



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JESSICA MARCELINO TOSCARO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DE VACINAS
ANTITUMORAIS DERIVADAS DE CÉLULAS PRIMÁRIAS DE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO NEGATIVO

IN VITRO EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF
ANTITUMOR VACCINES DERIVED FROM PRIMARY TRIPLE NEGATIVE BREAST
CANCER CELLS

CAMPINAS

2022

JESSICA MARCELINO TOSCARO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DE VACINAS
ANTITUMORAIS DERIVADAS DE CÉLULAS PRIMÁRIAS DE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO NEGATIVO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em Ciências
na área de Clínica Médica

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCIO CHAIM BAJGELMAN

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA JESSICA MARCELINO TOSCARO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCIO CHAIM BAJGELMAN.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

T639a Toscaro, Jessica Marcelino, 1992-
Avaliação *in vitro* do potencial imunomodulatório de vacinas antitumorais derivadas de células primárias de câncer de mama triplo negativo. / Jessica Marcelino Toscaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

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

1. Vacinas antitumorais. 2. Imunoterapia. 3. Ligante 4-1BB. 4. Ligante OX40. 5. Câncer. I. Bajgelman, Marcio Chaim, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *In vitro* evaluation of the immunomodulatory potential of antitumor vaccines derived from primary triple negative breast cancer cells

Palavras-chave em inglês:

Cancer vaccines

Immunotherapy

4-1BB Ligand

OX40 Ligand

Cancer

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Marcio Chaim Bajgelman [Orientador]

Jorg Kobarg

Joilson de Oliveira Martins

Data de defesa: 14-06-2022

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4918-2194>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2153318757104861>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO

JESSICA MARCELINO TOSCARO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO CHAIM BAJGELMAN

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. Marcio Chaim Bajgelman

2. PROF. DR. Jörg Kobarg

3. PROF. DR. Joilson de Oliveira Martins

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 encontra-se no
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 14/06/2022

Às mulheres que confiaram em nosso trabalho e compartilharam um pedaço
de si em colaboração com a ciência brasileira.

AGRADECIMENTOS

A jornada em busca de respostas nunca é fácil mas se torna mais leve com boas pessoas ao nosso redor e por isso, agradeço ao meu orientador, Marcio Bajgelman e a todos os colegas do grupo do Laboratório de Vetores Virais e de trabalho; Isadora Semionatto, Soledad Palameta, Rhubia Rosa, Luís Peroni, Carolinne Fogagnolo, Camila Canateli, Juliana Branco, Daniele Mascarelli e Andrea Ríncon, por todo auxílio, contribuições e paciência. Em especial, agradeço imensamente ao Gabriel Lima e Luciana Ruas pela doação e disposição constante em ajudar intelectualmente e também no auxílio com experimentos do presente projeto.

À Ana Carolina Mafra por compartilhar todo seu respeito e conhecimento no manuseio dos animais, à Ana Iacia pelo auxílio com a interpretação de dados e à Marílias Dias, Jéssica Faria e Kaliandra pelo suporte na utilização de equipamentos fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe do CAISM pela colaboração e participação no presente projeto; Professora Dra. Sophie Derchain, Dra. Susana Ramalho, Dra. Geisilene Silva, Ana Elisa, Fernanda e ao Dr. Leonardo da Silva.

Ao CNPEM e laboratórios (organismos modelo - LOM e de bioensaios - LBE) e UNICAMP por disporem de suas instalações e equipamentos e à banca por ter aceitado o convite para discutir sobre este projeto.

Agradeço também a toda minha família, em especial aos meus pais, Alexandra e José e as minhas irmãs Angélica e Luciana, por tornarem essa caminhada possível; sempre me incentivando e propiciando os meios até aqui.

Ao meu marido, Wagner, que foi minha maior fonte de apoio e inspiração, que foi compreensivo por todas as minhas longas horas de ausência e que sempre me amparou psicologicamente e me motivou.

À todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é,
senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Os avanços na área da imunoterapia do câncer têm revolucionado a clínica médica. As abordagens que exploram os mecanismos de imunossupressão que previnem a imunidade antitumoral empregam diversas ferramentas como por exemplo, anticorpos, vacinas, citocinas ou células engenheiradas, que podem estimular o sistema imune a eliminar as células tumorais. O câncer de mama é uma relevante questão de saúde pública, consistindo-se na maior causa de morte em mulheres. O câncer de mama triplo negativo é o que possui pior prognóstico e devido as características fenotípicas destes tumores, atualmente não existe um tratamento eficiente à maioria das pacientes diagnosticadas, justificando-se a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas. Neste projeto, desenvolvemos vacinas antitumorais derivadas de células tumorais geneticamente modificadas que apresentam os ligantes imunomodulatórios TNFSF 4-1BBL, OX-40L e a citocina GM-CSF. Os ligantes TNFSF têm capacidade de coestimular as células T, elevando sua ativação e proliferação, enquanto a citocina GM-CSF tem relevante atuação na atividade de células dendríticas. Dados prévios de nosso grupo, demonstram que algumas combinações de vacinas antitumorais podem promover um aumento na proliferação de células T, produção de interferon gama, inibição de células T regulatórias e potencialização da citotoxicidade antitumoral mediada por células T. Dessa forma, estabelecemos linhagens tumorais a partir de células primárias humanas provenientes de amostra clínica de uma paciente com TNBC após quimioterapia neoadjuvante, que foi fornecida pelo biobanco do CAISM – UNICAMP. Esta linhagem foi geneticamente modificada para a geração de vacinas antitumorais expressando os ligantes de OX-40 e de 4-1BB e nós realizamos ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antitumoral. foi possível constatar que as vacinas impulsionam a resposta imune de linfócitos T de voluntários sadios e de pacientes com TNBC, elevando a produção de IL-2, IFN- γ e a atividade antitumoral. Os ensaios experimentais mostraram que as vacinas derivadas de tumor induziram uma produção aumentada de citocinas imunomoduladoras e melhora na atividade antitumoral.

Palavras-chave:

Vacinas antitumorais; Imunoterapia; Ligante 4-1BB; Ligante OX40; GM-CSF; câncer.

ABSTRACT

Advances in the field of cancer immunotherapy have been revolutionizing clinical medicine. The approaches to explore inhibition of immunosuppressive mechanisms that prevent antitumor immunity employ several tools like antibodies, vaccines, cytokines or engineered cells, that may stimulate the immune system to eliminate cancer cells. Breast cancer is a relevant public health issue, consisting of the leading cause of death in women. The triple negative breast cancer (TNBC) has the worst prognosis and due to these tumors phenotypic characteristics, there is no currently efficient treatment to the majority of diagnosed patients, justifying the need to investigate new therapeutic strategies. In this project, we developed antitumor vaccines, derived from genetically modified tumor cells, that harbor immunomodulatory ligands TNFSF 4-1BBL, OX-40L and the cytokine GM-CSF. The TNFSF ligands have the ability to costimulate T cells, enhancing its activation and proliferation, while the cytokine GM-CSF has a relevant role boosting the activity of dendritic cells. Previous data from our research group demonstrate that combinations of antitumor vaccines can promote an increase in the proliferation of T cells, production of interferon gamma, inhibition of regulatory T cells and potentiation of antitumor cytotoxicity mediated by T cells. Therefore we have established tumoral lineages from human primary cells, isolated from a clinical sample of a TNBC patient, previously submitted to neoadjuvant chemotherapy, that was collected by the biobank of CAISM – UNICAMP. These primary cells were genetically modified for the generation of antitumor vaccines expressing OX-40 and 4-1BB ligands, and we performed in vitro assays to evaluate antitumor activity. The experimental assays have shown that tumor-derived vaccines induced an increased production of immunomodulatory cytokines and enhanced antitumor activity.

Key words:

