cells were activated for 24 h with CD3e (TONBO biosciences clone 145-2C11) and CD28 (TONBO biosciences clone 37.51) at a concentration of 1 µg/mL. Cells were cultivated in a complete medium (CM) containing RPMI (1% penicillin/streptomycin, 1% HEPES, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% glutamine, 10% bovine fetal serum, and 50 µM β-mercaptoethanol).

In Vitro Assays

Cells were cultivated into 96-well plates. Plates were seeded with a total of 1,400 adherent B16-derived cells that harbored GFP and immunomodulators, as indicated. After the cells were incubated for 24 h, 1,400 freshly isolated splenocytes, CD4, or CD8 cells were added, as indicated.

The cocultured cells were incubated with CO₂ at 37°C for the indicated times. The CM was removed from the plates and the cells were then fixed in 4% paraformaldehyde and stained with DAPI (Sigma). The plates were scanned (27 fields-of-view/well) using an Operetta HTS imaging system (PerkinElmer) equipped with a 20× air objective lens. The excitation channels 360–400 and 460–490 and the emission filter channels 410–480 were used for eGFP, while 500–550 was used for DAPI. The images were then analyzed using Columbus (version 2.4.0 PerkinElmer).

Flow Cytometry

Isolated or cultured cells were harvested, centrifuged at 300 g, and resuspended in 5% FBS-1× PBS. They were then stained with the indicated antibodies. The tumor-infiltrating lymphocytes were isolated from mice tumors, which were removed and mechanically dissociated by pushing tissue through a 70 µm strainer. The cells were then treated with ACK for 5 min on ice, washed with 1× PBS and centrifuged. We subsequently separated a fraction enriched with TILs using a 100% Ficoll Isopaque gradient. Then the cells were washed, resuspended in 5% FBS-1× PBS and stained with CD4 and CD8. After fixation and permeabilization of cells using Transcription Factor Staining Buffer Kit (Tonbo) we used

an antibody against FOXP3. We used the following antibodies conjugated to fluorophores: CD4-FITC (TONBO biosciences clone GK 1.5), CD8a-PE (Biolegend clone 53-6.7), FOXP3-APC (eBiosciences clone FJK-16S) and isotype IgG2a, kappa-APC.

Tumor Inoculation and Treatment

Mice were subcutaneously (sc) injected in the right flank with 5×10^4 B16F10 cells in 100 µL of PBS. They were injected sc into the left flank on days 1, 4, and 7 with 1×10^6 irradiated (50 Gy) B16F10 cells that expressed GM-CSF (Gvax), OX40L, 4-1BBL, or a combination of these cell lines ($n = 10$). We injected the total amount of 1×10^6 irradiated immunomodulatory cells into each mouse, per vaccination, employing 5×10^5 of each cell line when combining two cell lines and 3.33×10^5 of each with the triple combination of GM-CSF + OX40L + 4-1BBL.

Tumor growth is expressed as the percentage of tumor-free mice among all injected mice on all days. Tumor size was measured using a caliper and calculated using the following equation: [(longest diameter × shortest diameter × diagonal diameter × 3.141599)/6] in cubic millimeters. Mice in which no tumors were detectable were rechallenged sc with 5×10^4 B16F10 cells in the lower left flank and monitored for tumor growth.

Histology and Immunofluorescence

Dissected B16F10 mouse tumors were embedded in Tissue-Tek OCT and frozen in liquid nitrogen. Sectioned specimens were washed with 1× PBS (pH 6.8) and incubated with glycine (0.1 M) for 30 min followed by incubation with 1% BSA for 1 h. These samples were then incubated overnight with anti-rat CD8a (eBiosciences) with a 1:100 dilution at 4°C. The slides were subsequently washed and incubated with secondary anti-rat conjugated to FITC antibodies (Invitrogen) with a 1:500 dilution at room temperature for 1 h. Nuclear staining was performed using Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Images were captured using a Leica Confocal Microscope and images were analyzed using LAS AF software (LEICA).

Statistical Analysis

All data were analyzed using Prism 7.0 (GraphPad software). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. Tumor survival data were analyzed using the Kaplan–Meier method. The log-rank Mantel–Cox test was used to compare survival curves between different groups. Graphs show the mean and error bars, indicating the SEM of two to four independent experiments performed on different days.

RESULTS

Combinations of Tumor-Derived Cells Expressing 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF Act Synergistically Enhancing the Activity of CTLs

We developed a high-content *in vitro* imaging assay that allowed us to evaluate the efficiency of antitumor vaccines and combination of costimulatory molecules. Tumor cells that

expressed GFP and immunomodulators were incubated with CD4, CD8, or splenocytes. If tumor cells were killed, it suggested a therapeutic benefit. To estimate the therapeutic benefit of monotherapies as tumor-derived vaccines, the tumor cells were incubated with activated T cells or non-primed splenocytes for 24, 48, 72, and 96 h and then analyzed using high-content imaging to count the remaining live cells (Figure S1 in Supplementary Material).

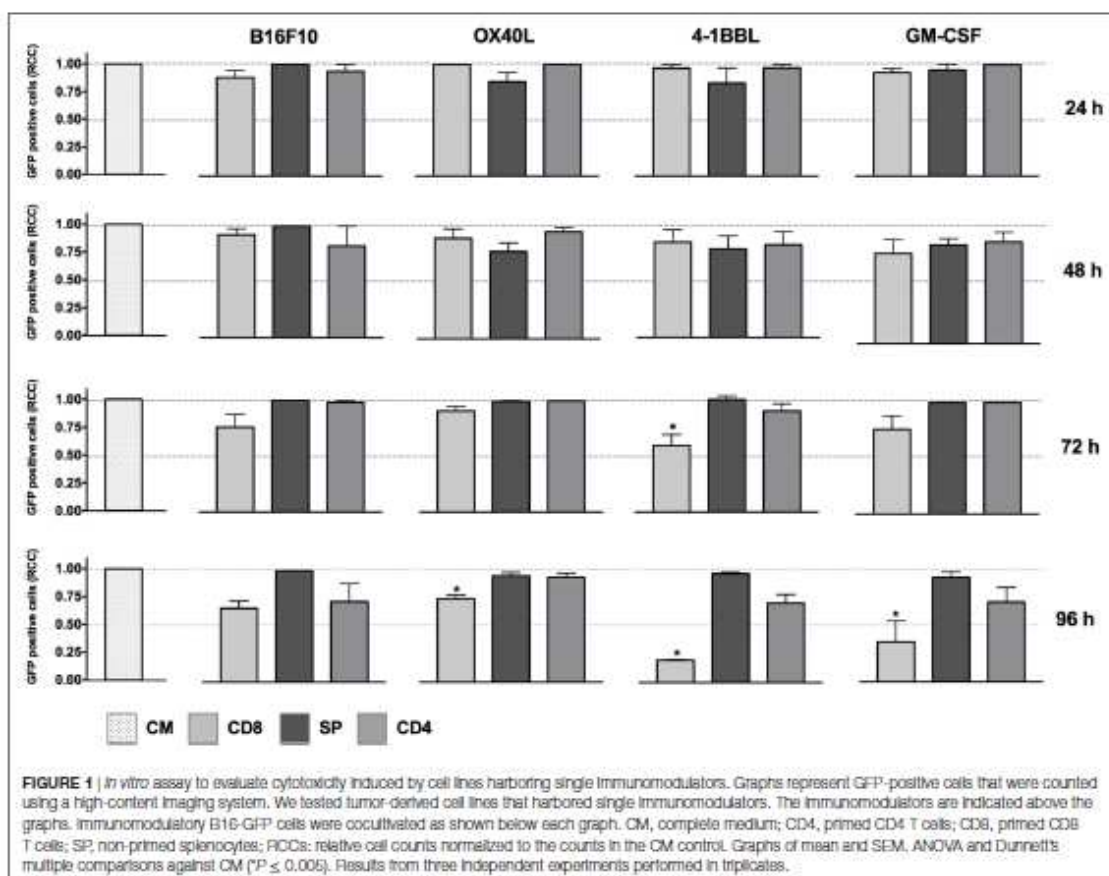
The cytotoxic activity of CD8 T cells was boosted in the presence of tumor-derived cells expressing 4-1BBL when employed as single vaccines, as shown in Figure 1. In contrast, we did not see any effect with the non-primed splenocytes using the single vaccines and just a slight reduction of tumor cells mediated by CD4 T cells in the conditions of GM-CSF and 4-1BBL at 96 h.

We next tested all the possible combinations of B16F10-derived cells expressing GM-CSF, 4-1BBL, and OX40L (Figure 2). We observed that combination of two tumor-derived cells, harboring immunomodulators, induced a significant CD8 T cell mediated cytotoxicity. However, the response of CD4, CD8, and splenocytes was improved when they were in contact with the triple combination of tumor-derived cells, showing

an early and strong induction of cytotoxicity. Strikingly, we observed a cytotoxic effect mediated by immunomodulation of CD4 T cells after 72 h. To better understand this observation of cytotoxicity, we performed an INF- γ test with supernatants of preactivated CD4 T cells that were incubated with target cells, finding the highest expression for the double combination GM-CSF + 4-1BBL followed by the triple combination of GM-CSF + OX40L + 41BBL (Figure 3).

The Combination of Immunomodulatory Tumor-Derived Cells Boosts T Cell Activation and Enhances Antitumor Response

When freshly isolated splenocytes were first incubated with immunomodulatory B16F10-derived cells and then added to parental B16F10-GFP cells that lacked immunomodulators, we observed a substantial cytotoxic effect on tumor cells. We detected a stronger cytotoxic activity using the combinations of cells harboring 4-1BBL + OX40L, GM-CSF + OX40L, and 4-1BBL (Figure 4A). An enrichment of CD4 and CD8 T cells was



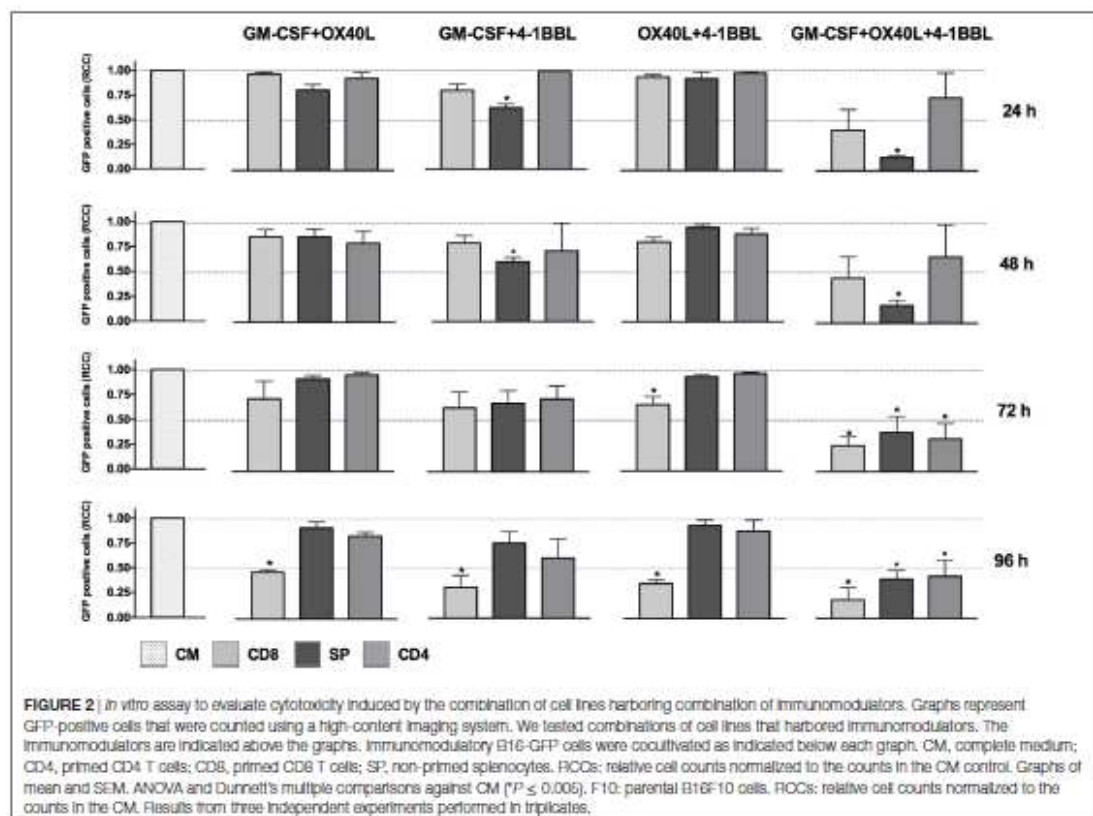


FIGURE 2 | *In vitro* assay to evaluate cytotoxicity induced by the combination of cell lines harboring combination of immunomodulators. Graphs represent GFP positive cells that were counted using a high-content imaging system. We tested combinations of cell lines that harbored immunomodulators. The immunomodulators are indicated above the graphs. Immunomodulatory B16-GFP cells were cocultured as indicated below each graph. CM, complete medium; CD4, primed CD4 T cells; CD8, primed CD8 T cells; SP, non-primed splenocytes. RCCs: relative cell counts normalized to the counts in the CM control. Graphs of mean and SEM. ANOVA and Dunnett's multiple comparisons against CM (* $P < 0.005$). F10: parental B16F10 cells. RCCs: relative cell counts normalized to the counts in the CM. Results from three independent experiments performed in triplicates.

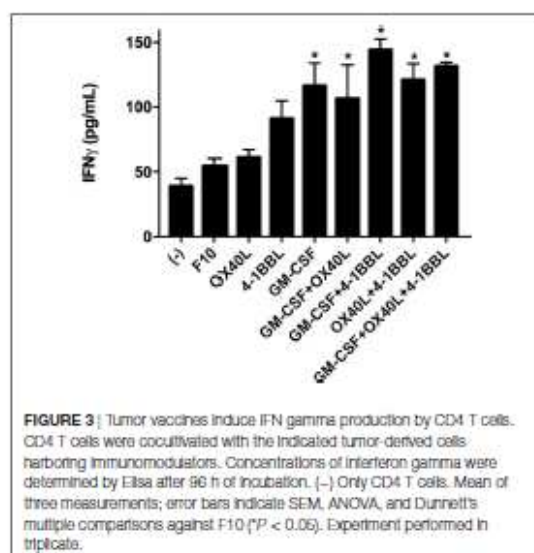
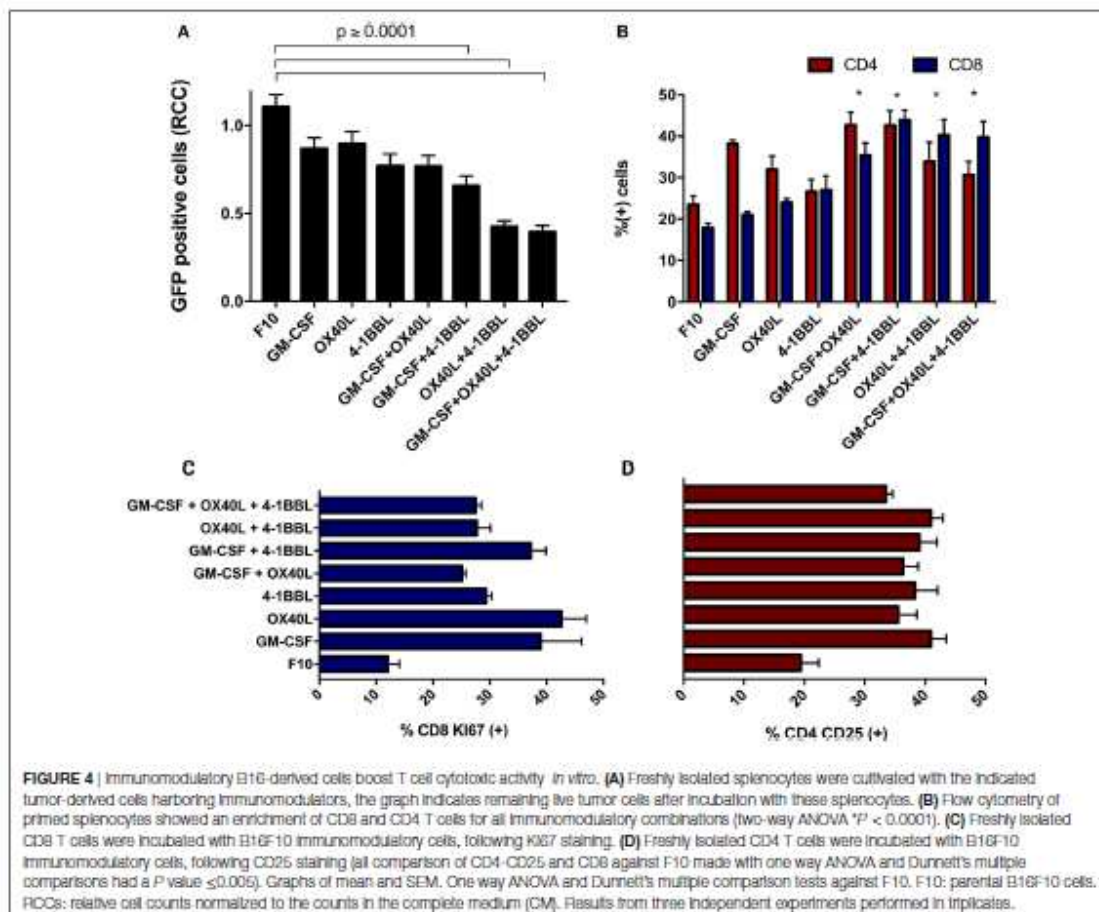


FIGURE 3 | Tumor vaccines induce IFN gamma production by CD4 T cells. CD4 T cells were cocultured with the indicated tumor-derived cells harboring immunomodulators. Concentrations of interferon gamma were determined by ELISA after 96 h of incubation. (-) Only CD4 T cells. Mean of three measurements; error bars indicate SEM. ANOVA, and Dunnett's multiple comparisons against F10 (* $P < 0.05$). Experiment performed in triplicate.

observed in all the combinations (Figure 4B), suggesting a boost in the proliferation of these subsets. We also observed an overall increase in the proliferation of CD8 T cells (Figure 4C) and an increased activation of CD4 T cells (Figure 4D) in all the cells expressing immunomodulatory molecules.

The Combination of Immunomodulatory Tumor-Derived Vaccines Enhances Tumor Rejection *In Vivo*

To explore the therapeutic benefit of using combinations of immunomodulatory tumor-derived cells, we performed *in vivo* experiments using immunocompetent animals challenged with the syngeneic B16 tumor-derived melanoma. The parental B16 cells were given subcutaneously, followed by irradiated immunomodulatory B16F10-derived cells (Figure 5A). Our results suggest that all combinations were able to boost an antitumor immune response. When we analyze the survival fractions (Figure 5B), it is possible to identify three groups of the anti-tumor response. The group without treatment and the lowest survival fraction that was only given 1x PBS, the group treated with the triple combination (4-1BBL + OX40L + GM-CSF) that had an intermediate response and, finally, a group with the



highest survival fraction, that was given the double combinations (4-1BBL + OX40L, GM-CSF + 4-1BBL, GM-CSF + OX40L).

In addition, it was observed that all the combinations showed an elevated ratio of CD8/Treg in tumor sites when compared to non-treated animals (Figure 5C; Figure S2 in Supplementary Material). An examination of tumor histology has shown an increased infiltration of CD8 T cells in treated animals when compared to non-treated animals (Figures 5D,E).

Combining Immunomodulatory Tumor-Derived Vaccines Induces an Increased Protective Effect in Cured and Rechallenged Animals

To investigate whether antitumor vaccines provide long-term protection, we rechallenged 16 cured animals that were previously challenged once with the combinations. In this way, on day 30 (Figure 5A), these animals were given new injections of parental B16-F10 tumor cells monitoring tumor growth. As

shown in Figure 6, we observed increased survival in the animals that received a combination that included cells harboring OX40L plus 4-1BBL and GM-CSF plus 4-1BBL.

DISCUSSION

Despite therapeutic advances in monoclonal antibody therapies, cases of toxicity and refractory patients continue to be described (11–13). It is therefore necessary to pursue new approaches to improving immunotherapy. In this study, we have explored the effectiveness of combinations of genetically modified tumor cells that express T cell costimulatory ligands and the cytokine GM-CSF. Other groups have described the use of tumor-derived cell lines that coexpress different immunomodulators within the same cell line or the coadministration of tumor vaccines and antibodies (36–39). In contrast, we established different tumor-derived immunomodulatory cell lines, each harboring only a single immunomodulator. We combined these tumor-derived

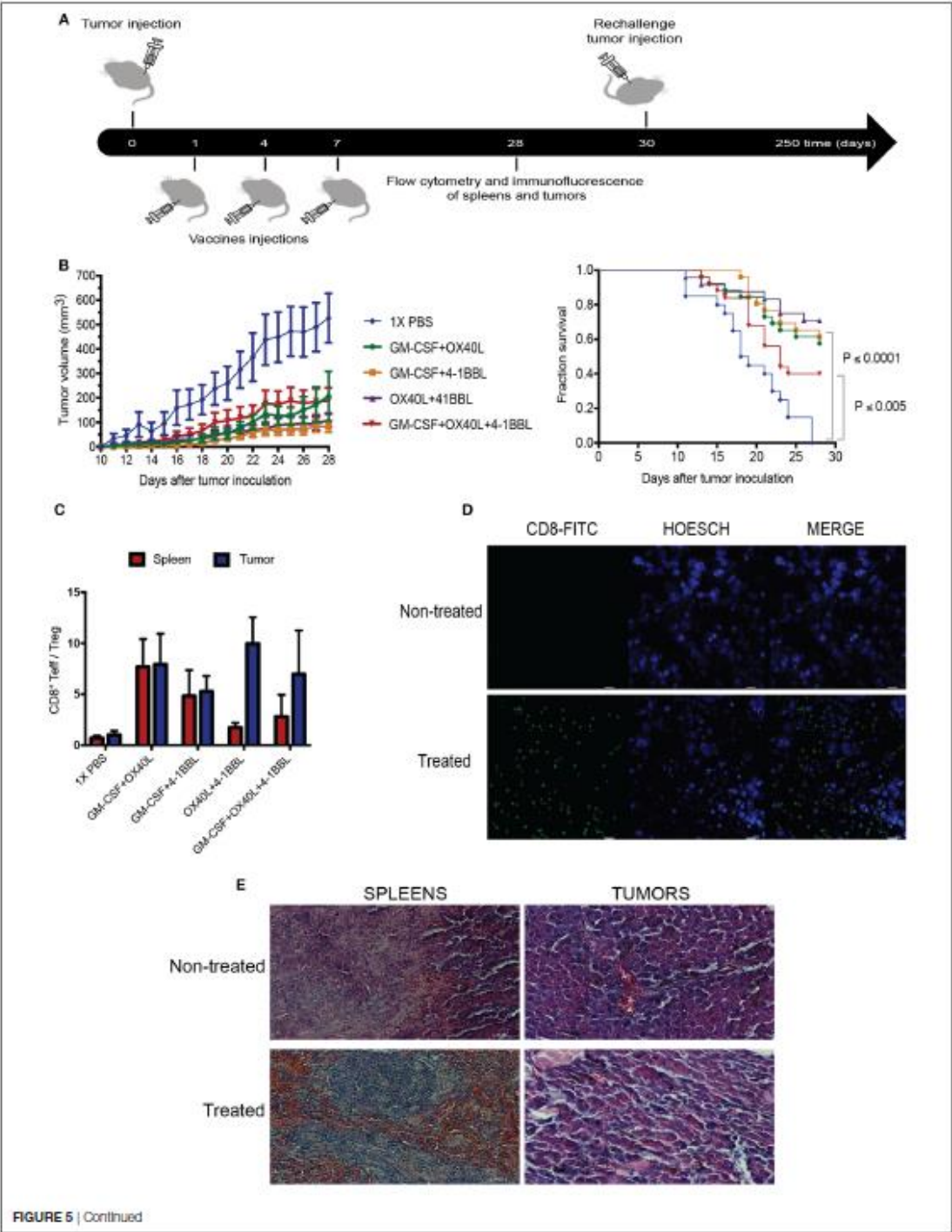


FIGURE 5 | Continued

Combination of tumor-derived vaccines harboring immunomodulators enhance antitumor response. **(A)** Experimental design for *in vivo* experiment. Tumors were injected on day 0, following injections of irradiated immunomodulatory B16-derived cells on days 1, 4, and 7. On day 28, animals were sacrificed, performing analysis of lymphocytes in tumors and spleens by flow cytometry and immunofluorescence. Tumor-free mice were rechallenged on day 30 and monitored for more than 250 days. **(B)** Tumor growth and survival curves in C57BL/6 mice bearing subcutaneous B16F10 tumors, mice were treated with PBS or 1×10^6 cells of different combinations of irradiated immunomodulatory B16-derived cells. These cumulative survival curves and tumor progression graph represent three independent experiments ($n = 10$ mice per group) the log-rank Mantel-Cox test was used to compare survival curves between different groups. **(C)** An analysis of tumor infiltrate lymphocytes and lymphocytes in spleens using flow cytometry reveals that the ratio of CD8/Tregs was increased by all immunomodulatory combinations. **(D)** Immunofluorescence of tumors reveals CD8 enrichment in animals treated with immunomodulatory vaccines. (This image is representative of all conditions challenged with double and triple combinations since no significant differences were observed among these groups.) **(E)** Histological analysis with hematoxylin-eosin of tumor and spleens of animals treated with the immunomodulatory vaccines. (This image is representative of all conditions challenged with double and triple combinations since no significant differences were observed among these groups.) and non-treated mice. Data are shown as the mean $\pm$ SEM. The ratio of CD8/Tregs equal to CD8 positive cells divided by FOXP3 positive cells (CD8⁺/Treg ratio). Results are pooled from three independent experiments ($n = 10$ per experimental condition for each experiment).

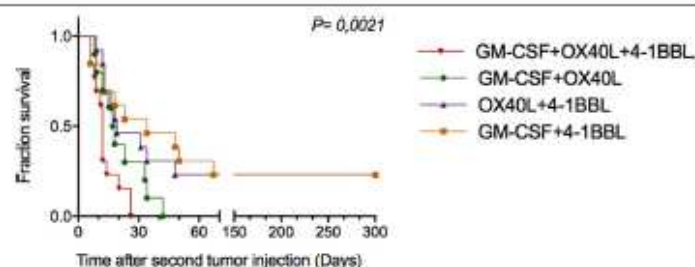


FIGURE 6 | Combinations of immunomodulatory tumor-derived vaccines prevent tumor progression in previously cured and subsequently rechallenged animals. Thirty days after the first challenge, animals that were free of tumors were rechallenged with parental B16F10 cells. The graph shows the cumulative survival curves for three independent experiments ($n = 12$ mice per group). The survival curves were analyzed using the Log-rank test.

cell lines to investigate synergies to enhance antitumor response. Establishing immunomodulatory cell lines harboring a single immunomodulator increases flexibility to test different combinations. In addition, it is also possible to test combinations using different amounts of immunomodulatory tumor-derived cells and different vaccination protocols for the further investigation of increased therapeutic benefits.

We developed a high-content *in vitro* imaging assay that allowed us to investigate T cell-mediated antitumor responses. This assay is based on counting target cells that simultaneously coexpress an immunomodulator and the GFP reporter gene, in contrast to fluorolysometric assay described in the literature in which target cells encode only the reporter gene (31). In this manner, the same target cell that costimulates T cells can be used as a reporter to monitor T cell-mediated cytotoxicity. Compared to the fluorolysometric assay, the high-content imaging system just uses GFP to count cells and does not depend on measuring fluorescence intensity. This feature is an advantage since GFP is highly stable and can accumulate in the cytoplasm, biasing reproducibility of the assay.

When we performed *in vitro* assays using single immunomodulators, we observed an increased cytotoxic activity mediated by CD8 T cells in tumor-derived cells harboring 4-1BBL, after 96 h (Figure 1). This observation was supported by data in the literature that have associated enhanced T cell activity with the costimulation of 4-1BB (4, 5, 8). However, the cytotoxic effect was enhanced in the presence of combinations

of GM-CSF + OX40L, GM-CSF + 4-1BBL, 4-1BBL + OX40L, 4-1BBL + OX40L + GM-CSF (Figure 2). Of note was the fact that some of the immunomodulatory cell lines, or their combinations, were associated with an enhancement of cytotoxicity mediated by preactivated CD4 T cells (Figure 2).

We performed an IFN- γ test in the supernatant of cell cultures (Figure 3) that can suggest a driving of the CD4-T cells to a Th1 phenotype. We observed an increased level of IFN- γ for all the combinations of immunomodulatory cell lines and a mild increase in the cytotoxicity induced by single immunomodulatory tumor-derived cells expressing 4-1BBL or GM-CSF (Figure 1, 96 h). The effect of GM-CSF increasing expression of IFN- γ by T cells was already reported in the literature (40). On the other hand, we observed an enhanced cytotoxic effect mediated by CD4 T cells for the double combination GM-CSF + 4-1BBL (Figure 2, 96 h) and the triple combination (Figure 2, 24–96 h). In both of these conditions, we had the highest CD4 mediated cytotoxic effect and detected the highest levels of secreted IFN- γ (Figure 3).

The CD4-mediated cytotoxicity is sustained by literature data, suggesting tumor-specific CD4 T cells contribute to B16F10 elimination (41–44). It was also observed that 41BB-L and OX40-L could trigger CD4 T cell cytotoxic response in viral infections (45). In this way, as seen in Figure 2, the triple combination of OX40L, 4-1BBL, and GM-CSF boosts the activity of cytotoxic CD4 T-cells against tumor cells *in vitro*.

It is interesting to note, that animals challenged with monotherapies, using our vaccination protocol, developed tumors

faster (data not shown) and the antitumor effect was improved with the combinations, which correlates with the results of the high-content imaging assays. The combinations of antitumor vaccines that encode 4-1BBL and OX40L confer a therapeutic benefit comparable to that of combinations including GM-CSF and 4-1BBL, resulting in the inhibition of tumor growth (Figure 5B). The analysis of T cell infiltrates in the tumor sites revealed that all combinations of tumor-derived vaccines induced an increased CD8 T cell infiltration (Figure 5D) and enhanced the CD8/Treg ratio (Figure 5C). Since Tregs antagonize antitumor response, the inhibition of these cells should contribute to reinforcing antitumor response (46–49).

Although the combination of the three immunomodulatory vaccines has shown a substantial enhancement of T cell mediated cytotoxicity *in vitro*, we did not observe an outstanding effect *in vivo*, when compared with the double combinations. We hypothesized that this observation might be explained by a dose-dependent decrease of therapeutic effect *in vivo*, which is associated with a reduction in the dose of immunomodulatory cells, as supported by the literature (50). Since we used a total amount of one million immunomodulatory cells for all experimental groups, even for single vaccines or combinations, animals vaccinated with the triple combination were given only one-third of each immunomodulatory cells, which could reduce the therapeutic effect. Literature data also report utilization of one million irradiated cells or above, for *in vivo* experiments (41, 51). Some clinical trials, using GVAX also reported a dose-dependent effect that correlates an enhanced therapeutic benefit using a high dose of injected GM-CSF expressing cells, in patients with melanoma (52), prostate cancer (53), non-small-cell lung carcinoma (54) and other tumors (55). Therefore, further experiments are necessary to explore the therapeutic benefit of tumor-derived vaccines employed as triple combinations, increasing the number of injected cells.

A relevant point of this work was to observe the therapeutic benefit of tumor-derived vaccines on re-challenged animals. We observed that a combination of tumor-derived cells harboring 4-1BBL and GM-CSF or 4-1BBL and OX40L conferred protection to rechallenged animals.

REFERENCES

1. Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, Sharma P, Allison JP. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med* (2014) 211(4):715–25. doi:10.1084/jem.20130590
2. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* (2014) 371(23):2189–99. doi:10.1056/NEJMoa1406498
3. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DE, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* (2012) 366(26):2443–54. doi:10.1056/NEJMoa1200690
4. Kim YJ, Kim SH, Mantel P, Kwon BS. Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *Eur J Immunol* (1998) 28(3):881–90. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<881::AID-IMMU881>3.0.CO;2-0
5. Kwon BS, Hurtado JC, Lee ZH, Kwack KB, Seo SK, Choi BK, et al. Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* (2002) 168(11):5483–90. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5483

These results of tumor inhibition experiments suggest that antitumor vaccination provides an increased protective effect that might enhance immune memory (6). Taken together, these results may contribute to the development of new therapeutic approaches for the treatment of human cancer based on combinations of tumor-derived vaccines harboring immunomodulators.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the Laboratory Animal Care regulations. The protocol was approved by the Animal Care and Use Committee (CEUA) from CNPEM, protocol # 15/2015.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MB: formulated the original problem, designed experiments, analyzed data, wrote the manuscript, and gave the final approval of the version to be published. AM-R: designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. CB: assisted *in vitro* experiments. JT: assisted *in vitro* and *in vivo* experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Eli Gilboa for participating in scientific discussions and providing opinions. We thank Viral Vector and Genome modification laboratories, LNBio—CNPEM for providing the viral vector preparations and animal facility, as well as Dr. Silvio Consonni for his help with histology techniques and Dr. Michael Miller for the reviewing of this manuscript. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (Grants MCB-2012/13132-0 and MCB-2015/01488-2 and the fellowship AJMR-2013/02041-6).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01150/full#supplementary-material>.

6. Zhu Y, Zhu G, Luo L, Flies AS, Chen L. CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype. *Blood* (2007) 109(11):4882–9. doi:10.1182/blood-2006-10-043463
7. Futagawa T, Akiba H, Kodama T, Takeda K, Hosoda Y, Yagita H, et al. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* (2002) 14(3):275–86. doi:10.1093/intimm/14.3.275
8. Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* (1997) 3(6):682–5. doi:10.1038/nm0697-682
9. Houot R, Goldstein MJ, Kohrt HE, Myklebust JH, Alizadeh AA, Lin JT, et al. Therapeutic effect of CD137 immunomodulation in lymphoma and its enhancement by Treg depletion. *Blood* (2009) 114(16):3431–8. doi:10.1182/blood-2009-05-223958
10. Gauttier V, Jador JP, Le Guen V, Cany J, Ferry N, Conchon S. Agonistic anti-CD137 antibody treatment leads to antitumor response in mice with liver cancer. *Int J Cancer* (2014) 135(12):2857–67. doi:10.1002/ijc.28943
11. Ascierto PA, Strome E, Sznol M, Fu YX, Melero I. Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol* (2010) 37(5):508–16. doi:10.1053/j.seminoncol.2010.09.008

12. Szolnoki M, Hodi FS, Margolin K, McDermott DJ, Ernstoff MS, Kirkwood JM, et al. Phase I study of BMS-663513, a fully human anti-CD137 agonist monoclonal antibody, in patients (pts) with advanced cancer (CA). *J Clin Oncol* (2008) 26(15 suppl):3007. doi:10.1200/jco.2008.26.15_suppl.3007
13. Segal NH, Logan TF, Hodi FS, McDermott DJ, Melero I, Hamid O, et al. Results from an integrated safety analysis of urelumab, an agonist anti-CD137 monoclonal antibody. *Clin Cancer Res* (2017) 23:1929–36. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1272
14. Engelstein R, Merlino S, Eisenberg G, Cohen J, Frank S, Hamburger T, et al. Immune monitoring of patients treated with a whole-cell melanoma vaccine engineered to express 4-1BBL. *J Immunother* (2016) 39(8):521–8. doi:10.1097/JCI.0000000000000138
15. Petty JK, He K, Corless CL, Vetto JT, Weinberg AD. Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *Am J Surg* (2002) 183(5):512–8. doi:10.1016/S0002-9610(02)00831-0
16. Ladanyi A, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Gaudi I, Timar J. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* (2004) 10(2):521–30. doi:10.1158/1078-0432.CCR-1161-03
17. Picotese S, Valzastria B, Colombo MP. OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J Exp Med* (2008) 205(4):825–39. doi:10.1084/jem.20071341
18. So T, Croft M. Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+ Foxp3+ T cells. *J Immunol* (2007) 179(3):1427–30. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1427
19. Bulliard Y, Jolicoeur R, Zhang J, Dranoff G, Wilson NS, Bragdon JL. OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating Fc-gammaRs, leading to antitumor efficacy. *Immunol Cell Biol* (2014) 92(6):475–80. doi:10.1038/icb.2014.26
20. Marabelle A, Kohrt H, Sagiv-Barfi I, Ajami B, Astell RC, Zhou G, et al. Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *J Clin Invest* (2013) 123(6):2447–63. doi:10.1172/JCI64859
21. Curti BD, Kovacs-Bankowski M, Morris N, Walker E, Chisholm L, Floyd K, et al. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res* (2013) 73(24):7189–98. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4174
22. Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, Soria JC, Zitvogel L, Marabelle A. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* (2016) 52:50–66. doi:10.1016/j.ejca.2015.08.021
23. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993) 90(8):3539–43. doi:10.1073/pnas.90.8.3539
24. Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W, Huber C, Parmiani G, Scholl S, et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* (2014) 11(9):509–24. doi:10.1038/nrclinonc.2014.111
25. Brunner KT, Maudel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro: inhibition by isocitrate and by drugs. *Immunology* (1968) 14(2):181–96.
26. Matzinger P. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* (1991) 145(1–2):185–92. doi:10.1016/0022-1759(91)90325-A
27. Andre ND, Barbosa DS, Munhoz E, Esteves D, Cecchini R, Watanabe MA. Measurement of cytotoxic activity in experimental cancer. *J Clin Lab Anal* (2004) 18(1):27–30. doi:10.1002/jcla.20006
28. Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodriguez MM, et al. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* (1995) 181(1):45–54. doi:10.1016/0022-1759(94)00327-5
29. Hoppner M, Luhm J, Schlenke P, Kortke P, Frohn C. A flow-cytometry based cytotoxicity assay using stained effector cells in combination with native target cells. *J Immunol Methods* (2002) 267(2):157–63. doi:10.1016/S0022-1759(02)00167-9
30. Karimi MA, Lee E, Bachmann MH, Salicrú AM, Behrens EM, Kambayashi T, et al. Measuring cytotoxicity by bioluminescence imaging outperforms the standard chromium-51 release assay. *PLoS One* (2014) 9(2):e89357. doi:10.1371/journal.pone.0089357
31. Chen K, Chen L, Zhao P, Marrero L, Keoshkterian E, Ramsay A, et al. FL-CTL assay: fluorolysometric determination of cell-mediated cytotoxicity using green fluorescent protein and red fluorescent protein expressing target cells. *J Immunol Methods* (2005) 300(1–2):100–14. doi:10.1016/j.jim.2005.02.010
32. Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* (1996) 70(8):5701–5.
33. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93(21):11382–8. doi:10.1073/pnas.93.21.11382
34. Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* (1990) 18(12):3587–96. doi:10.1093/nar/18.12.3587
35. Rajgelman MC, Costanzi E, Strauss BE. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. *J Biotechnol* (2003) 103(2):97–106. doi:10.1016/S0168-1656(03)00103-2
36. Youlton K, Li Z, Xiaodong W, Xuheng L, Hengchen Z. Combination immunotherapy with 4-1BBL and CTLA-4 blockade for the treatment of prostate cancer. *Clin Dev Immunol* (2012) 2012:439235. doi:10.1155/2012/439235
37. Gri G, Gallo E, Di Carlo F, Mustani P, Colombo MP. OX40 ligand-transduced tumor cell vaccine synergizes with GM-CSF and requires CD40-Apc signaling to boost the host T cell antitumor response. *J Immunol* (2003) 170(1):99–106. doi:10.4049/jimmunol.170.1.99
38. Xu D, Gu P, Pan PY, Li Q, Sato AI, Chen SH. NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BBL costimulation. *Int J Cancer* (2004) 109(4):499–506. doi:10.1002/ijc.11696
39. Murata S, Ladle BH, Kim PS, Lutz ER, Wolpoe ME, Ivie SE, et al. OX40 costimulation synergizes with GM-CSF whole-cell vaccination to overcome established CD8+ T cell tolerance to an endogenous tumor antigen. *J Immunol* (2006) 176(2):974–83. doi:10.4049/jimmunol.176.2.974
40. Ji Q, Gondek D, Hurwitz AA. Provision of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor converts an autoimmune response to a self-antigen into an antitumor response. *J Immunol* (2005) 175(3):1456–63. doi:10.4049/jimmunol.175.3.1456
41. Quezada SA, Peggs KS, Curran MA, Allison JP. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J Clin Invest* (2006) 116(7):1935–45. doi:10.1172/JCI27745
42. Xie Y, Akpitanli A, Maria C, Hipsley EL, Lane M, Kwon EK, et al. Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med* (2010) 207(3):651–67. doi:10.1084/jem.20091921
43. Muranski P, Bont A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Katsen A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* (2008) 112(2):362–73. doi:10.1182/blood-2007-11-120998
44. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* (2010) 207(3):637–50. doi:10.1084/jem.20091918
45. Tian Y, Sette A, Wetschke D. Cytotoxic CD4 T cells: differentiation, function, and application to dengue virus infection. *Front Immunol* (2016) 7:531. doi:10.3389/fimmu.2016.00531
46. Betts G, Jones E, Junaid S, El-Shanawany T, Scurr M, Mizen P, et al. Suppression of tumour-specific CD4+ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut* (2012) 61:1163–71. doi:10.1136/gutjnl-2011-300970
47. Curti TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* (2004) 10(9):942–9. doi:10.1038/nm1093
48. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* (2005) 115(12):3623–33. doi:10.1172/JCI25947
49. Liotta F, Gacci M, Prosperi E, Querci V, Vittori G, Laptin A, et al. Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int* (2011) 107(9):1500–6. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09555.x

50. Moret-Tatay I, Diaz J, Marco FM, Crespo A, Almo SE. Complete tumor prevention by engineered tumor cell vaccines employing nonviral vectors. *Cancer Gene Ther* (2003) 10(12):887–97. doi:10.1038/sj.cgt.7700646
51. Li B, Lin J, Vanroey M, Jure-Kunkel M, Jooss K. Established B16 tumors are rejected following treatment with GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapy in combination with anti-4-1BB mAb. *Clin Immunol* (2007) 125(1):76–87. doi:10.1016/j.clim.2007.07.005
52. Lipson EJ, Sharfman WH, Chen S, McMiller TL, Pritchard TS, Salas JT, et al. Safety and immunologic correlates of melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting. *J Transl Med* (2015) 13:214. doi:10.1186/s12967-015-0572-3
53. Small EJ, Sacks N, Nemunaitis J, Urban WJ, Dula E, Centeno AS, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor – secreting allogeneic cellular immunotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* (2007) 13(13):3883–91. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2937
54. Salgia R, Lynch T, Skarin A, Laocca J, Lynch C, Jung K, et al. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* (2003) 21(4):624–30. doi:10.1200/JCO.2003.03.091
55. Eager R, Nemunaitis J. GM-CSF gene-transduced tumor vaccines. *Mol Ther* (2005) 12(1):18–27. doi:10.1016/j.ymthe.2005.02.012

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Manrique-Rincón, Bernaldo, Toscano and Bagelman. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Exploring synergy in combinations of tumor-derived vaccines that harbor 4-1BBL, OX40L and GM-CSF.