Antitumor vaccines; Immunotherapy; 4-1BB Ligand; OX40 Ligand; GM-CSF; Cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características adquiridas por células cancerosas.	20
Figura 2 - O ciclo imunológico do câncer..	22
Figura 3 - Os três “Es” da imunoeedição.....	23
Figura 4 - Sinais para ativação de célula T..	25
Figura 5 - Interação entre imunomoduladores.....	26
Figura 6 - Interação entre OX-40/OX-40L..	29
Figura 7 - Avanço dos estudos de imunoterapia no câncer de mama triplo negativo (TNBC).....	32
Figura 8 - Regulação transcricional pelo gene supressor de tumor do retinoblastoma (Rb).	36
Figura 9 - Fluxo de trabalho para o desenvolvimento do projeto.....	42
Figura 10 - Clonagem dos imunomoduladores em vetor lentiviral.....	45
Figura 11 – Clonagem do vetor FUW mCherry (FUMW).....	46
Figura 12 – Esquema representativo de placa para titulação viral.	48
Figura 13 – Fluxo de trabalho e desenho experimental do ensaio de citotoxicidade..	51
Figura 14 - Amplificação das moléculas imunomodulatórias.....	53
Figura 15 - Etapas de clonagem dos imunomoduladores..	54
Figura 16 - Vetor lentiviral FUW linearizado e purificado..	55
Figura 17 - Clonagem do vetor lentiviral FUMW.....	56
Figura 18 - Histograma de HEK293T transfectada com vetores lentivirais	57
Figura 19 - Transdução de células MDA-MB-231, HT1080 e PC-3 com vetores lentivirais.	59
Figura 20 - Estabelecimento de linhagens a partir de célula primária da paciente #1.	60
Figura 21 - Ensaio de Ccoestimulação de PBMC pré- ativado de voluntário saudável mediada por célula tumoral modificada para expressão de OX-40L e/ou 4-1BBL.. ..	61
Figura 22 - Imunomoduladores OX-40L e 4-1BBL potencializam resposta antitumoral em pacientes com câncer de mama triplo negativo.	62
Figura 23 - Atividade antitumoral versus perfil de citocinas inflamatórias IL-2 e IFN-γ..	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa de novos casos de câncer no Brasil..	18
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - A expressão dos imunomoduladores pelas células e a atividade resultante de suas respectivas interações.	31
Quadro 2 - Abordagens terapêuticas utilizadas/estudadas para tratamento do câncer de mama triplo negativo.	37
Quadro 3 - Ensaio clínico utilizando imunoterapia como monoterapia ou associada a quimioterapia para casos de câncer de mama triplo negativo.....	39
Quadro 4 - Estratégia de amplificação dos imunomoduladores	43
Quadro 5 - Seis pacientes com câncer de mama triplo negativo após quimioterapia neoadjuvante entraram no estudo.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs: Células apresentadoras de antígeno

CAISM: Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher

CDK 4/6: Cinases dependentes de ciclina 4 e 6

cDNA: DNA complementar

CEP: Comitê de ética em pesquisa

CIP: Fosfatase Alcalina Intestinal de Bezerro

CM: Meio completo

CNPEM: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

CSFs: Fator estimulador de colônias

D10: DMEM 10% soro fetal bovino

DAMPs: Padrões moleculares associados a danos

DCs: Células dendríticas

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

ELISA: Ensaio imunoenzimático indireto

ER +: Receptor de estrogênio

FBS: Soro Fetal Bovino

FDA: *Food and Drug Administration*

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

HER2 +: Fator de crescimento epidérmico humano 2

ICD: Morte celular imunogênica (*immunogenic cell death*)

IFN- γ : Interferon gama IFN- γ

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-2: Interleucina 2

INCA: Instituto Nacional de Câncer

LNBio: Laboratório Nacional de Biociências

LVV: Laboratório de Vetores Virais

MHC I/II: Complexo maior de histocompatibilidade de classe I ou II

MMP: Metaloproteinases de matriz

MOI: Multiplicidade de infecção

NF-kB: Fator nuclear kappa B

NK: Células natural killer

OS: Sobrevida global mediana

PAP: Fosfatase ácida prostática

PARP: Polimerase poli (ADP-ribose)

PBMC: Célula mononuclear de sangue periférico

PBS: Tampão Fosfato Salino

PD-1: Proteína de Morte Programada 1

PR+: Receptor de progesterona

PRR: Receptor de reconhecimento padrão

RB1: gene do retinoblastoma

RNA: Ácido ribonucleico

RPMI 1640: *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR: Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

T Reg: Células T reguladoras

TAA: Antígenos associados ao tumor

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR: Receptor das células T

TGF- β : Fator de crescimento transformante beta

TILs: Linfócitos T infiltrantes

TME: Microambiente tumoral

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNFRs: Família do fator de necrose tumoral

TNFRSF: Superfamília de receptores do fator de necrose tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral

TRAF: Fator associado ao TNFR

TSA: Antígenos tumorais específicos

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Origens da tumorigênese	18
1.2 Crescimento descontrolado e outras nove características que definem as células tumorais	19
1.3 A trajetória imunológica do câncer	20
1.4 O papel do sistema imune na evolução do câncer.....	22
1.5 A coestimulação das células T no reconhecimento e eliminação das células tumorais	24
1.5.1 A imunomodulação mediada por 4-1BBL e OX-40L pode favorecer a atividade antitumoral	27
1.5.2 A ambiguidade de GM-CSF na evolução do câncer.....	29
1.6 Receptores hormonais subdividem o câncer de mama	31
1.7 Terapias em câncer de mama triplo negativo.....	32
1.7.1 Agentes quimioterápicos induzem morte celular e podem potencializar a imunogenicidade tumoral.....	33
1.7.2 Terapia alvo-específica: Mutações em genes BRCA tornam células tumorais mais susceptíveis a terapias com inibidores de PARP	34
1.7.3 Terapia de TNBC com inibidores de CDKs	35
1.7.4 Terapia para TNBC com anticorpos monoclonais	37
1.7.5 Proposta de Abordagens inovadoras baseadas em Vacinas Antitumorais para terapia de TNBC.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivos Gerais	41
2.2 Objetivos Específicos.....	41
3. METODOLOGIA	42
3.1 Coleta de sangue, isolamento e ativação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	42
3.2 Extração de RNA, cDNA e RT-PCR	43
3.3 Clonagem dos genes humanos OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF em vetores plasmidiais	44
3.4 Construção de vetores lentivirais (OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF) e titulação.....	47
3.5 Estabelecimento de células primárias isoladas de tumores de pacientes.....	48
3.6 Transdução dos vetores virais para estabelecimento de células imunomodulatórias	49
3.7 Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade tumoral e o perfil das citocinas inflamatórias IL-2 e IFN- γ por ELISA.....	50
4. RESULTADOS	52
4.1 Clonagem dos genes de imunomoduladores a partir de PBMC estimulado com anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 por 72 horas.....	52

4.2 Construção de vetores virais e titulação	53
4.3 Transdução dos vetores virais para estabelecimento de linhagens imunomodulatórias.....	57
4.4.1 Vacinas imunomodulatórias induzem resposta antitumoral mediada por linfócitos de indivíduos saudáveis	60
4.4.2 Vacinas imunomodulatórias induzem resposta antitumoral mediada por linfócitos de indivíduos com TNBC.....	62
4.4.3 Estudo da produção de citocinas nos ensaios imunomodulatórios com PBMC de indivíduos sadios e de pacientes com TNBC.....	63
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERÊNCIAS	69
8. APÊNDICES	80
9. ANEXOS.....	84

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial que pode ocorrer em diferentes estruturas do corpo humano e que acomete milhões de pessoas ao redor do mundo. O primeiro indício de registro dessa patologia data de aproximadamente 3000 anos a.C no Egito pelo chamado papiro de Edwin Smith, que a descreveu como uma doença grave e sem tratamento que causava protuberâncias na mama (1, 2).

No ano de 2018 houve cerca de 17 milhões de novos casos de câncer no mundo, excluindo o câncer de pele não melanoma destes, 2.1 milhões corresponderam ao câncer de pulmão e de mama, seguido por 1.8 milhão de casos para cólon e reto e 1.3 milhão para próstata. As mulheres representaram 47% dos novos casos e o câncer de mama caracterizou 24.2% destes (3).

Para cada ano do triênio 2020-2022, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) prevê 450 mil novos casos no Brasil (desconsiderando câncer de pele não melanoma), visto que o câncer de mama e de próstata são os de maior incidência com aproximadamente 66 mil casos cada. Para o câncer de mama, o risco estimado é de 61,61 casos para cada 100 mil mulheres (Tabela 1).