Andrea J. Manrique-Rincón, Camila M. Beraldo, Jéssica M. Toscaro, Marcio C. Bajgelman*

FIGURES S1

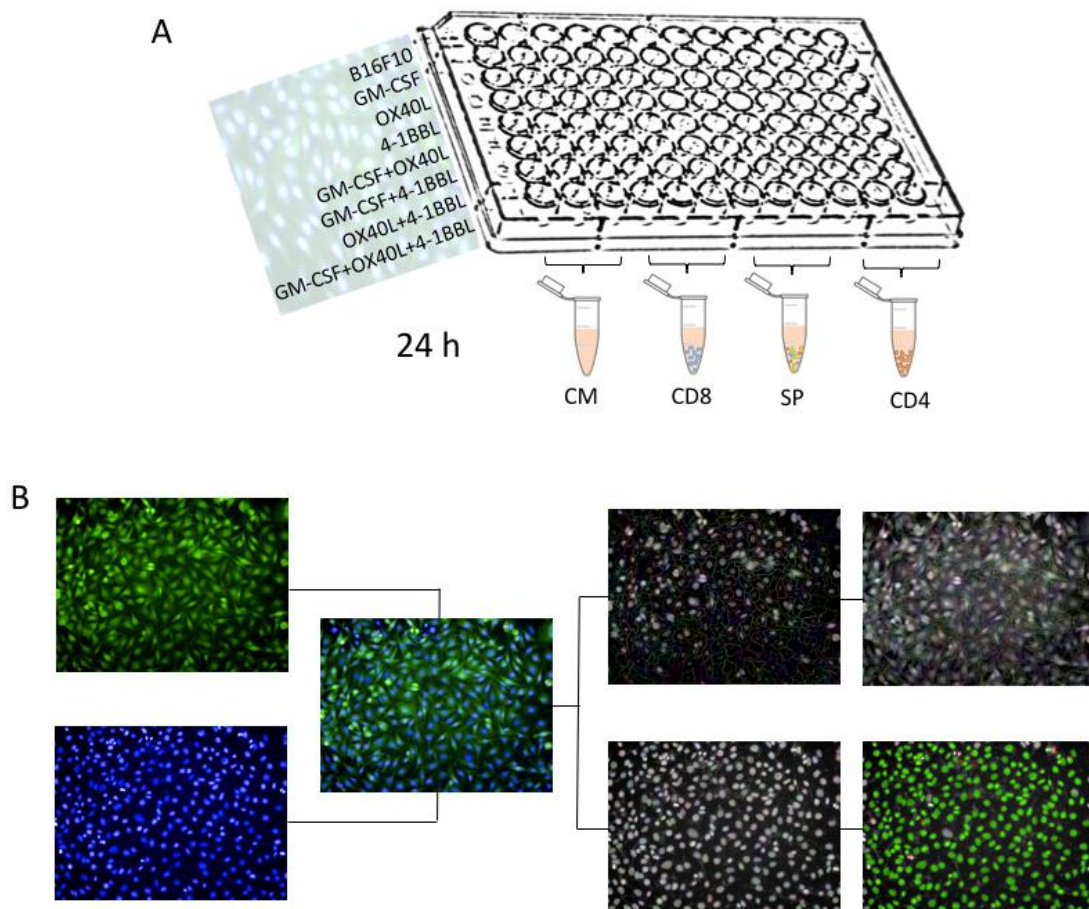


FIG S1. High-content *in vitro* imaging assay used to evaluate effects of tumor cells expressing immunomodulators. Schematic representation of *in vitro* assay (A) tumor modified cells were plated in D10 medium. Twenty-four hours later, when cells were adherent, the D10 medium of tumor cells was changed for complete medium, containing pre-activated CD8, CD4 or freshly isolated splenocytes. Then they were co-cultivated and analyzed using high-content imaging. Analysis of high-content imaging using Operetta system (B). First each well is divided in 27 fields, then each field is acquired for GFP and DAPI, this generates an image that is analyzed based on parameters like roundness for nucleus and fluorescence intensity for GFP to determine the number of live cells in each well.

FIGURE S-2

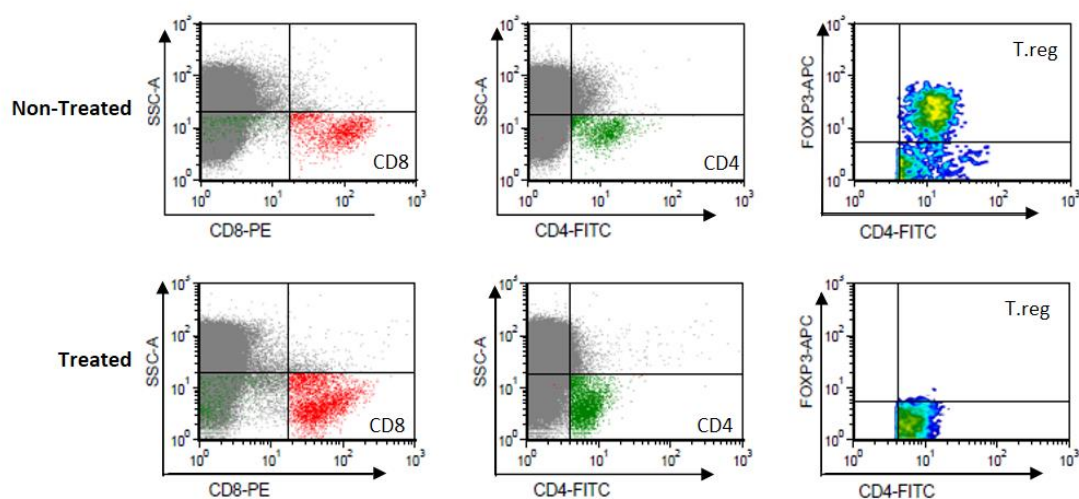


FIG S2. Flow cytometry of tumor infiltrating lymphocytes. Representative dot plots of tumor-infiltrating lymphocytes in non-treated mice (1X PBS) and mice treated with vaccines (representative figure of mice treated with all the vaccines combinations). Non treated mice had a small ratio of CD8 (+)Teff /Treg compared to treated mice (Figure 5C). Single-cell suspensions were prepared from tumors at day 28 and stained for CD8, CD4 then cells were fixed, permeabilized and stained for FOXP3.

4.14 Artigo II: (Submetido) Development Of A Flow Cytometry Assay Which Allows To Evaluate The Efficiency Of Immunomodulatory Vaccines To Enhance T Cell-Mediated Antitumor Response.

DEVELOPMENT OF A FLOW CYTOMETRY ASSAY WHICH ALLOWS TO EVALUATE THE EFFICIENCY OF IMMUNOMODULATORY VACCINES TO ENHANCE T CELL-MEDIATED ANTITUMOR RESPONSE

Andrea J. Manrique-Rincón^{1,2}, Anna C. P. V. de Carvalho¹, M. Eugenia Ribeiro de Camargo¹, Kleber Gomes Franchini^{1,2}, Marcio C. Bajgelman^{1,2,3}

¹ Brazilian Biosciences National Laboratory, Center for Research in Energy and Materials, Campinas-SP, Brazil

² Medical School, University of Campinas, Campinas-SP, Brazil

³ Institute of Biology, University of Campinas, Campinas-SP, Brazil

Running headline: Cytometry assay for immunomodulatory vaccines

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Grants MCB-2015/01488-2, 2017/06692-2 and the fellowship AJMR-2013/02041-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grant KGF-401670/2014-7)

Abstract

Immunotherapy has revolutionized the treatment of cancer. Since tumor cells are low immunogenic and can induce several mechanisms of tolerance, the use of monoclonal antibodies or other immunomodulators, targeting costimulation of T cells may mediate the inhibition of immunosuppressive mechanisms, favoring immune surveillance and enhancing the detection and elimination of tumor cells. We developed a new *in vitro* assay, based on flow cytometry, which allows exploring the therapeutic potential of tumor-derived immunomodulatory lineages, enhancing anti-tumor response. We generated tumor-derived cells that simultaneously co-express eGFP and one immunomodulatory molecule (OX40L, 4-1bbL or GM-CSF). These genetically modified tumor-derived cells are irradiated and then incubated with primary T cells to evaluate the killing activity, which can be estimated by a decrease in the GFP positive cells. The results have shown high sensitivity and correlation with *in vivo* experiments. This model

may contribute to the development of high-throughput assays for the screening of immunomodulators and a reduction in the use of experimental animals.

Key words: immunomodulation, tumor-derived vaccines, costimulation, 4-1BB, OX40, GM-CSF

Introduction

Therapeutic strategies based on immunotherapy have revolutionized the treatment of cancer patients. Anti-CTLA-4 and anti-PD-1 monoclonal antibodies, also known as checkpoint inhibitors, act by blocking cell surface receptors which signaling transduction is associated with T-cell immunosuppression (1-6). These immunological checkpoints are essential for the control of autoimmune reactions, protecting tissues from damage when the immune system controls infections. On the other hand, tumor cells take advantage of immunosuppressive mechanisms that antagonize antitumor response. Cancer cells can orchestrate an evasion by deregulating immunological checkpoints, primarily by inhibiting the action of cytotoxic T cells, which can recognize and eliminate tumor cells. Besides strategies to inhibit immune checkpoints, the costimulatory signaling also plays an important role, mediating the balance between immunotolerance and immune surveillance. Agonist monoclonal antibodies driven to TNFSF family receptors, such as 4-1BB or OX40, which are constitutively expressed in activated T cells (7), have shown to increase the cytotoxic activity of T cells and therefore have great potential for antitumor therapeutic strategies. The transduction of agonist signals through the 4-1BB receptor on CD8 T cells induces proliferation, cytotoxicity, and survival, as well as polarizing TH1 responses and potentiating the elimination of tumor cells (8-13). In addition, the OX40 receptor, which is also another member of the TNFSF family, constitutively expressed on the surface of activated T cells, may receive agonist signals that act to increase antitumor activity. The transduction of signals mediated by the OX40 receptor promotes increased survival in activated T cells, being essential to keep the activity of effector T cells and maintenance of memory cells (14-18). Immunocompetent animal models challenged with syngeneic tumor cells are widely used to evaluate the therapeutic benefit of an immunomodulatory strategy. In this work, we developed a high sensitivity *in vitro* assay that allows exploring the effect of

immunomodulators to enhance the antitumor response. In contrast to animal experiments that can take 30 days, *in vitro* assays are substantially faster, making it possible to evaluate the effect on T cells in less than a week.

The gold standard assay for measuring the activity of Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against tumor cells is based on the quantification of the chromium released by tumor cells as they die by the action of the CTLs (19). To overcome technical issues associated with the handling of radioactive compounds several other assays were developed, as analyzing DNA fragmentation using JAM assay (20), quantifying enzymes leaked from death cells, as lactate dehydrogenase (LDH) (21), performing bioluminescence-based assay to evaluate T cell-mediated cytotoxicity by measuring luciferase activity in transduced cell lines (22) or even using fluorolysometric methods that employ genetically modified cells expressing reporter genes, that are killed by cytotoxic cells (23). Since fluorolysometric assays are highly sensitive, we propose a new *in vitro* assay based on establishing target cell lines that simultaneously express the GFP reporter gene and an immunomodulator. In this manner, the same cell line that costimulates T cell also encodes GFP and may be used to evaluate T cell-mediated cytotoxicity. This *in vitro* model enables the development of high-throughput assays by flow cytometry to screen new immunomodulators, or even combinations of different immunomodulatory strategies with the aim of enhancing T cell activation and elimination of tumor cells.

Results

Establishment of genetically modified cell lines for the simultaneous expression of immunomodulators and the eGFP reporter gene.

The principle of our *in vitro* assay is to evaluate T cell-mediated cytotoxicity using genetically modified tumor cells, that simultaneously co-express an immunomodulator which enhances T cell activity and a reporter gene, that indicates killing of the tumor cell. In this way, primary T cells are co-cultivated with genetically modified tumor cells, following a flow cytometry analysis to quantify GFP positive cells. If T cells are costimulated, they can kill tumor cells, indicated by GFP leaking and reduction in the GFP positive population. These lineages derived from tumor cells are established by

retroviral transduction. We generated pCL retroviral vectors harboring the cDNA of the 41BB-L (pCL-41BBL) and OX40L (pCL-OX40L) genes. These vectors also encode a selection cassette for the G418 antibiotic which facilitated the selection of stable clones (Figure 1A). In addition to retroviral vectors carrying immunomodulators, we also generated a pBabe retroviral vector encoding the eGFP reporter gene (pBabe-GFP). This vector also harbors a selection cassette for the antibiotic puromycin (Figure 1A). In this manner, we could select puromycin-resistant GFP expression clones from immunomodulatory cell lines that were previously selected with G418. In figure 1B we can verify the flow cytometry result for the establishment of the four cell lines, derived from the parental strain B16F10, used in the *in vitro* immunomodulatory assay.

Using the *in vitro* system to assess the effect of irradiation on T cell activity

Tumor cells may exhibit low immunogenicity, facilitating the evasion of the immune system. Literature data reports that irradiation may favor the expression of antigens, which in combination with antitumor vaccination protocols reinforce immunological surveillance and elimination of tumors. In our *in vitro* assay model, we use the low immunogenic B16 tumor cells, derived from melanoma, which expresses the eGFP reporter. We call this lineage B16-GFP. As seen in the Figure 2A, non-irradiated B16-GFP cells that are co-cultivated with syngeneic CD8 + T cells are resistant to lysis, as indicated by GFP positive cell count, that was similar when we cultivated B16-GFP cells in the absence of T cells (Mock). However, irradiated cells show a significant reduction in GFP expression after incubation with T cells, suggesting T cell modulation as a function of B16-GFP irradiation. In addition to the effect of CD8 + T cell-mediated cytotoxicity, we also observed a similar effect mediated by CD4 + T lymphocytes, indicated by the reduction in GFP levels, observed in irradiated B16-GFP cells (Figure 2B).

Immunomodulators potentiate T cell-mediated antitumor response

We used our *in vitro* assay to assess the effect of T cell-mediated cytotoxicity when incubating primary T cells with the immunomodulatory tumor lines that were previously irradiated. These immunomodulatory cells harbor both an immunomodulator as 4-1BBL, OX40L or GM-CSF and co-express the eGFP reporter gene. We observed, an increase in cytotoxic activity mediated by CD8 + T cells co-cultivated with B16 cells harboring OX40L,

4-1BBL, and GM-CSF (Figure 3A), indicated by a decrease in the GFP positive cells. We also observed a cytotoxic effect mediated by CD4⁺ T cells incubated with these immunomodulatory lineages (Figure 3B).

Challenging animal model and validation of *in vitro* assays.

To verify whether the effect of T cell-mediated cytotoxicity observed for the *in vitro* assay was recapitulated using an Immunocompetent animal model, we challenged C57BL6 animals with parental B16F10 cells. These syngeneic cells are low immunogenic and induce tumor formation. In addition to tumor cells, these animals also received injections of irradiated tumor-derived immunomodulatory cell lines. Our goal was to prove that immunomodulatory cells that demonstrated an induction of T cell-mediated cytotoxicity, *in vitro*, could cause therapeutic benefit in immunocompetent animals. The therapeutic benefit was assessed by comparison of survival curves with the different treatments. As seen in Figure 4, we can observe that the injection of irradiated tumor cells induces a reduction in tumor growth. This reduction is substantially potentiated when the irradiated cells express OX40L, 4-1BBL, and GM-CSF.

Discussion

We developed a flow cytometry-based method to evaluate T-cell mediated cytotoxicity *in vitro*, which facilitates the investigation of the therapeutic benefit of immunomodulators to enhance antitumor immuno-surveillance. This system was based on the generation of cell lines that express simultaneously immunomodulators and the GFP reporter gene, which allows a flow cytometry analysis. We used these cell lines to evaluate the effect of T cell-mediated cytotoxicity, indicated by leaking of cytoplasmic GFP. The strategy of modifying tumor cells to express immunomodulators is widely described in the literature, as well as the immunomodulators that we use to establish the lineages (24-27). The *in vitro* assay has shown a high sensitivity and allowed to verify a difference in T cell activation when comparing co-cultivation with non-irradiated and with irradiated tumor cells (Figure 2). This effect of the radiation, that favor antitumor response can be explained by the modulation in the repertoire of peptides and the increase of the antigenic presentation (28). Radiation can promote the recognition of tumor cells both *in vitro* and *in vivo* (29), as we observed in our experiments (Figures 2

and 4). We also observed irradiated B16F10 tumor cells could increase expression of OX40L and 4-1BBL (Figure 5), which could also be an explanation for the potentiation of the cytotoxic effect mediated by T cells and the antitumor response mediated for irradiated B16F10 (30). It is interesting that although preclinical studies emphasize the importance of CD8 + T cells in tumor elimination (31), we also observed that CD4 + T cells can mediate cytotoxicity in tumor cells irradiated in our assays (Figure 3) Which also corroborates with previous work and data from the literature suggesting the elimination of B16 cells by tumor-specific CD4 T cells (32-35).

In addition, we also observed that irradiated tumor cells harboring immunomodulators induce a significant cytotoxic effect, as revealed by the reduction in GFP positive cells in our *in vitro* assays (Figures 3A and 3B). This result of the *in vitro* experiment was recapitulated when performing an *in vivo* experiment, in which immunocompetent animals challenged with B16 parental cells were given injections of the immunomodulatory cell lines. These animals were monitored for tumor progression, and we observed a significant reduction in tumor growth in all groups that have received irradiated cells. The antitumor effect was more pronounced in the irradiated cells that harbored immunomodulators.

In this way, this innovative *in vitro* assay has a great potential to explore the therapeutic benefit of new immunotherapy strategies based on the costimulation of T cells, with the aim of favoring the detection and elimination of tumor cells. In contrast to animal experiments that require long incubation periods for tumor growth, we can use this *in vitro* assay to accelerate the assessment of the therapeutic benefit of a new antitumor strategy. The proposed assay can also be adapted for high-throughput screening of new immunomodulatory molecules, monoclonal antibodies or antitumor vaccines, contributing to the development of therapeutic strategies for the treatment of human cancer.

Acknowledgments

We thank Viral Vector and Genome modification laboratories, LNBio – CNPEM for providing the viral vector preparations and animal facility. We thank the Transfusion Sector at Hospital das Clinicas, UNICAMP, for irradiating the tumor-derived vaccines.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Grants MCB-2015/01488-2, 2017/06692-2 and the fellowship AJMR-2013/02041-6) and Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq (Grant KGF-401670/2014-7).

Material and methods

Experimental overview

We established cell lines harboring immunomodulators and the GFP reporter gene. We aimed to use these cell lines to costimulate T cells. Since activated T cells have the ability to kill tumor cells, and our tumor cells express the eGFP reporter gene, we hypothesized that the cytotoxic effect on tumor cell could be estimated by decrease in the percentage of GFP positive cells. In this way, the established tumor-derived cell lines harboring immunomodulators and eGFP were co-cultivated with T cells, following flow cytometry.

Plasmid construction and recombinant retrovirus generation

The cDNA from Ox40L and 4-1bbL were amplified by PCR from splenocytes of C57BL6 mice using primers described below. The PCR product was cloned in the pCL plasmid vectors (36). The cDNA of eGFP was isolated from the lentiviral vector FUGW (37) with BamHI and Eco RI and cloned into the pBabe vector (38). The plasmid vector pCL and pBabe are cotransfected with packaging vector into HEK-293 cells to generate viral particles.

mOX40lig-BHI-F (ATTAGGATCCATGGAAGGGGAAGGGGTTCA)

mOX40lig-BHI-R (AGTTGGATCCACCCTCAGAGTGGAATTCAC)

m41BBL-ERI-F (CTGGGAATTCATGGACCAGCACACACTTGA)

m41BBL-BHI-R (ACTTGGATCCGGACTTAGCAACTAGGAGTC)

Establishment and culture of cell lines

All the cell lines were derived from the poorly immunogenic mouse melanoma cell line B16F10, by retrovirus transduction encoding both the transgene (OX40L or 41BBL) and a G418 expression cassette. After the transduction, we cloned

cells and established cell lines with the clones that had the highest expression. After this cloning step, the established cell lines (B16F10: OX40L, 4-1BBL, GM-CSF) were transduced with a second viral vector encoding eGFP and a puromycin expression cassette. We selected clones that were analyzed by flow cytometry for the highest expression of eGFP and the transgene. The B16F10 GM-CSF cell line was kindly provided by Dr. Dranoff (Harvard University-USA)

Mice

C57BL/6 mice (Male 8 weeks old) were acquired from the laboratory of Genomic Modification (LMG) in the LNBIO. The animals were maintained in micro-isolator cages and treated in accordance with the CNPEM Laboratory Animal Care regulations. Experiments for this study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the CNPEM, protocol 15/2015

Cell culture

Cells were irradiated with 50 Gy in the Hospital das Clínicas, UNICAMP and seeded 20.000 cells per well in 96 well plates. After 24 hours, 20.000 activated CD4 or CD8 were added to each condition. T Cells were preactivated with CD3e (TONBO biosciences clone 145-2C11) and CD28 (TONBO biosciences clone 37.51) antibodies. The cells were cultivated in complete media (CM), containing penicillin, streptomycin, heppes, sodium pyruvate, glutamine, non-essential amino acids, fetal bovine serum, and beta-mercaptoethanol. Primary T cells were isolated from C57BL6 mice after dissociation of spleens and isolated by negative selection using immunomagnetic beads, CD8 T cell isolation kit or CD4 T cell isolation kit (Stemcell®-USA).

Flow Cytometry

Immunomodulatory cell lines were harvested, centrifuged and washed with PBS 5% serum. Then they were stained with antibodies for 4-1BBL (CD137 - PE eBioscience 12-5901-82) and OX40L (CD252-PE eBioscience 12-5905-82). The

B16F10 - GM-CSF, cells were harvest, fixed, intracytoplasmatically permeabilized and stained with anti-GM-CSF (GM-CSF-PE eBioscience 12-7331-82).

The antibodies were incubated for 20 minutes at 4°C. After this time, cells were washed, resuspended in 1x PBS and analyzed by flow cytometry, using a Novocyte 2000R – Acea, USA. We performed a compensation between GFP and PE.

The *in vitro* assays to evaluate T cell-mediated cytotoxicity, induced by antitumor vaccines, was performed using a BD Facsanto II equipment, that had available a High throughput module which allowed reading 96w plates. For these assays, T cells incubated with tumor cells were removed with supernatant, following harvesting of adherent tumor cells. Cells were harvested, washed with 1x PBS, and analyzed by flow cytometry to quantify GFP positive cells.

Data analysis was performed using FCS express 4.0 cytometry software – Denovo, USA. The negative control was tumor cells cultivated in the absence of T cells that exhibited the highest percentage of GFP positive cells.

Flow cytometry data complies with the MIFlowCyt standard.

Tumor inoculation and treatment

Mice were injected in the right flank s.c. with 5×10^4 B160F10 cells in 100μL of PBS, then they were treated on days 1, 4, and 7 with 1×10^6 irradiated (50 Gy) B16F10 expressing either GM-CSF (Gvax), OX40L, 4-1BBL or parental B16F10 on the left flank (n = 7). Tumor growth was expressed as a percentage of tumor-free mice among total injected mice at alternate days, while tumor size was measured with a caliper and calculated as longest diameter x shortest diameter x diagonal diameter / $(3.141599/2)$ (in cubic millimeters).

Statistical analysis

We used Prism 7.0 (GraphPad software) to analyze data. Experiments were repeated twice and statistical significance was determined by one-way ANOVA and Dunnet's multiple comparisons test (* $P \leq 0.05$). Tumor survival data were analyzed using the Kaplan–Meier method. The log-rank Mantel–Cox test was used to compare survival curves between different groups.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Dranoff G. CTLA-4 blockade: unveiling immune regulation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* (2005) **23**(4):662-4. PubMed PMID: 15613692.
2. Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* (1993) **262**(5135):905-7. Epub 1993/11/05. PubMed PMID: 7694361.
3. Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* (2013) **94**(1):25-39. Epub 2013/04/30. doi: 10.1189/jlb.1212621. PubMed PMID: 23625198; PubMed Central PMCID: PMC3685017.
4. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* (1996) **271**(5256):1734-6. Epub 1996/03/22. PubMed PMID: 8596936.
5. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *The Journal of experimental medicine* (2009) **206**(8):1717-25. Epub 2009/07/08. doi: 10.1084/jem.20082492. PubMed PMID: 19581407; PubMed Central PMCID: PMC2722174.
6. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* (2000) **192**(7):1027-34. Epub 2000/10/04. PubMed PMID: 11015443; PubMed Central PMCID: PMC2193311.
7. Pollok KE, Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J, Kim KK, Pickard RT, et al. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* (1993) **150**(3):771-81. Epub 1993/02/01. PubMed PMID: 7678621.
8. Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, et al. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *The Journal of experimental medicine* (1997) **186**(1):47-55. Epub 1997/07/07. PubMed PMID: 9206996; PubMed Central PMCID: PMC2198949.
9. Lee HW, Park SJ, Choi BK, Kim HH, Nam KO, Kwon BS. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* (2002) **169**(9):4882-8. Epub 2002/10/23. PubMed PMID: 12391199.
10. Kim YJ, Kim SH, Mantel P, Kwon BS. Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *European journal of immunology* (1998) **28**(3):881-90.

- Epub 1998/04/29. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<881::AID-IMMU881>3.0.CO;2-O. PubMed PMID: 9541583.
11. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nature reviews Immunology* (2003) **3**(8):609-20. Epub 2003/09/17. doi: 10.1038/nri1148. PubMed PMID: 12974476.
 12. Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nature medicine* (1997) **3**(6):682-5. Epub 1997/06/01. PubMed PMID: 9176498.
 13. McNamara JO, Kolonias D, Pastor F, Mittler RS, Chen L, Giangrande PH, et al. Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice. *The Journal of clinical investigation* (2008) **118**(1):376-86. Epub 2007/12/07. doi: 10.1172/JCI33365. PubMed PMID: 18060045; PubMed Central PMCID: PMC2104483.
 14. Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Cortesy P, Puklavec M, et al. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Molecular immunology* (1987) **24**(12):1281-90. Epub 1987/12/01. PubMed PMID: 2828930.
 15. Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* (2001) **15**(3):445-55. Epub 2001/09/25. PubMed PMID: 11567634.
 16. Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature reviews Immunology* (2004) **4**(6):420-31. Epub 2004/06/03. doi: 10.1038/nri1371. PubMed PMID: 15173831.
 17. Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* (1998) **161**(12):6510-7. Epub 1998/12/23. PubMed PMID: 9862675.
 18. Bakdash G, Sittig SP, van Dijk T, Figdor CG, de Vries IJ. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Frontiers in immunology* (2013) **4**:53. Epub 2013/03/02. doi: 10.3389/fimmu.2013.00053. PubMed PMID: 23450201; PubMed Central PMCID: PMC3584294.
 19. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* (1968) **14**(2):181-96. Epub 1968/02/01. PubMed PMID: 4966657; PubMed Central PMCID: PMC1409286.
 20. Matzinger P. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* (1991) **145**(1-2):185-92. Epub 1991/12/15. PubMed PMID: 1765650.
 21. Andre ND, Barbosa DS, Munhoz E, Estevao D, Cecchini R, Watanabe MA. Measurement of cytotoxic activity in experimental cancer. *J Clin Lab Anal* (2004) **18**(1):27-30. Epub 2004/01/20. doi: 10.1002/jcla.20006. PubMed PMID: 14730554.
 22. Karimi MA, Lee E, Bachmann MH, Salicioni AM, Behrens EM, Kambayashi T, et al. Measuring cytotoxicity by bioluminescence imaging outperforms the standard chromium-51 release assay. *PloS one* (2014) **9**(2):e89357. Epub 2014/03/04. doi: 10.1371/journal.pone.0089357. PubMed PMID: 24586714; PubMed Central PMCID: PMC3929704.
 23. Chen K, Chen L, Zhao P, Marrero L, Keoshkerian E, Ramsay A, et al. FL-CTL assay: fluorolysometric determination of cell-mediated cytotoxicity using green fluorescent protein and red fluorescent protein expressing target cells. *J Immunol Methods* (2005)

- 300**(1-2):100-14. Epub 2005/05/19. doi: 10.1016/j.jim.2005.02.010. PubMed PMID: 15899496.
24. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1993) **90**(8):3539-43. Epub 1993/04/15. PubMed PMID: 8097319; PubMed Central PMCID: PMC46336.
 25. Fromm G, de Silva S, Giffin L, Xu X, Rose J, Schreiber TH. Gp96-Ig/Costimulator (OX40L, ICOSL, or 4-1BBL) Combination Vaccine Improves T-cell Priming and Enhances Immunity, Memory, and Tumor Elimination. *Cancer immunology research* (2016) **4**(9):766-78. Epub 2016/07/02. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0228. PubMed PMID: 27364122.
 26. Gri G, Gallo E, Di Carlo E, Musiani P, Colombo MP. OX40 ligand-transduced tumor cell vaccine synergizes with GM-CSF and requires CD40-Apc signaling to boost the host T cell antitumor response. *J Immunol* (2003) **170**(1):99-106. Epub 2002/12/24. PubMed PMID: 12496388.
 27. Schreiber TH, Raez L, Rosenblatt JD, Podack ER. Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art. *Semin Immunol* (2010) **22**(3):105-12. PubMed PMID: 20226686.
 28. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *The Journal of experimental medicine* (2006) **203**(5):1259-71. Epub 2006/04/26. doi: 10.1084/jem.20052494. PubMed PMID: 16636135; PubMed Central PMCID: PMC3212727.
 29. Sharma A, Bode B, Wenger RH, Lehmann K, Sartori AA, Moch H, et al. gamma-Radiation promotes immunological recognition of cancer cells through increased expression of cancer-testis antigens in vitro and in vivo. *PloS one* (2011) **6**(11):e28217. Epub 2011/12/06. doi: 10.1371/journal.pone.0028217. PubMed PMID: 22140550; PubMed Central PMCID: PMC3226680.
 30. Kumari A, Garnett-Benson C. Effector function of CTLs is increased by irradiated colorectal tumor cells that modulate OX-40L and 4-1BBL and is reversed following dual blockade. *BMC research notes* (2016) **9**:92. Epub 2016/02/14. doi: 10.1186/s13104-016-1914-9. PubMed PMID: 26872462; PubMed Central PMCID: PMC4752774.
 31. Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Meng Y, Beckett M, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* (2009) **114**(3):589-95. Epub 2009/04/08. doi: 10.1182/blood-2009-02-206870. PubMed PMID: 19349616; PubMed Central PMCID: PMC2713472.
 32. Quezada SA, Peggs KS, Curran MA, Allison JP. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* (2006) **116**(7):1935-45. Epub 2006/06/17. doi: 10.1172/JCI27745. PubMed PMID: 16778987; PubMed Central PMCID: PMCPMC1479425.
 33. Xie Y, Akpınarli A, Maris C, Hipkiss EL, Lane M, Kwon EK, et al. Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *The Journal of experimental medicine* (2010) **207**(3):651-67. Epub 2010/02/17. doi:

- 10.1084/jem.20091921. PubMed PMID: 20156973; PubMed Central PMCID: PMC2839147.
34. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* (2008) **112**(2):362-73. Epub 2008/03/21. doi: 10.1182/blood-2007-11-120998. PubMed PMID: 18354038; PubMed Central PMCID: PMC2442746.
 35. Manrique-Rincón AJ, Beraldo CM, Toscaro JM, Bajgelman MC. Exploring Synergy in Combinations of Tumor-Derived Vaccines That Harbor 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF. *Frontiers in immunology* (2017) **8**(1150). doi: 10.3389/fimmu.2017.01150.
 36. Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *Journal of virology* (1996) **70**(8):5701-5. PubMed PMID: 8764092.
 37. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1996) **93**(21):11382-8. PubMed PMID: 8876144.
 38. Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* (1990) **18**(12):3587-96. Epub 1990/06/25. PubMed PMID: 2194165; PubMed Central PMCID: PMC331014.

FIGURES

1

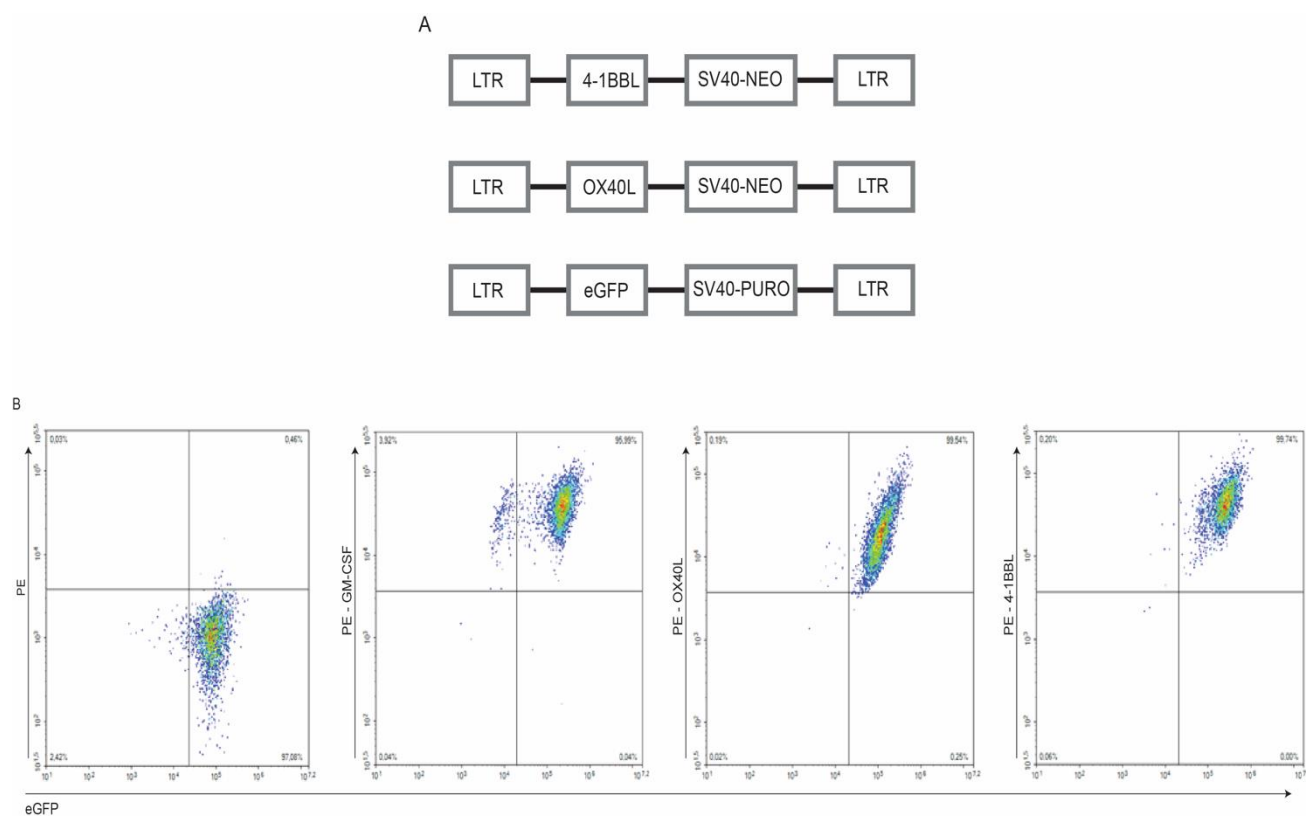


Figure 1 – Establishment of tumor-derived immunomodulatory cell lines. (A) Viral vectors generated, encoding 4-1BBL, OX40L and GFP genes. (B) Flow cytometry assay of established cell lines. B16F10-GFP: expressing an eGFP reporter gene, B16F10-41BBL/GFP: expressing the 4-1BBL immunomodulator and the reporter gene eGFP, B16-OX40L/GFP: expressing the immunomodulator OX40L and reporter gene eGFP. B16F10-GM-CSF/GFP: expressing the GM-CSF immunomodulator and the eGFP reporter gene.

2

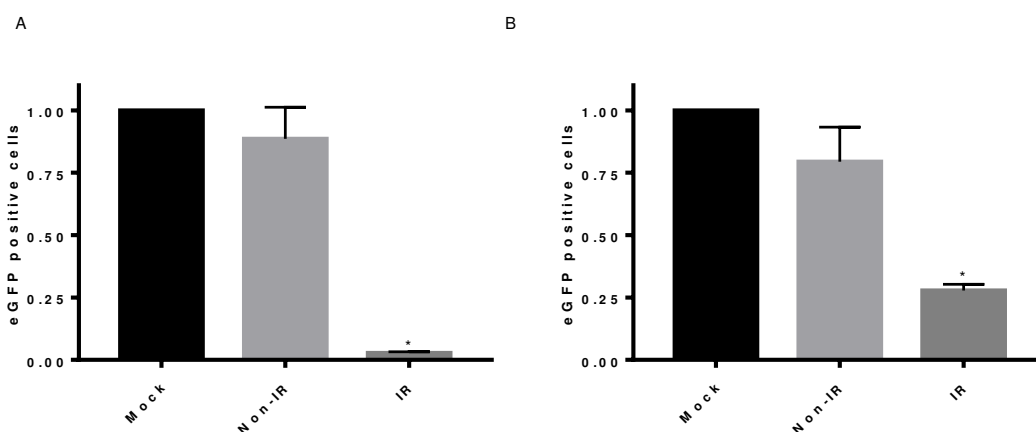


Figure 2 – Radiation enhance T cell-mediated cytotoxicity. The in vitro assay allows evaluating the T cell-mediated cytotoxicity, indicated by a decrease in the percentage of eGFP positive cells. A decrease in the GFP signaling suggests T cell cytotoxicity enhancement. (A) CD8+ T cells were co-cultivated with nonirradiated B16-GFP cells. (B) CD4+T cells were co-cultivated with irradiated B16-GFP cells. Mock had only B16-GFP cells in the absence of T cells and was used as a normalizer. One-way ANOVA and Dunnet's multiple comparisons test (* $P \leq 0.05$) were performed against mock.

3.

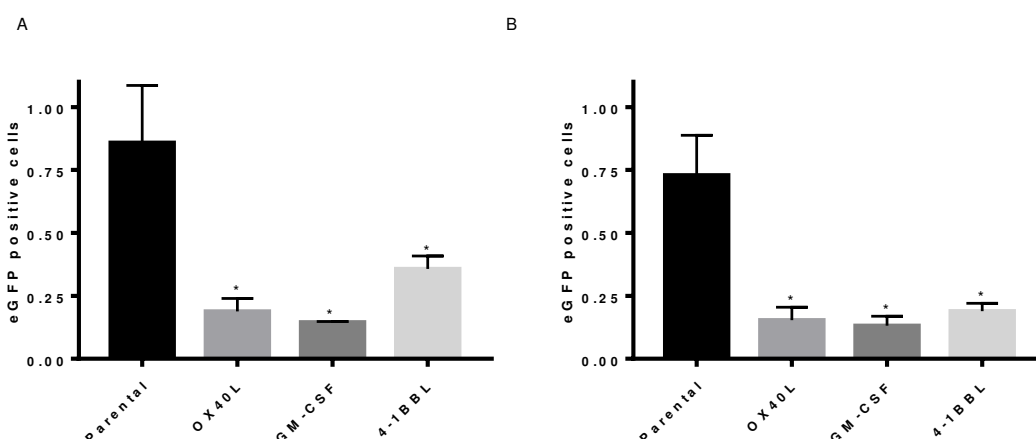


Figure 3 – Immunomodulatory tumor-derived cells enhance T cell-mediated cytotoxicity. The in vitro assay allows evaluating the T cell-mediated cytotoxicity, indicated by GFP leaking. A decrease in the GFP signaling suggests T cell cytotoxicity enhancement. (A) CD8⁺ T cells were co-cultivated with immunomodulatory B16- GFP cells. (B) CD4⁺T cells were co-cultivated with immunomodulatory B16-GFP cells. Par: only parental B16-GFP cells, without immunomodulators. OX40L: B16-GFP/OX40L, GM-CSF: B16-GFP/GM-CSF, 4-1BBL: B16-GFP/4-1BBL. One-way ANOVA and Dunnet's multiple comparisons test (*P≤0.05) were performed against parental.