Tabela 1 - **Estimativa de novos casos de câncer no Brasil.** Estimativa realizada pelo INCA sobre incidência de novos casos de câncer no Brasil para cada ano do triênio 2020-2022 por 100 mil habitantes de acordo com o gênero.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	65.840	62,95	50,78	13.640	60,53	57,33	-	-	-	-	-	-
Mama feminina	-	-	-	-	-	-	66.280	61,61	43,74	19.820	78,88	45,90
Colo do útero	-	-	-	-	-	-	16.590	15,43	12,60	4.180	16,55	10,13
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	16,99	16,19	3.180	14,17	16,11	12.440	11,56	9,24	3.760	14,96	11,32
Cólon e reto	20.520	19,63	18,80	5.320	23,59	21,26	20.470	19,03	13,36	6.260	24,90	15,59
Estômago	13.360	12,81	11,37	2.430	10,85	11,23	7.870	7,34	5,95	1.920	7,71	6,61
Cavidade oral	11.180	10,69	9,25	2.040	9,03	9,19	4.010	3,71	2,66	1.040	4,00	3,21
Laringe	6.470	6,20	5,75	1.150	5,00	4,97	1.180	1,06	0,92	360	1,06	0,79
Bexiga	7.590	7,23	4,61	1.800	7,87	7,12	3.050	2,80	2,03	900	3,44	2,61
Esôfago	8.690	8,32	6,48	1.160	5,00	6,27	2.700	2,49	1,76	460	1,60	1,42
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.650	6,18	4,84	1.870	7,50	5,19
Linfoma de Hodgkin	1.590	1,52	1,33	450	1,71	1,93	1.050	0,95	0,88	430	1,35	1,04
Linfoma não Hodgkin	6.580	6,31	5,67	1.430	6,41	7,27	5.450	5,07	3,37	1.260	4,96	4,27
Glândula tireoide	1.830	1,72	1,52	1.090	4,52	1,81	11.950	11,15	8,13	4.650	18,47	8,13
Sistema nervoso central	5.870	5,61	5,22	1.150	5,07	6,27	5.220	4,85	4,17	1.440	5,69	4,55
Leucemias	5.920	5,67	5,55	1.210	5,43	5,93	4.890	4,56	3,95	1.180	4,69	4,64
Corpo do útero	-	-	-	-	-	-	6.540	6,07	5,22	1.930	7,61	6,14
Pele melanoma	4.200	4,03	2,01	790	3,36	3,40	4.250	3,94	1,78	870	3,28	2,49
Outras localizações	48.060	45,97	41,48	9.320	41,34	48,09	42.390	39,43	29,40	9.790	38,88	26,48
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	225.460	215,65	215,86	46.160	204,92	238,47	222.980	207,36	145,00	62.120	247,24	159,85
Pele não melanoma	83.770	80,12	-	20.010	88,84	-	93.160	86,65	-	19.090	75,98	-
Todas as neoplasias malignas	309.230	295,78	-	66.170	293,75	-	316.140	294,00	-	81.210	323,22	-
Todas as neoplasias malignas, corrigidas para sub-registro	387.980	371,11	-	-	-	-	297.980	277,11	-	-	-	-

*População padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2019.

1.1 Origens da tumorigênese

Células saudáveis possuem padrões de divisão que permitem a manutenção e homeostase da vida. O câncer engloba mais de 100 patologias complexas e de causas multifatoriais com comportamento que pode variar de acordo com seu local de origem, estágio e prognóstico (4, 5) mas todas são caracterizadas por desajustes que desencadeiam a replicação anormal das células e, se houver um microambiente favorável, elas podem se disseminar pelo corpo (6).

A tumorigênese envolve a exposição gradual e constante de eventos que danificam geneticamente a célula no decorrer do tempo. Uma diversificada gama de fatores podem desencadear alterações na expressão gênica e, ao longo de anos, vir a formar um tumor. Os hábitos de vida, como controle do peso corporal, alimentação,

ingestão de álcool e drogas, sedentarismo bem como a exposição a raios ultravioleta, agentes infecciosos, substâncias químicas (7, 8) e a predisposição genética (9), podem favorecer a superexpressão de determinados genes que desencadeiam um perfil proliferativo e de sobrevivência anormais, resultando na replicação descontrolada da célula (10).

1.2 Crescimento descontrolado e outras nove características que definem as células tumorais

Os tumores são formados por diferentes tipos celulares que apresentam uma complexa interação para favorecer o crescimento. Mais do que uma massa de células danificadas, o tumor é um sistema complexo que interage e modula todo o microambiente ao seu redor para garantir a proliferação (11).