4

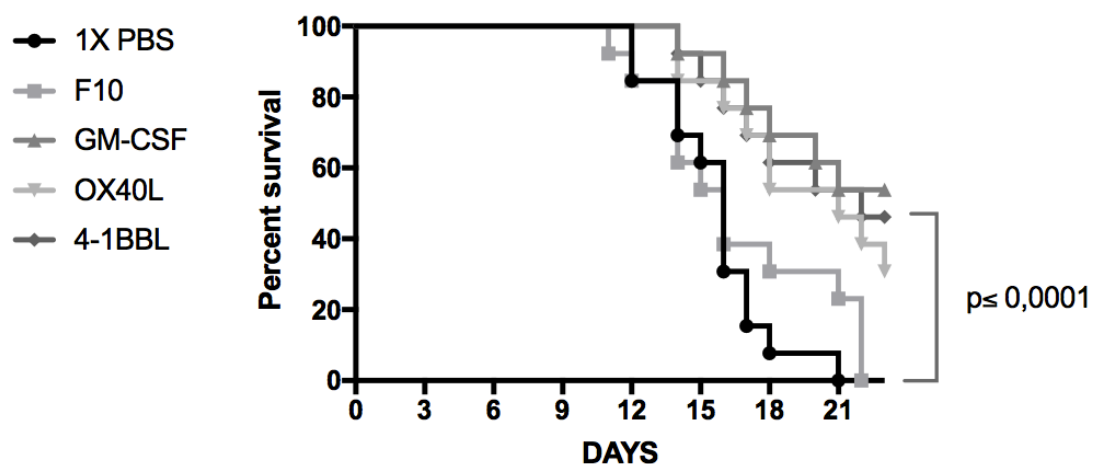


Figure 4 –Survival curve in C57BL/6 mice bearing subcutaneous B16F10 tumors. Mice were treated with PBS or 1×10^6 irradiated B16-derived cells, harboring OX40L, 4-1BBL, GM-CSF, or parental (F10). These cumulative survival curves represent two independent experiments ($n = 13$ mice per group) the log-rank Mantel–Cox test was used to compare survival curves between different groups.

5.

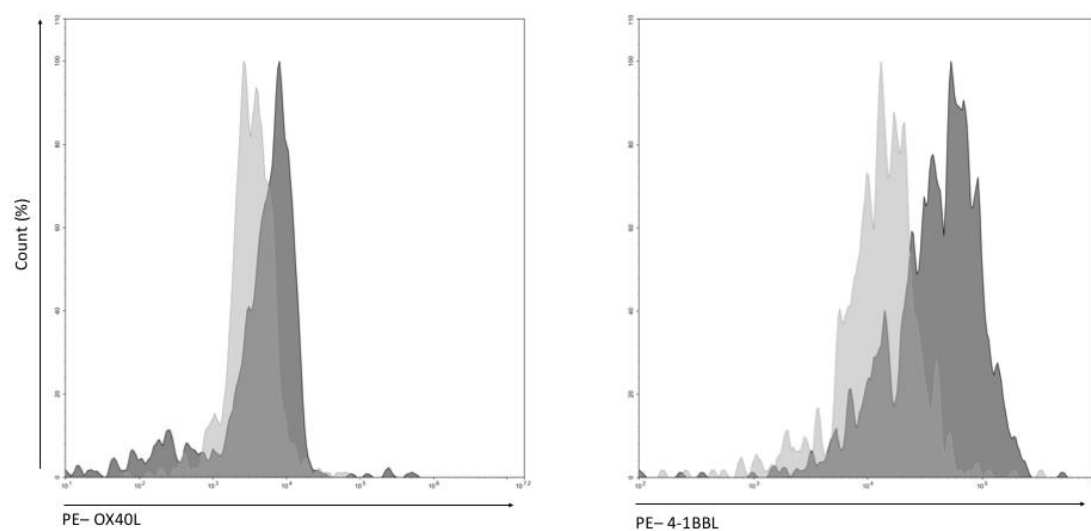


Figure 5 – Radiation enhance expression of immunomodulatory ligands. Flow cytometry performed with B16F10 cells 72 hours after a 50Gy dose of irradiation. (A) Cells were stained for 4-1BBL expression. (B) Cells were stained for OX40L. Non-irradiated cells were stained as control.

5. DISCUSSÃO

5.1 Utilização de candidatos de RNAi para induzir o silenciamento transcricional em células T regulatórias.

O gene *Foxp3* é essencial no desenvolvimento de células T regulatórias (Treg), tanto induzidas como naturais. Essa característica é comum para humanos e camundongos (319). Considerando-se ambas Treg naturais, ou Treg induzidas (iTreg), seu desenvolvimento está ligado especificamente a expressão e estabilidade do *Foxp3*, o qual pode ser regulado por fatores de transcrição, modificações pós-transcricionais e mecanismos epigenéticos. Sendo que esses mecanismos diferenciam as populações de Treg e controlam o fenótipo imunossupressor (211,226,229,320).

Neste trabalho, demonstramos que é possível induzir o silenciamento transcricional (TGS) no *Foxp3* de células Treg induzidas *in vitro*. Mostramos que existem duas regiões gênicas que são susceptíveis ao silenciamento transcricional por candidatos de RNA, o que pode constituir uma alternativa de imunoterapia específica para inibir as Treg em câncer. As duas regiões caracterizam-se por ser altamente conservadas entre espécies como camundongo e humano (conforme nossa análise figura 5) e possuir uma alta quantidade de CpG (Figura 5, Tabela 1). A primeira região é o promotor que contém a TATA box, a CAAT box e o sítio de início da transcrição. Além disso, o promotor tem vários sítios de ligação a fatores de transcrição indispensáveis para a expressão do gene. Esta região foi a que apresentou um maior número de candidatos TGS-RNAi eficientes para diminuir a expressão do *Foxp3* (Figura 7B).

Inicialmente, para efetuar a veiculação de TGS-RNAi para células alvo, utilizamos vetores virais recombinantes derivados de lentivírus, que apresentam um alto nível de segurança e grande eficiência para modificação genética de células primárias. É interessante observar que nosso grupo tem larga experiência e expertise na manipulação destes vetores virais. Sendo assim, após efetuar a clonagem dos candidatos realizamos ensaios *in vitro*, obtendo como resultado alguns candidatos com alto desempenho, conforme descrevemos anteriormente. O melhor candidato de TGS-RNAi dirigido à região promotora de *Foxp3* foi o PS5 o qual mostrou também uma diminuição no fenótipo

imunossupressor, validado em ensaios realizados em cultura de células (Figura 7B). Quando foram feitas as análises de metilação, observou-se que o candidato PS5 causava um efeito de indução da metilação de 66.7% no promotor (Figura 10). Dados da literatura sugerem que o promotor está amplamente regulado epigeneticamente e que esse é um pré-requisito para a expressão estável de *Foxp3* e por tanto do fenótipo imunossupressor (227,230,321). O status epigenético do gene *Foxp3* foi proposto como um marcador a mais para diferenciar células T regulatórias pelo Sakaguchi (211) e já está sendo usado na clínica (322). Para compreender melhor o papel fundamental de *Foxp3* e a sua regulação epigenética podemos nos referir ao fato de que as células T regulatórias podem ser divididas em três populações tanto pelo processo de diferenciação celular quanto pela origem e pelo status de metilação do TSDR e o promotor. Células Treg naturais apresentam uma desmetilação completa no TSDR e no promotor, porém, células induzidas na periferia perdem a metilação total e ganham algumas CpGs metiladas. Isso serve como controle das Treg dado que se o estímulo desaparecer essas células perdem o fenótipo imunossupressor. Contudo, as mais instáveis em termos de metilação são as Treg induzidas *in vitro*, já que estas podem estar parcialmente metiladas nas nossas regiões alvo (201). Conforme podemos observar na Figura 10, as iTreg sem vírus e com vírus controle apresentaram uma metilação de 33% o que pode estar no limite para ainda permitir a expressão do gene, porém sem muita estabilidade. A partir de 50% de metilação já é possível ver uma queda nos níveis de FOXP3 o que foi observado como efeito dos nossos candidatos de RNAi para TGS.

A segunda região que foi explorada neste trabalho foi o CNS2 ou TSDR, uma região que foi encontrada como desmetilada diferencialmente em células Treg e que possui a maior quantidade de CpGs dentro do gene. O silenciamento desta região pelo candidato TS6 mostrou diminuição no nível de FOXP3 para todas as estratégias de entrega testadas (Figura 8A, 13). Conforme a figura 10, podemos observar que o candidato TS6 apresenta o maior índice de metilação de 87,3%, o que pode explicar seu bom desempenho. É interessante observar que a análise de metilação foi feita apenas em sítios alvo escolhidos na região promotora de *Foxp3*, lembrando que o candidato TS6 foi dirigido à região TSDR,

cerca de 18.000 bases distante deste sítio. Por esta razão, também estamos realizando novos ensaios para verificar o perfil de metilação induzido na região do TSDR, por todos os candidatos de TGS-RNAi e controles. Alterações nos padrões de metilação desta região estão ligados à síndrome *IPEX-like*, que constitui um fenótipo parecido com o produzido quando existe a ausência total de FOXP3 (323). Além disso, foi demonstrado que essa sequência intrônica ajuda a manter a homeostase e limitar doenças autoimunes protegendo a identidade das Treg e mantendo a estabilidade do *Foxp3* e interagindo com o promotor via o fator NFAT por meio de um loop (324). Esse último aspecto pode ser essencial para entender os nossos resultados das análises de metilação e função imunossupressora, uma vez que segundo nossos resultados experimentais, os nossos candidatos contra o TSDR poderiam induzir a metilação no TSDR podendo interferir também na região do promotor e favorecendo assim a metilação dessa região.

O grupo do Dr. Alexander Rudensky do *Memorial Sloan Kettering - EUA*, tem desenvolvido vários trabalhos mostrando o papel do TSDR na regulação do *Foxp3*, mostrando que apesar de ser dispensável para a indução inicial do FOXP3, é requerido para a progênie das células, já que o mesmo FOXP3 se une a esta região fazendo dela um módulo de memória que facilita a herança da linhagem de Treg (222). O TSDR pode ser visto como um mediador da estabilidade da linhagem de Treg, atuando como um sensor de STAT5, o fator de transcrição associado a IL2, mantendo a expressão de *Foxp3* durante a divisão das Treg e evitando a ação de citocinas pro-inflamatórias que poderiam levar a perda de FOXP3 (325). A inativação do *Foxp3* leva a inativação do fenótipo imunossupressor contra células efectoras CD8+ como foi observado na figura 9, usando os candidatos TS6, TI2 e PS5.

5.2 Diferentes estratégias de veiculação de candidatos para TGS baseadas em vetores virais e aptâmeros quiméricos, servem para fazer entrega dos candidatos a células Treg.

Duas estratégias foram avaliadas para fazer a veiculação dos candidatos de TGS-RNAi: vetores lentivirais recombinantes e aptâmeros quiméricos.

Conforme mencionamos anteriormente, iniciamos nossos experimentos com vetores virais gerados no Laboratório de Vetores Virais do LBNio-CNPq, sendo que posteriormente recebemos treinamento para técnicas de produção viral, adquirindo maior independência nos experimentos. Apesar dos vetores virais propiciarem uma alta eficiência de transdução, existem limitações técnicas associadas ao título viral e envelopes que podem ser utilizados, ocasionando como resultado uma heterogeneidade nas células submetidas a transdução, em que em nossos experimentos gerava cerca de 30% de células geneticamente modificadas. Dessa forma, para visualizarmos os efeitos dos candidatos de RNAi, utilizamos um gene marcador veiculado no vetor viral, conferindo a expressão do receptor CD90.1 na célula transduzida. Essa estratégia também possibilitou a separação por *sorting* das células que receberam os nossos vetores de RNAi, viabilizando-se a análise dos padrões de metilação das células transduzidas. Dessa forma, os vetores virais possibilitaram um bom entendimento do mecanismo de TGS-RNAi e então, decidimos explorar a utilização de uma nova estratégia para veiculação alvo-específica baseada num sistema não viral, também dominada por nosso grupo: Os aptâmeros quiméricos.

A ideia de utilizar aptâmeros quiméricos pode ter uma vantagem terapêutica, tendo em vista que o sistema TGS-RNAi precisa veicular apenas uma molécula para inativar uma cópia do gene, o que colocaria o sistema de vetor viral em desvantagem, além do fato de apresentar um maior nível de segurança em comparação com as plataformas virais.

Pudemos observar que os aptâmeros quiméricos de 4-1BB, carreando nossos candidatos de TGS-RNAi (Figuras 11, 12, 13) reproduzem os resultados observados com o vírus para o candidato TS6, oferecendo uma alternativa interessante do uso destas ferramentas para Terapia gênica.

Nas últimas décadas foram desenvolvidas estratégias que envolvem aptâmeros para inibir células T regulatórias. Uma delas foi com o peptídeo P60 que se une a FOXP3 evitando sua translocação para o núcleo, e por tanto inibindo as Treg (326). O grupo de Pastor desenvolveu uma quimera de aptâmero CD28 com o peptídeo P60 (327), que mostrou um efeito antitumoral. Essa estratégia apresenta uma diminuição no número de Treg e um aumento na atividade antitumoral, porém tem um problema semelhante aos sistemas de

inibição pós-transcricionais, em que são necessárias grandes quantidades do peptídeo dentro da célula para conseguir um efeito. Como para cada molécula de FOXP3 deve existir um peptídeo P60, considerando-se que a expressão de *Foxp3* é constitutiva, a entrada de P60 deve ser constante. Com a nossa estratégia só seria necessária a internalização de uma molécula por célula, já que o FOXP3 se encontra no cromossomo X. Outra das estratégias que já foi utilizada usava o aptâmero de CTLA-4 e um siRNA contra STAT6, a qual reduziu efetivamente o número de células Treg (328), mas ao inibir o STAT6 também pode inibir a diferenciação de CD4 em TH2, o que pode antagonizar a resposta imune antitumoral (329). Até agora não existem relatos do uso desta ferramenta (Aptâmero- TGS-RNAi) para imunoterapia de câncer. Recentemente, encontramos apenas um trabalho que reportou pela primeira vez o uso de um aptâmero quimérico contra a proteína viral gp120 e um sasRNA, que conseguiu fazer TGS no promotor 5' LTR para inibir o HIV. O trabalho foi descrito pelo grupo do Dr. Morris, University of New South Wales, Australia, um dos pioneiros no uso de SAS para TGS e foi apresentado no *American Society of Gene & Cell Therapy 18th Annual Meeting* (330), mas ainda não foi publicado na íntegra. Esse seria o primeiro relato de TGS usando aptâmeros quiméricos com sasRNAs.

5.3 O fator de transcrição FOXP3 pode ser inibido em células humanas por meio de vetores virais alvo-dirigidos carreando o sistema CRISPR/CAS

Nos ensaios realizados com TGS-RNAi, demonstramos a possibilidade de silenciar o fator de transcrição *Foxp3* em células primárias de camundongo, utilizando vetores virais e aptâmeros de RNA. Por dispormos do acesso à tecnologia CRISPR/CAS em nosso laboratório, decidimos investigar se este sistema poderia ser utilizado para inibir o *Foxp3* em células humanas. Sendo assim, desenhamos candidatos que apresentavam a possibilidade de inativar o gene *Foxp3*, dirigindo-se a clivagem para uma região bem conservada em ambas espécies humana e murina. Conforme podemos observar nas figuras 14 e 15, conseguimos gerar um candidato, o FP3-CRISPR#2 que apresentou grande eficiência, silenciando o gene *Foxp3* tanto em células murinas como em células humanas.

Em virtude de dificuldades técnicas para obter células humanas primárias, iniciamos nossos experimentos com células tumorais que apresentavam expressão de *Foxp3*. Nestes experimentos conseguimos validar a eficiência de candidatos CRISPR/CAS para inibir FOXP3 humano. Também desenvolvemos vetores virais alvo-específicos, que apresentam o envelope derivado do HIV e, portanto, dirigidos para células CD4 positivas. Estes vetores poderiam ser aprimorados para futuras aplicações clínicas, visto sua especificidade.

O fato de células tumorais poderem apresentar a expressão de FOXP3 acabou chamando nossa atenção e investimos alguns esforços na tentativa de entender se este fator, que é tido como uma chave mestra na determinação fenotípica de Treg, também poderia conferir alguma vantagem à célula tumoral e por isso justificaria sua expressão. O fato do *Foxp3* ser expresso em tumores tem causado bastante controvérsia. Por um lado, têm-se estudos que mostram seu papel como se fosse um gene supressor de tumores (331–333) e outros que mostram que a sua expressão favorece a proliferação e aparição de metástases (169,334–336).

Assim, numa primeira tentativa, verificamos que a inibição de *Foxp3*, com nosso vetor Fp3-CRISPR/CAS, conferia redução na proliferação de células de câncer de mama humano. Nossos experimentos mostraram uma queda de 50% na proliferação de uma linhagem estável que apresenta 50% menos de mRNA de *Foxp3* comparado com a linhagem não silenciada (Figuras 15,16) o que favorece a hipótese do papel deste fator de transcrição, em benefício do câncer, embora ainda desconheçamos como o FOXP3 pode mediar esta proliferação. Este achado nos motivou a empreender mais esforços, em colaboração com o Dr. Paulo Oliveira, especialista em biologia computacional de nossa instituição, para efetuar análises *in silico* na busca de outros indícios que possam relacionar vantagens tumorais com a expressão de *Foxp3*.

5.4 A combinação de vacinas imunomodulatórias pode atuar em sinergia, favorecendo a imunidade antitumoral e induzindo uma proteção duradoura em animais redesafiados

Durante o desenvolvimento deste trabalho nós desenvolvemos uma estratégia para avaliar *in vivo* e *in vitro* a resposta imune antitumoral usando células tumorais modificadas para expressar moléculas imunomoduladoras em sinergia (337). Embora as moléculas imunomoduladoras GM-CSF, OX40L e 4-1BBL já tenham sido usadas como vacinas e descritas em trabalhos da literatura (338–340), nós apresentamos uma estratégia flexível, que pode ser testada *in vitro* e *in vivo* que permite fazer diferentes combinações das vacinas. Os resultados mostraram um efeito de sinergia entre todas as combinações *in vitro*, mas este efeito só foi recapitulado *in vivo* para as combinações de duas vacinas. Também conseguimos avaliar dois métodos diferentes para o estudo da resposta antitumoral usando as vacinas com o repórter de GFP e observando o número de células positivas para GFP que continuam vivas depois de cultivá-las com linfócitos CD4, CD8 ou esplenócitos. Para isto usamos o sistema de imagem de alta demanda operetta e o sistema de alta demanda da citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram também que células submetidas a radiação são um alvo mais fácil para as células CD4 e CD8 pré-ativadas, e inclusive *in vivo*, células B16F10 irradiadas tem um efeito antitumoral que pode ser potencializado pela expressão de moléculas imunomoduladoras na superfície (Itens 4.13 e 4.14).

Estas plataformas *in vitro* e *in vivo* que desenvolvemos, possibilitarão avaliar a sinergia do silenciamento de *Foxp3* veiculado através de aptâmeros junto com as combinações de vacinas imunomodulatórias. Esta terapia poderia ter um impacto antitumoral mais eficiente que o uso das estratégias utilizadas de forma individual. Já existem trabalhos na literatura que mostram que no modelo murino de camundongos transgênicos DREG, a depleção de Treg atua em sinergia com a ação de vacinas antígeno específicas com um efeito terapêutico na regressão do tumor (192). Neste sentido, nossa combinação de estratégias poderia atuar de forma análoga, atuando na inibição de Treg mediada por aptâmeros quiméricos em sinergia à utilização de vacinas antitumorais com propriedades coestimulatórias.

6. CONCLUSÃO

As células T regulatórias tem a função de controlar a tolerância no sistema imune. Trabalhos da literatura demonstram que mutações no gene do fator de transcrição *Foxp3* induzem uma síndrome imune proliferativa, associada à ausência de células T regulatórias (189) e que a expressão exógena de *Foxp3* pode induzir o fenótipo imunossupressor em linfócitos (193) evidenciando a importância de FOXP3 na regulação do fenótipo imunossupressor. Dados da literatura também apontam que células T regulatórias tem sido encontradas em infiltrados tumorais e que este infiltrado pode ser utilizado como um biomarcador de prognóstico inversamente relacionado à sobrevida (341).

Tendo em vista a inespecificidade das estratégias disponíveis para eliminar Treg, sem, no entanto, antagonizar a resposta imune antitumoral, faz-se necessário empreender esforços no desenvolvimento de alternativas. As estratégias apresentadas neste trabalho, permitem uma inibição das Treg, por TGS de *Foxp3*, de forma específica que pode ser veiculada através de aptâmeros ou vetores virais com tropismo específico para CD4. Esta estratégia pode atuar em sinergia com uma combinação de vacinas antitumorais, potencializando o efeito antitumoral e possibilitando-se uma proteção duradoura contra recidivas.

Dentre os resultados obtidos, no desenvolvimento deste trabalho pudemos concluir:

1. O silenciamento transcricional de *Foxp3* pode ser feito por meio de vetores virais e aptâmeros quiméricos de RNA.
2. Observamos em nossos experimentos que silenciamento transcricional de *Foxp3* está relacionado com o aumento de metilação na região promotora de *Foxp3*.
3. O silenciamento transcricional de *Foxp3* está associado à inibição do fenótipo imunossupressor em Treg, conforme resultados de ensaios de proliferação *in vitro*.

4. O gene *Foxp3* pode ser nocauteado em células humanas, utilizando-se vetores lentivirais carreando o sistema CRISPR/CAS. Estes vetores podem ser dirigidos de forma específica para células CD4 positivas, utilizando-se vetores recombinantes revestidos com envelope derivado do HIV.
5. Verificamos a possibilidade de utilizar ensaios *in vitro* para avaliar o efeito de potencialização da eliminação de células tumorais mediadas por células T. O ensaio é baseado na utilização de uma linhagem tumoral geneticamente modificada para expressão de GFP, que é lisada pela célula T coestimulada. O ensaio independe da medida de citocinas, utilização de anticorpos ou compostos radioativos e pode ser feito de forma simples, de baixo custo numa plataforma de alta demanda ou por citometria de fluxo.
6. A combinação de vacinas antitumorais pode atuar de forma sinérgica, induzindo a coestimulação de células T, inibindo células T regulatórias e potencializando-se a resposta imune antitumoral, em animais.

7. REFERÊNCIAS

1. Mukherjee S. The emperor of all maladies. 1st ed. New York: Scribner; 2011. 443 p.
2. William B. Coleman;Tsongalis GJ. The Molecular Basis of Human Cancer. 2nd ed. New York: Springer; 2017. 197-202 p.
3. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013 Sep 19;501:328–37.
4. Stewart BW, Wild CP, editors. World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. 632 p.
5. World Health Organization, Cancer [Internet]. WHO. World Health Organization; 2017 [cited 2017 Sep 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
6. Jemal A, Vineis P, Bray F, Torre L, Forman D, editors. O atlas do Câncer. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2014. 136 p.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.
8. Online by Gerhard Peters and John T. Woolley TAPP <http://www.presidency.ucsb.edu/ws/?pid=3276>. Richard Nixon: Statement About the National Cancer Act of 1971 [Internet]. [cited 2017 Nov 15]. Available from: <http://www.presidency.ucsb.edu/ws/?pid=3276>
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
10. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10.
11. Vakkila J, Lotze MT. Opinion: Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(8):641–8.
12. Ehrlich P. Ueber Den Jetzigen Stand Der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr voor Geneesk*. 1909;(5):273–90.
13. Thomas L. Delayed hypersensitivity in health and disease. In: *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. 1959. p. 529–32.

14. Burnet SM. Cancer-a Biological Approach lii. Viruses Associated With Neoplastic Conditions. *Br Med J*. 1957;1:841–7.
15. Burnet FM. The Concept of Immunological Surveillance against Neoplasia. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1–27.
16. Pantelouris EM. Absence of Thymus in a Mouse Mutant. *Nature*. 1968;217:370–1.
17. Flanagan SP. “Nude”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*. 1966;8(3):295.
18. Stutman O. Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in immunologically deficient athymic nude mice. *Science*. 1974;183(4124):534–6.
19. Outzen H, Custer R, Eaton G, Prehn R. Spontaneous and induced tumor incidence in germfree “nude” mice. *J-Reticuloendothel-Soc*. 1975 Jan;17(1):1–9.
20. Rygaard J, Povlsen CO. Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation*. 1974;(17):135–6.
21. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immuno- surveillance to tumor escape. *Nature*. 2002;3(11):991–8.
22. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol*. 2013;40(6):463–71.
23. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet*. 2014;23(22):5866–78.
24. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546–58.
25. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN

- gamma receptors. *Immunity*. 1994;1(6):447–56.
26. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe a S, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *PNAS*. 1998 Jun 23;95(13):7556–61.
 27. van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*. 1996;184(5):1781–90.
 28. Shankaran V, Ikeda H, Bruce a T, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107–11.
 29. Rubinstein PG, Aboulafia DM, Zloza A. Malignancies in HIV/AIDS. *Aids*. 2014;28(4):453–65.
 30. Chapman JR, Webster AC, Wong G. Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(7):1–15.
 31. Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D, Khosravi A, Garssen J, Velayati A, et al. Cancers related to immunodeficiencies: Update and perspectives. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. 2016. p. 1–13.
 32. Dobzhansky T. Biology, molecular and organismic. *Integr Comp Biol*. 1964;4(4):443–52.
 33. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting : from immuno- surveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991–8.
 34. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):329–60.
 35. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*. 2016;37(3):208–20.
 36. Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21(4):687–92.

37. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(12):924–35.
38. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481.
39. Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23–8.
40. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res*. 2015;21(22):5047–56.
41. Garg AD, Romano E, Rufo N, Agostinis P. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy: mechanisms and clinical translation. *Cell Death Differ*. 2016;23(6):938–51.
42. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):323–70.
43. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(12):940–52.
44. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med*. 2000;192(5):755–60.
45. Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: Pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(5):533–43.
46. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev*. 2010;235(1):93–104.
47. Knight MJ, Riffkin CD, Muscat a M, Ashley DM, Hawkins CJ. Analysis of FasL and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells. *Oncogene*. 2001;20(41):5789–98.
48. Screpanti V, Wallin RPA, Grandien A, Ljunggren HG. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol*. 2005;42(4 SPEC. ISS.):495–9.
49. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011 Dec 22;480(7378):480–9.

50. Miller JFAP, Sadelain M. The Journey from Discoveries in Fundamental Immunology to Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):439–49.
51. Jennifer F-C. Cancer immunotherapy. *Science*. 2013;342(6165):1432–3.
52. COLEY WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. *Am J Med Sci*. 1893;105(5):487–510.
53. Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med*. 1910;3(Surg. Sect.):1–48.
54. Aryan Z, Mellstedt H, Rezaei N. Cancer Immunotherapy Confers a Global Benefit. In: Rezaei N, editor. *Cancer Immunology, cancer Immunotherapy for Organ-Specific Tumors*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 116–24.
55. Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B. Effect of *Bacillus Calmette-Guerin* infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature*. 1959;184(Suppl(4682):291–2.
56. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary *Bacillus Calmette-Guerin* in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. *J Urol*. 1976;116(2):180–3.
57. Morton DL, Eilber FR, Joseph WL, Wood WC, Trahan E, Ketcham AS. Immunological factors in human sarcomas and melanomas: a rational basis for immunotherapy. *Ann Surg*. 1970;172(4):740–9.
58. Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat Rev Urol*. 2014;11(3):153–62.
59. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;
60. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(5):273–90.

61. Irvine DJ. Materializing the future of vaccines and immunotherapy. *Nat Rev Mater.* 2016;1(1):15008.
62. Ophir E, Bobisse S, Coukos G, Harari A, Kandalaft LE. Personalized approaches to active immunotherapy in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2016;1865(1):72–82.
63. Lotze MT, Frana LW, Sharrow SO, Robb RJ, Rosenberg S a. In vivo administration of purified human interleukin 2. I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin 2. *J Immunol.* 1985;134(1):157–66.
64. Murphy CG, Modi S. HER2 breast cancer therapies: a review. *Biologics.* 2009;3:289–301.
65. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012 Apr;12(4):252–64.
66. Monteiro J. Cancer immunotherapy scores again. *Cell.* 2015;160(1–2):7–8.
67. Chang ZL, Chen YY, Car F, Car S, Car T. CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. *Trends Mol Med.* 2017;23(5):430–50.
68. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Cancer Ther Clin.* 2011;17(13):4550–8.
69. Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Gracia JLP, Haanen J. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(8):457–72.
70. Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(8):561–84.
71. Romagnoli GG, Zelante BB, Toniolo PA, Migliori IK, Barbuto JAM. Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by

- converting tumor cells into immunogenic targets. *Front Immunol.* 2015;6(JAN):1–5.
72. Chiang CLL, Benencia F, Coukos G. Whole tumor antigen vaccines. *Semin Immunol.* 2010;22(3):132–43.
 73. Chiang C, Coukos G, Kandalaft L. Whole Tumor Antigen Vaccines: Where Are We? *Vaccines.* 2015;3(2):344–72.
 74. Hanna MG, Brandhorst JS, Peters LC. Active Specific Immunotherapy of Residual Micrometastasis. An Evaluation of Sources, Doses and Ratios of BCG with Tumor Cells. *Cancer Immunology Immunother.* 1979;7:165–73.
 75. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby a, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3539–43.
 76. Verra N, Jansen R, Groenewegen G, Mallo H, Kersten MJ, Bex A, et al. Immunotherapy with concurrent subcutaneous GM-CSF, low-dose IL-2 and IFN-alpha in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003;88(9):1346–51.
 77. de Gast GC, Batchelor D, Kersten MJ, Vyth-Dreese F a, Sein J, van de Kastele WF, et al. Temozolomide followed by combined immunotherapy with GM-CSF, low-dose IL2 and IFN alpha in patients with metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 2003;88(2):175–80.
 78. Nemunaitis J. Vaccines in cancer: GVAX, a GM-CSF gene vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4(3):259–74.
 79. Eager R, Nemunaitis J. GM-CSF gene-transduced tumor vaccines. *Mol Ther.* 2005;12(1):18–27.
 80. Nemunaitis J, Jahan T, Ross H, Sterman D, Richards D, Fox B, et al. Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX® vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther.* 2006;13(6):555–62.

81. Jaffee BEM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Schepers K, Sauter PR, et al. Novel Allogeneic Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor–Secreting Tumor Vaccine for Pancreatic Cancer: A Phase I Trial of Safety and Immune Activation. *J Clin Oncol*. 2001;19(1):145–56.
82. Lutz E, Yeo CJ, Lillemoe KD, Biedrzycki B, Kobrin B, Herman J, et al. A Lethally Irradiated Allogeneic Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor-Secreting Tumor Vaccine for Pancreatic Adenocarcinoma: A Phase II Trial of Safety, Efficacy, and Immune Activation. *Ann Surg*. 2011;253(2):328–35.
83. Blair AB, Zheng L. Rational combinations of immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chinese Clin Oncol*. 2017;6(3):31–31.
84. Le DT, Wang-Gillam A, Picozzi V, Greten TF, Crocenzi T, Springett G, et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria monocytogenes*-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(12):1325–33.
85. Engelstein R, Merims S, Eisenberg G, Cohen J, Frank S, Hamburger T, et al. Immune Monitoring of Patients Treated With a Whole-Cell Melanoma Vaccine Engineered to Express 4-1BBL. *J Immunother*. 2016;39(8):321–8.
86. Gutzmer R, Rivoltini L, Levchenko E, Testori A, Utikal J, Ascierto PA, et al. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study. *ESMO Open*. 2016;1(4):e000068.
87. Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, Jung K, Gillessen S, Singer S, et al. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(17):3343–50.
88. Luiten RM, Kueter EWM, Mooi W, Gallee MPW, Rankin EM, Gerritsen WR, et al. Immunogenicity, including vitiligo, and feasibility of vaccination with autologous GM-CSF-transduced tumor cells in metastatic melanoma patients. *J Clin Oncol*. 2005;23(35):8978–91.

89. Lipson EJ, Sharfman WH, Chen S, Mcmiller TL, Pritchard TS, Salas JT, et al. Safety and immunologic correlates of Melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting. *J Transl Med.* 2015;13:214.
90. Van den Eertwegh AJM, Versluis J, Van den Berg HP, Santegoets SJAM, Van Moorselaar RJA, Van der Sluis TM, et al. Combined immunotherapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic prostate cancer cells and ipilimumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(5):509–17.
91. Weller M, Roth P, Preusser M, Wick W, Reardon DA, Platten M, et al. Vaccine-based immunotherapeutic approaches to gliomas and beyond. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(6):363–74.
92. Prins RM, Soto H, Konkankit V, Odesa SK, Eskin A, Yong WH, et al. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1603–15.
93. Biotherapeutics N. Study of a Drug [DCVax®-L] to Treat Newly Diagnosed GBM Brain Cancer [Internet]. *Clinical Trials.* 2014 [cited 2017 Nov 13]. p. 1. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00045968>
94. Enock A, Ndefo U. Sipuleucel-T (Provenge) Injection The First Immunotherapy Agent (Vaccine) For Hormone-Refractory Prostate Cance. *Drug Forecast.* 2011;36(4):197–202.
95. Andtbacka RH, Collichio FA, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, Delman K, et al. Final planned overall survival (OS) from OPTiM, a randomized Phase III trial of talimogene laherparepvec (T-VEC) versus GM-CSF for the treatment of unresected stage IIIB/C/IV melanoma (NCT00769704). *J Immunother Cancer.* 2014;2(Suppl 3):P263.
96. Yan W-L, Shen K-Y, Tien C-Y, Chen Y-A, Liu S-J. Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy.* 2017;9(4):347–60.
97. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving

- beyond current vaccines. *Nat Med*. 2004;10(9):909–15.
98. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily : 25 years later , a golden journey. *Hematology*. 2012;119(3):651–65.
 99. Ware CF, Ward-kavanagh LK, Lin WW, Sedy JR. Review The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity*. 2016;44.
 100. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol*. 2003 Aug;3(8):609–20.
 101. Croft M, Benedict C a, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(2):147–68.
 102. Kober J, Leitner J, Klauser C, Woitek R, Majdic O, Stöckl J, et al. The capacity of the TNF family members 4-1BBL, OX40L, CD70, GITRL, CD30L and LIGHT to costimulate human T cells. *Eur J Immunol*. 2008;38(10):2678–88.
 103. Gramaglia I, Weinberg A, Lemon M, Croft M. OX40 Ligand: A Potent Costimulatory Molecule for Sustaining Primary CD4 T Cell Responses1. *J Immunol*. 1998;161(12):6510–7.
 104. Dawicki W, Bertram EM, Sharpe AH, Watts TH. 4-1BB and OX40 act independently to facilitate robust CD8 and CD4 recall responses. *J Immunol*. 2004;173(10):5944–51.
 105. Futagawa T, Akiba H, Kodama T, Takeda K, Hosoda Y, Yagita H, et al. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol*. 2002;14(3):275–86.
 106. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*. 2009 Apr;9(4):271–85.
 107. Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Corthesy P, Puklavec M, et al. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol Immunol*. 1987;24(12):1281–90.

108. Baum PR, Gayle RB, Ramsdell F, Srinivasan S, Sorensen RA, Watson ML, et al. Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34. *EMBO J.* 1994;13(17):3992–4001.
109. Croft M. Control of Immunity by the TNFR-Related Molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:57–78.
110. Kroemer A, Xiao X, Vu MD, Gao W, Minamimura K, Chen M, et al. OX40 Controls Functionally Different T Cell Subsets and Their Resistance to Depletion Therapy. *J Immunol.* 2007;179(8):5584–91.
111. Bansal-pakala P, Halteman BS, Huey-yu M, Cheng MH-Y, Croft M. Costimulation of CD8 T cell responses by OX40. *J Immunol.* 2004;172(8):4821–5.
112. Murata K, Ishii N, Takano H, Miura S, Ndhlovu LC, Nose M, et al. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J Exp Med.* 2000;191(2):365–74.
113. Chen a I, McAdam a J, Buhlmann JE, Scott S, Lupher ML, Greenfield E a, et al. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity.* 1999;11(6):689–98.
114. Brocker T, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Riedinger M, Raykundalia C, Lane P. CD4 T cell traffic control: *in vivo* evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles. *Eur J Immunol.* 1999;29(5):1610–6.
115. Murata K, Nose M, Ndhlovu LC, Sato T, Sugamura K, Ishii N. Constitutive OX40/OX40 Ligand Interaction Induces Autoimmune-Like Diseases. *J Immunol.* 2002;169(8):4628–36.
116. Gough MJ, Ruby CE, Redmond WL, Dhungel B, Brown A, Weinberg AD. OX40 agonist therapy enhances CD8 infiltration and decreases immune suppression in the tumor. *Cancer Res.* 2008;68(13):5206–15.
117. Weinberg AD, Rivera M-M, Prell R, Morris A, Ramstad T, Vetto JT, et al.

- Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity. *J Immunol.* 2000;164(4):2160–9.
118. Ali SA, Ahmad M, Lynam J, Mclean CS, Entwisle C, Loudon P, et al. Anti-tumour therapeutic efficacy of OX40L in murine tumour model. *Vaccine.* 2004;22(27–28):3585–94.
 119. Murata S, Ladle BH, Kim PS, Lutz ER, Wolpoe ME, Ivie SE, et al. OX40 costimulation synergizes with GM-CSF whole-cell vaccination to overcome established CD8⁺ T cell tolerance to an endogenous tumor antigen. *J Immunol.* 2006;176(2):974–83.
 120. Gri G, Gallo E, Di Carlo E, Musiani P, Colombo MP. OX40 ligand-transduced tumor cell vaccine synergizes with GM-CSF and requires CD40-Apc signaling to boost the host T cell antitumor response. *J Immunol.* 2003;170(1):99–106.
 121. Murphy KA, Erickson JR, Johnson CS, Seiler CE, Bedi J, Hu P, et al. CD8⁺ T cell-independent tumor regression induced by Fc-OX40L and therapeutic vaccination in a mouse model of glioma. *J Immunol.* 2014;192(1):224–33.
 122. Ito T, Wang Y-H, Duramad O, Hanabuchi S, Perng O a, Gilliet M, et al. OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(35):13138–43.
 123. Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, et al. OX40 costimulation turns off Foxp3⁺ Tregs. *Blood.* 2007;110(7):2501–10.
 124. Piconese S, Valzasina B, Colombo MP. OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J Exp Med.* 2008;205(4):825–39.
 125. Ruby CE, Yates M a, Hirschhorn-Cymerman D, Chlebeck P, Wolchok JD, Houghton AN, et al. Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J Immunol.* 2009;183(8):4853–7.
 126. Curti BD, Kovacsovics-Bankowski M, Morris N, Walker E, Chisholm L, Floyd K, et al. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage

- cancer patients. *Cancer Res.* 2013;73(24):7189–98.
127. Kwon BS, Weissman SM. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(6):1963–7.
 128. Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol.* 2015;5(June):117.
 129. Cannons JL, Lau P, Ghumman B, Debenedette MA, Yagita H, Okumura K, et al. 4-1BB Ligand Induces Cell Division, Sustains Survival, and Enhances Effector Function of CD4 and CD8 T Cells with Similar Efficacy. *J Immunol.* 2001;167(167):1313–24.
 130. Sanchez-Paulete AR, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, Azpilikueta A, Etxeberria I, Bolaños E, et al. Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2016;46(3):513–22.
 131. Lee H-W, Park S-J, Choi BK, Kim HH, Nam K-O, Kwon BS. 4-1BB Promotes the Survival of CD8⁺ T Lymphocytes by Increasing Expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol.* 2002;169(9):4882–8.
 132. Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Jun;14(3–4):265–73.
 133. Frigault MJ, Lee J, Basil MC, Carpenito C, Motohashi S, Scholler J, et al. Identification of Chimeric Antigen Receptors That Mediate Constitutive or Inducible Proliferation of T Cells. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(4):356–67.
 134. Ye Q, Song DG, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, et al. CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. *Clin Cancer Res.* 2014;20(1):44–55.
 135. Chacon JA, Wu RC, Sukhumalchandra P, Molldrem JJ, Sarnaik A, Pilon-thomas S, et al. Co-Stimulation through 4-1BB/CD137 Improves the Expansion and Function of CD8⁺ Melanoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Adoptive T-Cell Therapy. *PLoS One.* 2013;8(4).
 136. Ju SA, Lee SC, Kwon TH, Heo SK, Park SM, Paek HN, et al. Immunity to melanoma mediated by 4-1BB is associated with enhanced activity of

- tumour-infiltrating lymphocytes. *Immunol Cell Biol.* 2005;83(4):344–51.
137. Xiao H, Huang B, Yuan Y, Li D, Han LF, Liu Y, et al. Soluble PD-1 facilitates 4-1BBL - Triggered antitumor immunity against murine H22 hepatocarcinoma in vivo. *Clin Cancer Res.* 2007;13(6):1823–30.
 138. Li B, Lin J, VanRoey M, Jure-Kunkel M, Jooss K. Established B16 tumors are rejected following treatment with GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapy in combination with anti-4-1BB mAb. *Clin Immunol.* 2007;125(1):76–87.
 139. Adappa ND, Sung C, Choi B, Huang T, Genden EM, Shin EJ. The administration of IL-12 / GM-CSF and Ig-4-1BB ligand markedly decreases murine floor of mouth squamous cell cancer. 2008;442–8.
 140. Kuang Y, Zhang L, Weng X, Liu X, Zhu H. Combination immunotherapy with 4-1BBL and CTLA-4 blockade for the treatment of prostate cancer. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
 141. Molckovsky A, Siu LL. First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting. *J Hematol Oncol.* 2008;1:20.
 142. Ascierto PA, Simeone E, Sznol M, Fu YX, Melero I. Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol.* 2010;37(5):508–16.
 143. Polte T, Foell J, Werner C. CD137-mediated immunotherapy for allergic asthma. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1025.
 144. Kim J, Choi WS, La S, Suh J, Kim B, Cho HR, et al. Stimulation with 4-1BB (CD137) inhibits chronic graft-versus-host disease by inducing activation-induced cell death of donor CD4⁺ T cells. *Transplantation.* 2005;105(5):2206–13.
 145. Choi BK, Bae JS, Choi EM, Kang WJ, Sakaguchi S, Vinay DS, et al. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4⁺ CD25⁺ T cells Abstract : *J I.* 2004;75(May):785–91.
 146. So T, Lee S-W, Croft M, Manuscript A, Regulation I. Immune regulation

- and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(3–4):253–62.
147. Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol.* 2015;5(June):1–16.
 148. Oh HS, Choi BK, Kim YH, Lee DG, Hwang S, Lee MJ, et al. 4-1BB signaling enhances primary and secondary population expansion of CD8⁺ T cells by maximizing autocrine IL-2/IL-2 receptor signaling. *PLoS One.* 2015;10(5):2–15.
 149. Manuscript A, Regulation I. Immune Regulation and Control of Regulatory T cells by OX40 and 41BB. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19:253–62.
 150. Cheuk AT, Mufti GJ, Guinn BA. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2004;11(3):215–26.
 151. Lee S-J, Myers L, Muralimohan G, Dai J, Qiao Y, Li Z, et al. 4-1BB and OX40 dual costimulation synergistically stimulate primary specific CD8 T cells for robust effector function. *J Immunol.* 2004;173(5):3002–12.
 152. Ventola CL. Cancer Immunotherapy , Part 2 : Efficacy , Safety , and Other Clinical Considerations. *Pharmacol Ther.* 2017;42(7):452–63.
 153. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:267–96.
 154. Chen X-L, Chen Z-Q, Zhu S-L, Liu T-W, Wen Y, Su Y-S, et al. Prognostic value of transforming growth factor-beta in patients with colorectal cancer who undergo surgery: a meta- analysis. *BMC Cancer.* 2017;17(240):1–11.
 155. Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer.* 2015;3(1):51.
 156. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5(October):15179.
 157. Stewart TJ, Abrams SI. How tumours escape mass destruction. *Oncogene.*

2008;27(45):5894–903.