Em 2011, Hanahan e Weinberg elencaram dez características para definir as células tumorais (Figura 1), eles observaram que essas células; 1. possuem autossuficiência em sinais de crescimento, 2. insensibilidade a sinais anti crescimento, 3. evasão da apoptose, 4. potencial replicativo ilimitado, 5. angiogênese sustentada, 6. potencial de invadir e metastatizar tecidos (5), 7. Instabilidade e mutação do genoma, podendo apresentar diversos antígenos exclusivos (antígenos tumorais específicos - TSA) ou antígenos que podem ser encontrados em células normais (antígenos associados ao tumor - TAA) (12-14), como o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (15), 8. inflamação promotora do tumor, 9. reprogramação do metabolismo energético para crescimento ilimitado e 10. imunoevasão (escape da resposta imune) (16).



Figura 1 - **Características adquiridas por células cancerosas.** Aspectos celulares associados a um perfil proliferativo e patológico incluem sinais de crescimento, insensibilidade a fatores anti-crescimento, evasão da apoptose, replicação ilimitada, angiogênese e invasão, metástase de tecidos, reprogramação do metabolismo energético, evasão da resposta imune, instabilidade genômica e inflamação promotora do tumor. Fonte: Retirado e adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011 (16).

1.3 A trajetória imunológica do câncer

A multiplicação das células cancerosas ocorre de maneira gradual até que o crescimento se torna excessivo e danifica o tecido circundante, resultando na inicialização de diversos sinais inflamatórios e migração de células apresentadoras de antígenos e linfócitos aos locais afetados (17).

Chen e Mellman (2013) propuseram um modelo de ciclo imuno-tumoral, onde descreveram os eventos para progressão tumoral e mecanismos associados com a resposta imune antitumoral.

O ciclo imunológico do câncer se “inicia” com a liberação de neoantígenos pelos oncogenes das células tumorais (Figura 2, etapa 1). As células apresentadoras de antígeno (APCs) como as células dendríticas (DCs) migram ao local afetado e, através de receptores de superfície, como o receptor de reconhecimento padrão (PRR), reconhecem os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) liberados pelas células tumorais mutadas ou lesionadas. Após a captura dos antígenos, eles são processados em peptídeos, os quais são apresentados por meio do complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC I) ou II (MHC II) (etapa 2) (18, 19).

Ativadas, estas APCs migram aos órgãos linfóides para apresentar o antígeno ao receptor das células T (TCR) *naïve*; células que nunca entraram em contato com um antígeno (etapa 3) e, uma vez que essa interação ocorre, algumas destas células T *naïve* são ativadas (abordaremos este assunto mais profundamente noutro tópico) e diferenciam-se em células T efectoras, saindo do sistema linfático em direção aos vasos sanguíneos (etapa 4) (20). O sítio tumoral pode produzir diversas quimiocinas inflamatórias, como CCL3, CCL5, CCL10 e CXCL20, que recrutam os linfócitos T citotóxicos (CTLs ou células efectoras para o sítio tumoral (etapa 5) (21).

Ao infiltrarem no microambiente tumoral, as células T efectoras reconhecem os antígenos específicos do tumor (etapa 6) e eliminam a célula tumoral através da liberação de citocinas como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) e também de enzimas citotóxicas como perforina e granzima B, (etapa 7) (22, 23). As células tumorais danificadas, irão por sua vez, liberar novos antígenos e reiniciar o ciclo. Dessa forma, o tumor somente poderá se desenvolver caso este microambiente seja capaz de inibir os mecanismos da imunidade antitumoral e desencadear respostas pró tumorais como por exemplo, através do recrutamento de células T reguladoras (Treg) que podem antagonizar a atividade antitumoral mediada por linfócitos efetores (24).