158. Josefowicz SZ, Lu L-FF, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30(1):531–64.
159. Sakaguchi BYS, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J Exp Bot*. 1982;156.
160. Ohki H, Martin C, Corbel C, Coltey M, Le Douarin NM. Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds. *Science*. 1987;237(4818):1032–5.
161. Modigliani Y, Thomas-Vaslin V, Bandeira A, Coltey M, Le Douarin NM, Coutinho A, et al. Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7555–9.
162. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151–64.
163. Asano M. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996;184(2):387–96.
164. Huang Y, Liao H, Zhang Y, Yuan R, Wang F, Gao Y, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating FoxP3 + T Cells in Gastrointestinal Cancers : A Meta Analysis. *PLoS One*. 2014;9(5).
165. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5423–34.
166. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: Possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*. 2003;98(5):1089–99.

167. Lopes LF, Guembarovski RL, Guembarovski AL, Kishima MO, Campos CZ, Massayo J, et al. FOXP3 Transcription Factor : A Candidate Marker for Susceptibility and Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. 2014;2014.
168. Takenaka M, Seki N, Toh U, Hattori S, Kawahara A, Yamaguchi T, et al. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(4):625–32.
169. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(11):1746–52.
170. Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(5):483–8.
171. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(51):18538–43.
172. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, Demarzo AM, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals T H17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res*. 2008;14(11):3254–61.
173. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor- infiltrating FoxP3 + regulatory T cells in cancers : a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5(October):1–9.
174. Salama P, Phillips M, Grien F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jan 10;27(2):186–92.
175. Frey DM, Drieser RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2010;126(11):2635–43.

176. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. Intraepithelial Effector (CD3+)/Regulatory (FoxP3+) T-Cell Ratio Predicts a Clinical Outcome of Human Colon Carcinoma. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1270–9.
177. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*. 2017;27(1):109–18.
178. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, et al. Two FOXP3+CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*. 2016 Apr 25;22(6):679–84.
179. Antibody M, Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, et al. Tumor Rejection by in Vivo Administration of Anti-CD25 (Interleukin-2 Receptor alfa) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999;59:3128–33.
180. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163(10):5211–8.
181. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(44):17945–50.
182. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med*. 2013;210(9):1695–710.
183. Motoyoshi Y, Kaminoda K, Saitoh O, Hamasaki K, Nakao K, Ishii N, et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol Rep*. 2006;16(1):141–6.
184. Berd D, Mastrangelo MJ, Cd D, Herd D. Effect of Low Dose Cyclophosphamide on the Immune System of Cancer Patients : Depletion of CD4 + , 2H4 + Effect of Low Dose Cyclophosphamide on the Immune System of Cancer Patients : 1988;1671–5.

185. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol.* 2004;34(2):336–44.
186. Lutsiak MEC, Semnani RT, Pascalis R De, Kashmiri SVS, Sabzevari H, De W, et al. Inhibition of CD4+ 25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood.* 2005;105(7):2862–8.
187. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. Cyclophosphamide Toxicity: Characterising and Avoiding the Problem. *Drugs.* 1991;42(5):781–95.
188. Ramsdell F, Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat Rev Immunol.* 2014 Apr 11;(April):1–7.
189. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(January):20–1.
190. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell.* 2006;126(2):375–87.
191. Wildin RS, Ramsdell F, Faravelli F, Buist N, Levy E, Mazzella M, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat gen.* 2001;27(january):20–1.
192. Klages K, Mayer CT, Lahl K, Loddenkemper C, Teng MWL, Ngiow SF, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):7788–99.
193. Loser K, Hansen W, Apelt J, Balkow S, Buer J, Beissert S. In vitro-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity. *Gene Ther.* 2005;12(17):1294–304.

194. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007 Mar;8(3):277–84.
195. Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):337–42.
196. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057–61.
197. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity.* 2005;22:329–41.
198. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu T-T, Gavin M a, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):936–40.
199. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature.* 2007;445(7130):931–5.
200. Samstein RM, Arvey A, Josefowicz SZ, Peng X, Reynolds A, Sandstrom R, et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell.* 2012;151(1):153–66.
201. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. Vol. 37, *Trends in Immunology.* Elsevier Ltd; 2016. p. 803–11.
202. Mucida D, Pino-Lagos K, Kim G, Nowak E, Benson MJ, Kronenberg M, et al. Retinoic Acid Can Directly Promote TGF- β -Mediated Foxp3⁺ Treg Cell Conversion of Naive T Cells. *Immunity.* 2009;30(4):471–2.
203. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012 Jan;30:531–64.
204. Pedroza-Pacheco I, Madrigal A, Saudemont A. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cell Mol*

- Immunol. 2013;10(3):222–9.
205. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity*. 2009;30(5):636–45.
 206. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1 / Runx1. 2007;446(April):685–9.
 207. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353–62.
 208. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science*. 2008;322(5899):271–5.
 209. Li MO, Rudensky AY. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(4):220–33.
 210. Campbell DJ, Koch M a. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):119–30.
 211. Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: From a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev*. 2014;259(1):192–205.
 212. Origin and meaning of regulate by Online Etymology Dictionary [Internet]. [cited 2017 Nov 20]. Available from: <https://www.etymonline.com/word/regulate>
 213. Teng MWL, Ngio SF, von Scheidt B, McLaughlin N, Sparwasser T, Smyth MJ. Conditional regulatory T-cell depletion releases adaptive immunity preventing carcinogenesis and suppressing established tumor growth. *Cancer Res*. 2010 Oct 15;70(20):7800–9.
 214. Fontenot JD, Gavin M a, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330–6.

215. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*. 2004 Oct;4(10):1614–27.
216. Quddus J, Johnson KJ, Gavalchin J, Amento EP, Chrisp CE, Yung RL, et al. Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest*. 1993;92(1):38–53.
217. Rudra D, DeRoos P, Chaudhry A, Niec RE, Arvey A, Samstein RM, et al. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol*. 2012 Oct;13(10):1010–9.
218. Kim H-P, Leonard WJ. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med*. 2007 Jul 9;204(7):1543–51.
219. Mantel P-Y, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, et al. Molecular Mechanisms Underlying FOXP3 Induction in Human T Cells. *J Immunol*. 2006 Mar 3;176(6):3593–602.
220. Ruan Q, Kameswaran V, Tone Y, Li L, Liou H, Mark I, et al. Development Of Foxp3+ Regulatory T Cells Is Driven By A c-Rel Enhanceosome. *Immunity*. 2009;31(6):932–40.
221. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol*. 2008 Feb;9(2):194–202.
222. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*. 2010 Feb 11;463(7282):808–12.
223. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*. 2017;
224. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*. 2017;

225. Bandukwala HS, Wu Y, Feuerer M, Chen Y, Barboza B, Ghosh S, et al. Structure of a Domain-Swapped FOXP3 Dimer on DNA and Its Function in Regulatory T Cells. *Immunity*. 2011 Apr;34(4):479–91.
226. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007 Sep;37(9):2378–89.
227. Mantel P-Y, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol*. 2006;176(6):3593–602.
228. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007 Sep;37(9):2378–89.
229. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007 Feb;5(2):e38.
230. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol*. 2009 Feb;9(2):83–9.
231. Lal G, Zhang N, Touw W Van Der, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, et al. Epigenetic Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory. 2009;
232. Josefowicz SZ, Wilson CB, Rudensky AY. Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *J Immunol*. 2009 Jun 1;182(11):6648–52.
233. Loosdregt J Van, Coffe PJ, van Loosdregt J, Coffe PJ, Loosdregt J Van, Coffe PJ, et al. Post-translational modification networks regulating FOXP3 function. *Trends Immunol*. 2014;35(8):368–78.
234. Wang L, Kumar S, Dahiya S, Wang F, Wu J, Newick K, et al. Ubiquitin-specific Protease-7 Inhibition Impairs Tip60-dependent Foxp3 + T-

- regulatory Cell Function and Promotes Antitumor Immunity. *EBioMedicine*. 2016;13:99–112.
235. Goldstein MJ, Kohrt HE, Houot R, Varghese B, Lin JT, Swanson E, et al. Adoptive cell therapy for lymphoma with CD4 T cells depleted of CD137-expressing regulatory T cells. *Cancer Res*. 2012;72(5):1239–47.
 236. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806–11.
 237. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 [Internet]. [cited 2017 Nov 20]. Available from: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/
 238. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Feb;11(2):125–40.
 239. Morris K V., Mattick JS. The rise of regulatory RNA. *Nat Rev Genet*. 2014 Jun 29;15(6):423–37.
 240. Younger ST, Corey DR. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(13):5682–91.
 241. Martin SE, Caplen NJ. Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2007;8(July):81–108.
 242. Matzke M a, Birchler J a. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*. 2005 Jan;6(1):24–35.
 243. Morris K V. RNA-directed transcriptional gene silencing and activation in human cells. *Oligonucleotides*. 2009;19(4):299–306.
 244. Morris K V. RNA-directed transcriptional gene silencing and activation in human cells. *Oligonucleotides*. 2009 Dec;19(4):299–306.
 245. Hawkins PG, Santoso S, Adams C, Anest V, Morris K V. Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells.

- Nucleic Acids Res. 2009 May;37(9):2984–95.
246. Hawkins PG, Santoso S, Adams C, Anest V, Morris K V. Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. Nucleic Acids Res. 2009 May;37(9):2984–95.
 247. Grewal SIS, Elgin SCR. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. Nature. 2007 May 24;447(7143):399–406.
 248. Napoli S, Pastori C, Magistri M, Carbone GM, Catapano C V. Promoter-specific transcriptional interference and c-myc gene silencing by siRNAs in human cells. EMBO J. 2009 Jun 17;28(12):1708–19.
 249. Jiang G, Zheng L, Pu J, Mei H, Zhao J, Huang K, et al. Small RNAs targeting transcription start site induce heparanase silencing through interference with transcription initiation in human cancer cells. PLoS One. 2012;7(2):1–13.
 250. Westra ER, Dowling AJ, Broniewski JM, van Houte S. Evolution and Ecology of CRISPR. Annu Rev Ecol Evol Syst. 2016;47(1):307–31.
 251. Wang H, Russa M La, Qi LS. CRISPR / Cas9 in Genome Editing and Beyond. Annu Rev Biochem. 2016;82:227–64.
 252. Xiong X, Chen M, Lim WA, Zhao D, Qi LS. CRISPR/Cas9 for Human Genome Engineering and Disease Research. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2016;17(1):131–54.
 253. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. Science. 2017;180(October):eaq0180.
 254. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature. 2017;1–27.
 255. Weinberg MS, Morris K V. Transcriptional gene silencing in humans. Nucleic Acids Res. 2016;44(14):6505–17.
 256. Bouard D, Alazard-Dany N, Cosset F-L. Viral vectors: from virology to

- transgene expression. *Br J Pharmacol.* 2009;157(2):153–65.
257. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.* 1997;15(9):871–5.
 258. Strauss BE, Patrício JR, de Carvalho ACV, Bajgelman MC. A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: A potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348(4):1411–8.
 259. Costello E, Munoz M, Buetti E, Meylan PRA, Diggelmann H, Thali M. Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther.* 2000;7(7):596–604.
 260. Bressan FF, Miranda MS, Bajgelman MC, Perecin F, Mesquita LG, Fantinato-Neto P, et al. Effects of long-term in vitro culturing of transgenic bovine donor fibroblasts on cell viability and in vitro developmental potential after nuclear transfer. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2013;49(4):250–9.
 261. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J.* 2012;443(3):603–18.
 262. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay M a. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003 May;4(5):346–58.
 263. Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, Bartholomae C, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol.* 2006 Jun 28;24(6):687–96.
 264. Sandrin V, Boson B, Salmon P, Gay W, Nègre D, Le Grand R, et al. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood.* 2002;100(3):823–32.
 265. Watson DJ, Kobinger GP, Passini MA, Wilson JM, Wolfe JH. Targeted Transduction Patterns in the Mouse Brain by Lentivirus Vectors

- Pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV Envelope Proteins. *Mol Ther*. 2002;5(5):528–37.
266. Schambach A, Galla M, Modlich U, Will E, Chandra S, Reeves L, et al. Lentiviral vectors pseudotyped with murine ecotropic envelope: increased biosafety and convenience in preclinical research. *Exp Hematol*. 2006 May;34(5):588–92.
 267. Pouw NMC, Westerlaken EJ, Willemsen RA, Debets R. Gene transfer of human TCR in primary murine T cells is improved by pseudo-typing with amphotropic and ecotropic envelopes. *J Gene Med*. 2007;9:561–70.
 268. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996 Apr 12;272(5259):263–7.
 269. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee J-K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells (gene therapy/zebrafish). *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90(September):8033–7.
 270. Cronin J, Zhang X-Y, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther*. 2005;5(4):387–98.
 271. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302(5644):415–9.
 272. Du Y, Jenkins NA, Copeland NG. Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary bone marrow progenitor cells. *Gene*. 2005;106(12):3932–9.
 273. Modlich U, Böhne J, Schmidt M, Von Kalle C, Knöss S, Schambach A, et al. Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood*. 2006;108(8):2545–53.
 274. Pike-Overzet K, de Ridder D, Weerkamp F, Baert MRM, Verstegen MM,

- Brugman MH, et al. Gene therapy: Is IL2RG oncogenic in T-cell development? *Nature*. 2006;443(7109):E5–E5.
275. Mátrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent Advances in Lentiviral Vector Development and Applications. *Mol Ther*. 2010;18(3):477–90.
 276. Bushman F. Retroviral integration and human gene therapy. *J Clin Invest*. 2007;117(8):1–4.
 277. Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans – immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990;323(9):570–578.
 278. Frigault MJ, Maus M V. Chimeric antigen receptor-modified T cells strike back. *Int Immunol*. 2016;28(7):355–63.
 279. FDA. Press Announcements - FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma [Internet]. 18/10/2017. Office of the Commissioner; [cited 2017 Nov 15]. Available from: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm581216.htm>
 280. Rozenblum GT, Lopez VG, Vitullo AD, Radrizzani M. Aptamers: current challenges and future prospects. *Expert Opin Drug Discov*. 2016;11(2):127–35.
 281. Nimjee SM, White RR, Becker RC, Sullenger BA. Aptamers as Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2017;57(1):61–79.
 282. Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;16(3):181–202.
 283. Berezhnoy A, Brenneman R, Bajgelman M, Seales D, Gilboa E. Thermal Stability of siRNA Modulates Aptamer- conjugated siRNA Inhibition. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2012;1(May):e51.
 284. Oney S, Lam RTS, Bompiani KM, Blake CM, Quick G, Heidel JD, et al. Development of universal antidotes to control aptamer activity. *Nat Med*. 2009;15(10):1224–8.

285. Feng S, Holland EC. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature*. 1988;334(6178):165–7.
286. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505–10.
287. Ellington a D, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818–22.
288. Thiel KW, Giangrande PH. Intracellular delivery of RNA-based therapeutics using aptamers. *Ther Deliv*. 2010;1(6):849–61.
289. Zhou J, Li H, Li S, Zaia J, Rossi JJ. Novel Dual Inhibitory Function Aptamer–siRNA Delivery System for HIV-1 Therapy. *Mol Ther*. 2008;16(8):1481–9.
290. Zhou J, Swiderski P, Li H, Zhang J, Neff CP, Akkina R, et al. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):3094–109.
291. Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, Coffey DS. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen 1. *Cancer Res*. 2002;62:4029–33.
292. McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, et al. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol*. 2006;24(8):1005–15.
293. Dassie JP, Liu X, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR, et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat Biotechnol*. 2009;27(9):839–46.
294. Dollins CM, Nair S, Boczkowski D, Lee J, Layzer JM, Gilboa E, et al. Assembling OX40 Aptamers on a Molecular Scaffold to Create a Receptor-Activating Aptamer. *Chem Biol*. 2008;15(7):675–82.

295. Pastor F, Kolonias D, McNamara li JO, Gilboa E. Targeting 4-1BB Costimulation to Disseminated Tumor Lesions With Bi-specific Oligonucleotide Aptamers. *Mol Ther*. 2011;19(10):1878–86.
296. Berezhnoy A, Stewart CA, Mcnamara II JO, Thiel W, Giangrande P, Trinchieri G, et al. Isolation and Optimization of Murine IL-10 Receptor Blocking Oligonucleotide Aptamers Using High-throughput Sequencing. *Mol Ther*. 2012;20(6):1242–50.
297. Santulli-marotto S, Nair SK, Rusconi C, Santulli-marotto S, Nair SK, Rusconi C, et al. Multivalent RNA Aptamers That Inhibit CTLA-4 and Enhance Tumor Immunity Multivalent RNA Aptamers That Inhibit CTLA-4 and Enhance Tumor Immunity 1. *Cancer Res*. 2003;63:7483–9.
298. Prodeus A, Abdul-Wahid A, Fischer NW, Huang EH-B, Cydzik M, Gariépy J. Targeting the PD-1/PD-L1 Immune Evasion Axis With DNA Aptamers as a Novel Therapeutic Strategy for the Treatment of Disseminated Cancers. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2015;4(March):e237.
299. Hervas-stubbs S, Soldevilla MM, Villanueva H. Identification of TIM3 2' - fluoro oligonucleotide aptamer by HT-SELEX for cancer immunotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(4):4522–30.
300. Gilboa E, McNamara J, Pastor F. Use of oligonucleotide aptamer ligands to modulate the function of immune receptors. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):1054–62.
301. li JOM, Kolonias D, Pastor F, Mittler RS, Chen L, Giangrande PH, et al. Technical advance Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8 + T cells and inhibit tumor growth in mice. 2008;118(1).
302. Berezhnoy A, Castro I. Aptamer-targeted inhibition of mTOR in T cells enhances antitumor immunity. *J* 2014;124(1):4–13.
303. Pastor F, Kolonias D, Giangrande PH, Gilboa E. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*. 2010 May 13;465(7295):227–30.
304. Loots GG, Ovcharenko I, Pachter L, Dubchak I, Rubin EM. rVista for

- Comparative Sequence-Based Discovery of Functional Transcription Factor Binding Sites rVista for Comparative Sequence-Based Discovery of Functional Transcription Factor Binding Sites. *Genome Res.* 2002;832–9.
305. Ackley A, Lenox A, Stapleton K, Knowling S, Lu T, Sabir KS, et al. An Algorithm for Generating Small RNAs Capable of Epigenetically Modulating Transcriptional Gene Silencing and Activation in Human Cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013 Jan;2(May):e104.
 306. Heale BSE, Soifer HS, Bowers C, Rossi JJ. siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan;33(3):e30.
 307. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods.* 2014;11(8):783–4.
 308. Danos O, Mulligan RC. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85(17):6460–4.
 309. Schnierle BS, Stitz J, Bosch V, Nocken F, Merget-Millitzer H, Engelstädter M, et al. Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(16):8640–5.
 310. Rohde C, Zhang Y, Reinhardt R, Jeltsch A. BISMA--fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:230.
 311. Xu L, Kitani a, Strober W. Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol.* 2010 May;3(3):230–8.
 312. Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski A V., Sievers C, Yang L, Kopinja J, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet.* 2003;33(3):401–6.
 313. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells

- Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*. 2003;9(4):493–501.
314. Aagaard L, Amarzguioui M, Sun G, Santos LC, Ehsani A, Prydz H, et al. A Facile Lentiviral Vector System for Expression of Doxycycline-Inducible shRNAs: Knockdown of the Pre-miRNA Processing Enzyme Drosha. *Mol Ther*. 2007;15(5):938–45.
 315. Scherr M, Venturini L, Battmer K, Schaller-schoenitz M, Schaefer D, Dallmann I, et al. Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22).
 316. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee J-K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells (gene therapy/zebrafish). *Genetics*. 1993;90(September):8033–7.
 317. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, et al. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med*. 2008;6:19.
 318. Overwijk W, Restifo N. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Curr Protoc Immunol*. 2001;1–33.
 319. Waight JD, Takai S, Marelli B, Qin G, Hance KW, Zhang D, et al. Cutting edge: epigenetic regulation of Foxp3 defines a stable population of CD4+ regulatory T cells in tumors from mice and humans. *J Immunol*. 2015;194(3):878–82.
 320. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol*. 2008 Jun;38(6):1654–63.
 321. Janson PCJ, Winerdal ME, Marits P, Thörn M, Ohlsson R, Winqvist O, et al. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One*. 2008 Jan;3(2):e1612.
 322. Zhuo C, Li Z, Xu Y, Wang Y, Li Q, Peng J, et al. Higher FOXP3-TSDR demethylation rates in adjacent normal tissues in patients with colon cancer

- were associated with worse survival. *Mol Cancer*. 2014;13(1):153.
323. Barzaghi F, Passerini L, Gambineri E, Ciullini Mannurita S, Cornu T, Kang ES, et al. Demethylation analysis of the FOXP3 locus shows quantitative defects of regulatory T cells in IPEX-like syndrome. *J Autoimmun*. 2012 Feb;38(1):49–58.
 324. Li X, Liang Y, LeBlanc M, Benner C, Zheng Y. Function of a Foxp3 cis-Element in Protecting Regulatory T Cell Identity. *Cell*. 2014 Aug 14;158(4):734–48.
 325. Feng Y, Arvey A, Chinen T, Van Der Veecken J, Gasteiger G, Rudensky AY. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the foxp3 locus. *Cell*. 2014;158(4):749–63.
 326. Casares N, Rudilla F, Arribillaga L, Llopiz D, Riezu-Boj JI, Lozano T, et al. A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice. *J Immunol*. 2010;185(9):5150–9.
 327. Lozano T, Soldevilla MM, Casares N, Villanueva H, Bendandi M, Lasarte JJ, et al. Targeting inhibition of Foxp3 by a CD28 2'-Fluoro oligonucleotide aptamer conjugated to P60-peptide enhances active cancer immunotherapy. *Biomaterials*. 2016;91:73–80.
 328. Herrmann A, Priceman SJ, Kujawski MI, Xin H, Cherryholmes GA, Zhang W, et al. CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells. *J Clin Invest*. 2014;124(7):2977–87.
 329. Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene*. 2000;19(2000):2577–84.
 330. Lazar DC, Zhou JH, Saayman S, Rossi JJ, Morris K V, Weinburg MS. Aptamer-siRNA Conjugate Directed Transcriptional Gene Silencing in HIV-1 Infected T Cells. *Mol Ther*. 2015;23(May):S27–8.
 331. Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*. 2010 Jul 22;29(29):4121–9.
 332. Zuo T, Liu R, Zhang H, Chang X, Liu Y, Wang L, et al. Is a Novel Transcriptional Repressor for the Breast Cancer Oncogene.