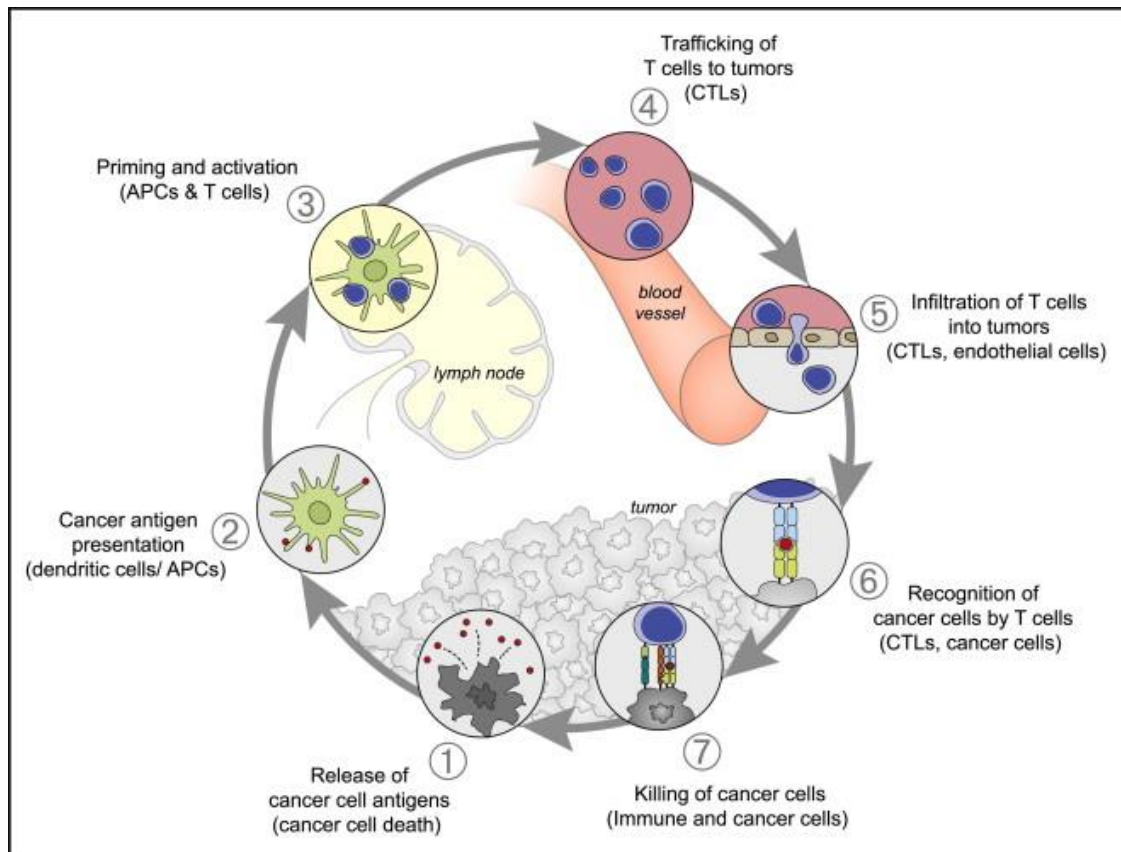


Figura 2 - **O ciclo imunológico do câncer.** O ciclo é representado por 7 etapas que tem início com a liberação de neoantígenos das células tumorais, que podem ser neoantígenos mutados ou provenientes de genes superexpressos (etapa 1). No passo seguinte, as células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas, processam esses antígenos e passam a expressá-los através do complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC I) ou II (MHC II) e migram aos órgãos linfóides, onde apresentam os antígenos tumorais às células T (etapa 3). Após apresentação antigênica e estimulação via células apresentadoras de antígeno, as células T citotóxicas tornam-se ativadas e caem na corrente sanguínea (etapa 4) e são atraídas ao sítio tumoral devido a liberação de quimiocinas inflamatórias produzidas pelo tumor (etapa 5). No sítio tumoral, as células T reconhecem as células cancerosas (etapa 6) e desencadeiam uma resposta antitumoral que resulta em morte da célula maligna (etapa 7). Fonte: Retirado de CHEN; MELLMAN, 2013 (24).

1.4 O papel do sistema imune na evolução do câncer

No início do século XIX, Paul Erlich hipotetizou sobre a habilidade do sistema imunológico em detectar e eliminar células malignas antes de tornarem-se tumores, que mais tarde foi nomeado de vigilância imunológica. Após mais um século de estudos que nos possibilitou compreender melhor como o sistema imunológico e o câncer se relacionam, Dunn e colaboradores nos introduziram o termo de “imunoedição do câncer” (25).

O conceito de imunoeedição é composto por três processos; eliminação, equilíbrio e escape (Figura 3). O processo de eliminação corresponde a resposta do sistema imune frente aos antígenos liberados pelas células tumorais como descrito no ciclo abaixo (Figura 3, A). Se a imunovigilância for capaz de combater as células neoplásicas, esta etapa marcará o início e o fim da imunoeedição sem as etapas subsequentes.