- 2007;117(12):3765–73.
333. Wang L, Liu R, Li W, Chen C, Katoh H, Chen GY, et al. Somatic Single Hits Inactivate the X-Linked Tumor Suppressor FOXP3 in the Prostate. *Cancer Cell*. 2009;16(4):336–46.
 334. Kim M, Grimmig T, Grimm M, Lazariotou M, Meier E, Rosenwald A, et al. Expression of Foxp3 in Colorectal Cancer but Not in Treg Cells Correlates with Disease Progression in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):1–10.
 335. Kim MH, Koo JS, Lee S. FOXP3 expression is related to high ki-67 index and poor prognosis in lymph node-positive breast cancer patients. *Oncology*. 2013;85(2):128–36.
 336. Yoshii M, Tanaka H, Ohira M, Muguruma K, Iwauchi T, Lee T, et al. Expression of Forkhead box P3 in tumour cells causes immunoregulatory function of signet ring cell carcinoma of the stomach. *Br J Cancer*. 2012;106(10):1668–74.
 337. Manrique-Rincón AJ, Beraldo CM, Toscaro JM, Bajgelman MC. Exploring synergy in combinations of tumor-derived vaccines that harbor 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF. *Front Immunol*. 2017;8(SEP).
 338. Gupta R, Emens LA. GM-CSF-secreting vaccines for solid tumors: moving forward. *Discov Med*. 2010;10(50):52–60.
 339. Youlin K, Li Z, Xiaodong W, Xiuheng L, Hengchen Z. Combination Immunotherapy with 4-1BBL and CTLA-4 Blockade for the Treatment of Prostate Cancer. 2012;2012.
 340. Ali SA, Ahmad M, Lynam J, Mclean CS, Entwisle C, Loudon P, et al. Anti-tumour therapeutic efficacy of OX40L in murine tumour model. *Vaccine*. 2004;22(27–28):3585–94.
 341. Jiang D, Gao Z, Cai Z, Wang M, He J. Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2015;15(1):727.

Figura 8.2 Fluxo de trabalho para clonagem dos candidatos de sgRNA - CRISPR. (A) Os RNAs guia foram desenhados no início da região traduzida do gene *Foxp3*. (B) Após a seleção dos candidatos, realizou-se uma análise para verificar os alvos e a ausência de *off-targets*, esses vetores foram clonados no vetor LentiCRISPR2 usando a enzima *BsmBI* ((C) Mapa do vetor). (D) As colônias que cresceram foram usadas para fazer uma PCR de colônia usando um primer forward para o promotor U6 e o primer reverso de cada candidato, dessa maneira, apenas os clones positivos amplificam. (E) Os clones positivos foram isolados com miniprep e enviados para sequenciamento.

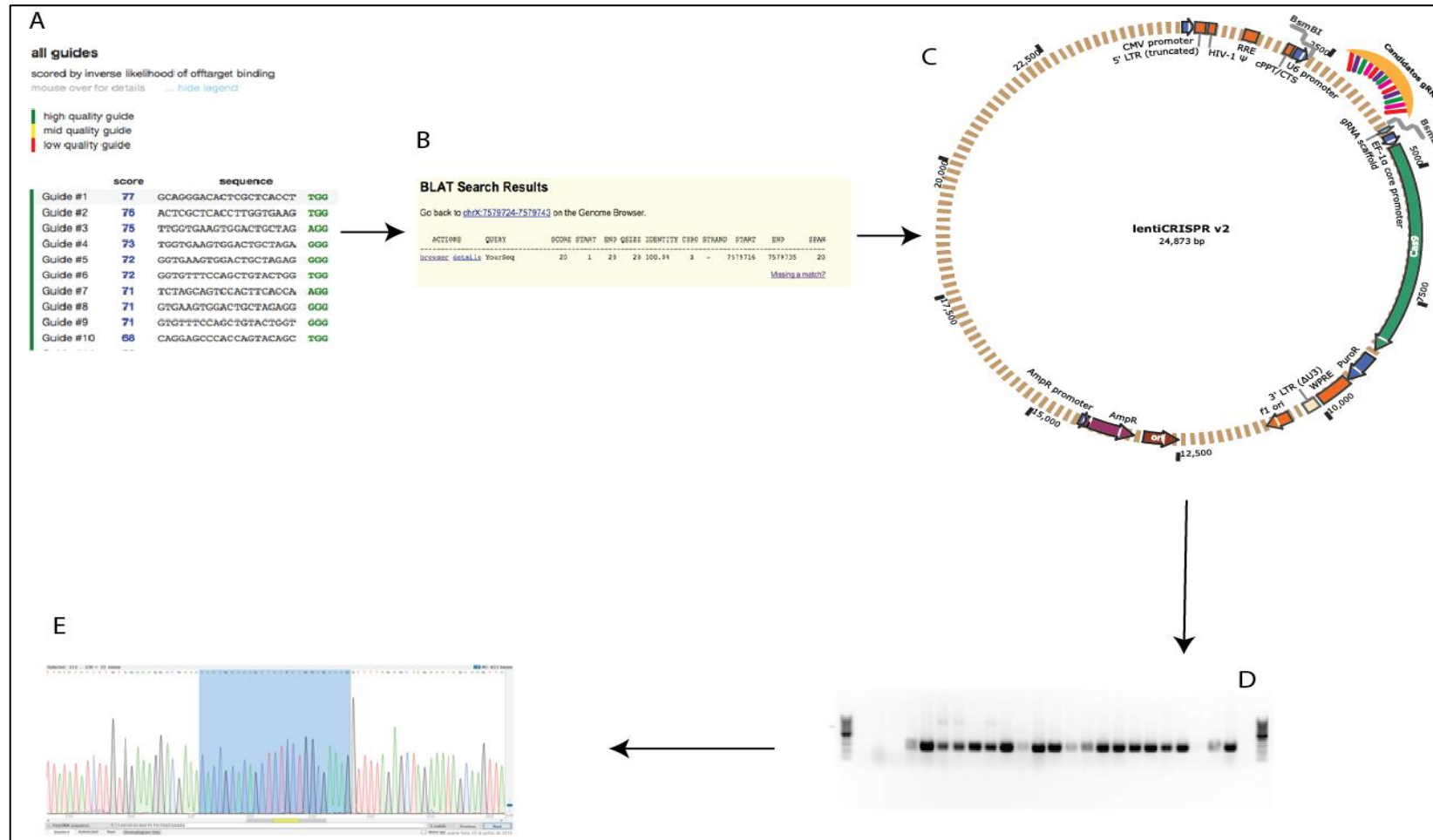


Tabela 8.1 oligos usados neste trabalho

Função do oligo	Sequência Forward	Sequência Reverse
Oligos para análise de metilação TSDR	TTTTGGGTTTTTTGGTATTTAAGA	AACCAACCAACTTCCTACACTATCTAT
Oligos para análise de metilação PROMOTOR	TATATTTTATAGATGATTTGTAAAGGGTAAA	ATCAACCTAACTTATAAAAACTACCACAT
Oligos para real time murine FP3a	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT	TTCTCACAACCAGGCCACTTG
Oligos para real time murine Gapdh	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Oligos para real time murine ACTB	GGCTGTATTCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Oligos para real time human GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT
Oligos para real time human ACTB	GCCGGGACCTGACTGACTAC	TTCTCCTTAATGTCACGCACGAT
Oligos para real time human FP3	CAGCACATTCCAGAGTTCCT	CGTGTGAACCACTGGTAGAT
Oligos candidato TGS P1 clonado no vetor PLKO THY1.1	CCCCCACCAGACACAGCTCTG	CAGAGCTGTGTCTGGTGGGGG
Oligos candidato TGS P2 clonado no vetor PLKO THY1.1	GTCTCTACCTGCCTCGGGATG	CATCCCAGGCAGGTAGAGAC
Oligos candidato TGS P3 clonado no vetor PLKO THY1.1	ACCCAGCGATCCTCCAACGTC	GACGTTGGAGGATCGCTGGT
Oligos candidato TGS P4 clonado no vetor PLKO THY1.1	TCTGCGGCTTCCACGCCGTGG	CCACGGCGTGAAGCCGCAGA
Oligos candidato TGS P5 clonado no vetor PLKO THY1.1	TCCCACAAGCCAGGCTGATCCG	CGGATCAGCCTGGCTTGTGGGA
Oligos candidato TGS P6 clonado no vetor PLKO THY1.1	CTTCTCGGTATAAAGCAAAGCT	AGCTTTGCTTTTATACCGAGAAG
Oligos candidato TGS PS1 clonado no vetor PLKO THY1.1	TGATTTCTTCCCCTCACCACA	TGTGGTGAGGGGAAGAAATCA
Oligos candidato TGS PS2 clonado no vetor PLKO THY1.1	GTTTATTCTTTTCTTATGAGA	TCTCATAAGAAAAGAATAAAC
Oligos candidato TGS PS4 clonado no vetor PLKO THY1.1	AGACCTCGCTCTTCTAATAAT	ATTATTAGAAGACGAGGTCT
Oligos candidato TGS PS5 clonado no vetor PLKO THY1.1	AAACCACAATTTCTTAACAA	TTGTTAAGAAATGTGGTTT
Oligos candidato TGS PS6 clonado no vetor PLKO THY1.1	AAAACAACTTTGCTTTTATAC	GTATAAAAGCAAAGTTGTTTT
Oligos candidato TGS T3 clonado no vetor PLKO THY1.1	GTCACCTACCACATCCGCTAG	CTAGCGGATGTGGTAGGTGAC
Oligos candidato TGS T4 clonado no vetor PLKO THY1.1	CTCCAGGTCCCTAGTACCACT	AGTGGTACTAGGGACCTGGAG
Oligos candidato TGS T5 clonado no vetor PLKO THY1.1	GCCACTTCTCGGAACGAAACC	GGTTTCGTTCCGAGAAGTGGC
Oligos candidato TGS T6 clonado no vetor PLKO THY1.1	CAGATGTAGACCCCGATAGGA	TCCTATCGGGGTCTACATCTG
Oligos candidato TGS T7 clonado no vetor PLKO THY1.1	GTGGATCCATGCACCCTACAG	CTGTAGGGTGCATGGATCCAC
Oligos candidato TGS T8 clonado no vetor PLKO THY1.1	GCCATGACGTCAATGGCAGAA	TTCTGCCATTGACGTCATGGC
Oligos candidato TGS TS1 clonado no vetor PLKO THY1.1	AGAAATCTCCTCCTTAAATAC	GTATTTAAGGAGGAGATTTCT
Oligos candidato TGS TS2 clonado no vetor PLKO THY1.1	GATTCTGTCTTTCTTGGATGC	GATTCTGTCTTTCTTGGATGC
Oligos candidato TGS TS3 clonado no vetor PLKO THY1.1	TGGATCCACCTTCTTACTGTG	CACAGTAAGAAGGTGGATCCA
Oligos candidato TGS TS4 clonado no vetor PLKO THY1.1	AGAATATGTTTCTATCGGG	CCCGATAGGAAAACATATTCT
Oligos candidato TGS TS5 clonado no vetor PLKO THY1.1	ACGATATCATTTCTCAAAGCC	GGCTTTGAGAAATGATATCGT
Oligos candidato TGS TS6 clonado no vetor PLKO THY1.1	TTTGACTGTTTCTTAGAAGC	GCTTCTAAGAAACAGTCAAA
Oligos candidato TGS TS7 clonado no vetor PLKO THY1.1	TTTGAAGTGCTCTTATG	CATAAAGAGCACTTCAAA
Oligos candidato TGS TP1 clonado no vetor PLKO THY1.1	TCCCACAAGCCAGGCTGATCCCCTGACCCA	TGGGTGAGGGGATCAGCCTGGCTTGTGGGA
Oligos candidato TGS TP2 clonado no vetor PLKO THY1.1	GGCAGTTTCCACAAGCCAGG	CCTGGCTTGTGGGAACTGCC
Oligo forward aptamêro 4-1BB (41BB 6g-F (New sel 5p))	GGGGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGCGGGGAGAGGAAGAGGGATGGG	
Oligo reverse aptamêro 4-1BB candidato TS6 3'		GCTTCTAAGAAACAGTCAACGGGAGGGGCGGGATCCAGTACT
Oligo reverse aptamêro 4-1BB candidato Tp12 3'		CCTGGCTTGTGGGAACTGCCGGGAGGGGCGGGATCCAGTACT
Oligo reverse aptamêro 4-1BB candidato PS5 3'		TTGTTAAGAAATGTGGTTTGGGAGGGGCGGGATCCAGTACT
Candidato de sgRNA CRISPRFOXP3 #1 clonado no LentiCrispr 2	GCAGGGACACTCGCTCACCT	AGGTGAGCGAGTGTCCCTGC
Candidato de sgRNA CRISPRFOXP3 #2 clonado no LentiCrispr 2	ACTCGCTCACCTTGGTGAAG	CTTCACCAAGGTGAGCGAGT
Candidato de sgRNA CRISPRFOXP3 #3 clonado no LentiCrispr 2	TTGGTGAAGTGGAAGTGTAG	CTAGCAGTCCACTTACCAA
Candidato de sgRNA CRISPRFOXP3 #4 clonado no LentiCrispr 2	TGTGCTCAAGTGCCTCCAC	GTGGACGCACTTGGAGCACA
Candidato de sgRNA CRISPRFOXP3 #5 clonado no LentiCrispr 2	CTGCTAGAGGGGATCAGCC	GGCTGATCCCCTCTAGCAG
Candidato de sgRNA CRISPRFOXP3 #6 clonado no LentiCrispr 2	CACAGCTCTGCTGGCGAAAG	CTTTCGCCAGCAGAGCTGTG

Tabela 8.2 Exemplo de controles e amostras usadas no experimento de imunossupressão

	Anti-CD3	CD4 CFSE	APCs	iTR mock 1:2	iTR mock 1:8	ITR VIRUS A 1:2	ITR VIRUS B 1:8
Controle 1	-	+	-	-	-	-	-
Controle 2	+	+	-	-	-	-	-
Controle 3	+	-	+	+	-	-	-
Controle 4	+	+	+	-	-	-	-
ITR mock 1:2	+	+	+	+	-		-
ITR mock 1:8	+	+	+	-	+		-
ITR Virus A 1:2	+	+	+	-	-	+	-
ITR Virus A 1:8	+	+	+	-	-	-	+

9. ANEXOS



CEUA/Unicamp

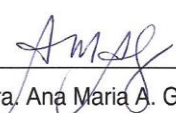
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

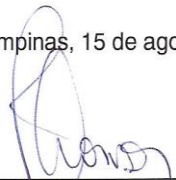
Certificamos que o projeto "Inactivation of Regulatory T Cells by transcriptional gene silencing of FoxP3 to potentiate antitumor immunity" (protocolo nº 3137-1), sob a responsabilidade de Dr. Marcio Chaim Baigelman / Andrea Johana Manrique Rincon, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de agosto de 2013.

Campinas, 15 de agosto de 2013.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: MCB3

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança do CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Título do projeto: Desenvolvimento de uma estratégia de silenciamento transcricional do fator FoxP3 com alvo de inativar células T regulatórias e potencializar resposta imune antitumoral.

Pesquisador responsável: Marcio Chaim Bajgelman

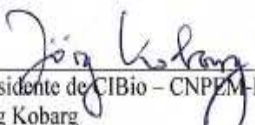
Experimentador: Andrea Johanna Manrique Rincón

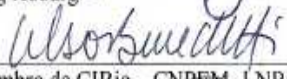
Nível do treinamento do experimentador: ☐ -Iniciação científica, ☐ -mestrado, ☐ -doutorado,
☒ -doutorado direto, ☐ -pós-doutorado, ☐ -nível técnico, ☐ -outro, especifique: _____

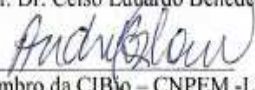
Resumo do projeto: Amostras clínicas isoladas de pacientes revelam que o infiltrado de células T regulatórias (Tregs) no local do tumor se correlaciona com a progressão de câncer. Dados da literatura sugerem que a eliminação de células Treg podem atuar em sinergia com outras terapias anticâncer. Dentre as estratégias mais populares, as células T regulatórias podem ser eliminadas, utilizando anticorpos ou toxinas dirigidas para receptor IL-2 (CD25), no entanto, o mecanismo de depleção de CD25 mediado por este receptor não é específico e faz com que a eliminação outras populações de células CD25 positivas, tais como células T CD4 positivas efetoras as quais poderiam contribuir para a imunidade antitumoral. Tal como CD25, a maior parte dos receptores da superfície celular expressos constitutivamente em Tregs também são expressos nas células T ativadas e não podem ser utilizados especificamente para a inibição T reg. Por outro lado, vários estudos têm demonstrado que o factor de transcrição FoxP3 desempenha um papel importante associado com a manutenção do fenótipo imunossupressor de células T reguladoras e pode ser um bom alvo para sua inativação. Como FoxP3 é inacessível ao anticorpo, planejamos desenvolver uma nova estratégia dirigida a células Treg, com base na veiculação de moléculas de RNAi, altamente específicas e eficientes para obter o silenciamento transcricional (TGS) do gene FOXP3. Desenvolveremos vetores virais recombinantes para veicular o TGS-RNAi para células-alvo, que apresentarão alta especificidade no nível de controle transcricional e de tropismo para a célula alvo. Estes vetores serão utilizados como uma prova de conceito de que pode-se utilizar o TGS-RNAi para inativar fenótipo supressor de Treg. Além disso, também desenvolveremos uma nova estratégia para inibir a expressão FoxP3, usando conjugados de aptâmeros quiméricos e siRNA, para entregar o TGS-RNAi para células alvo. Como aptâmeros são baixamente imunogênicos, esta ferramenta pode ser utilizada para entregar TGS-RNAi in vivo, com alvo de inibir a FoxP3 e inativar o fenótipo supressor de Treg, potencializando-se a resposta imune contra as células tumorais. O sucesso dessas estratégias podem permitir o desenvolvimento de novas abordagens para a imunoterapia do câncer.

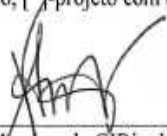
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 9.1.2014.

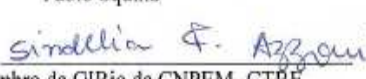
Parecer final: ☒ -projeto aprovado, ☐ -projeto recusado, ☐ -projeto com deficiências, favor comentários anexo.

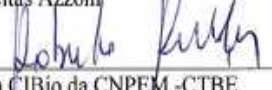

 Presidente de CIBio – CNPEM-LNBio
 Jörg Kobarg


 Membro da CIBio – CNPEM-LNBio
 Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio – CNPEM-LNBio
 Andrea Balan


 Membro da CIBio da CNPEM-CTBE
 Fabio Squina


 Membro da CIBio da CNPEM-CTBE
 Sindelia Freitas Azzoni


 Membro da CIBio da CNPEM-CTBE
 Roberto Ruller