O seguinte processo, denominado equilíbrio (Figura 3, B) marca a edição do câncer pelas células imunológicas, na qual o microambiente apresenta paridade entre um perfil imunossupressor e antitumoral (17). Neste ponto da tumorigênese, as células T tornam-se imunologicamente tolerantes às células neoplásicas devido a uma série de artifícios adotados pelas células cancerosas a fim de evadir o sistema imune, entre eles; as células cancerosas são capazes de diminuir a expressão de seus antígenos tumorais e moléculas de MHC e também podem desencadear a expressão de fatores imunossupressores, como fator de crescimento transformante beta ($TGF-\beta$) e interleucina 10 (IL-10), levando ao aumento da imunossupressão do tumor no estroma tumoral por meio do recrutamento de células T regulatórias (Tregs) e células supressoras de origem mielóide (26-28).

A pressão darwiniana exercida na fase de equilíbrio, atua de forma a selecionar as células transformantes mais resistentes, que são capazes de evadir e proliferar sobre um sistema imune exausto, caracterizando o processo de escape (Figura 3, C) (29).

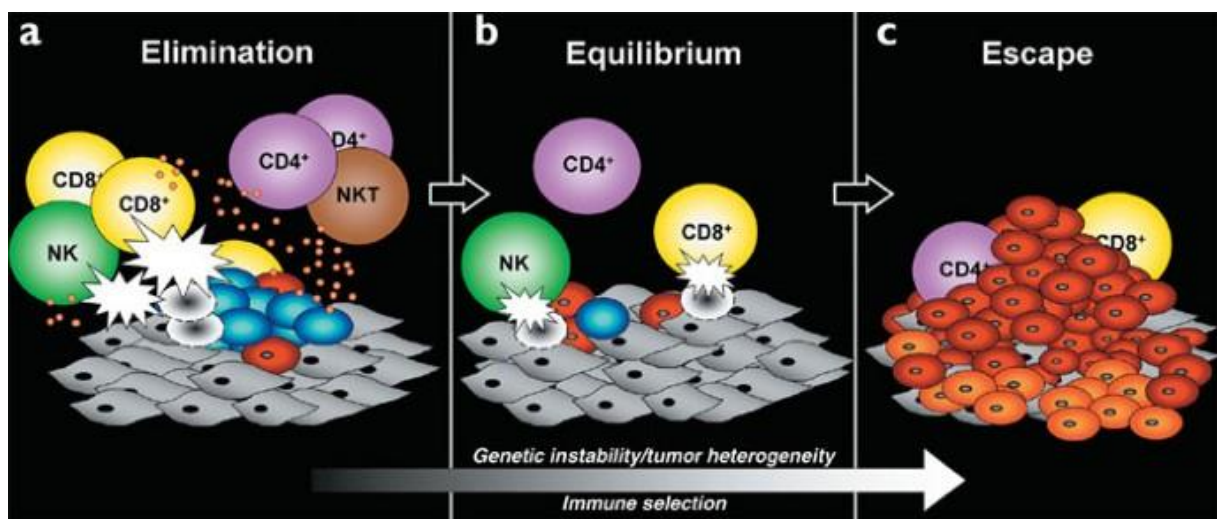


Figura 3 - Os três “Es” da imunoeedição. A fase de eliminação corresponde ao ataque das células imune às células malignas. Células transformantes resistentes entram num equilíbrio dinâmico e sofrem diversas mutações afim de tornarem-se menos imunogênicas e driblar os

mecanismos de morte celular impostos por células imunes. A fase final de escape é quando as células resistentes conseguem evadir o sistema imunológico e são capazes de proliferar. Fonte: Retirado de DUNN *et al.*, 2002 (29).

1.5 A coestimulação das células T no reconhecimento e eliminação das células tumorais

Apenas a proliferação celular tumoral pode não ser suficiente para o desenvolvimento do câncer, o qual é favorecido e sustentado por um microambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento e potenciais agentes danificadores ao DNA. Quando um tecido é danificado, diversos sinais inflamatórios são iniciados e as células de defesa do organismo migram aos locais afetados (17). Dentre as células de defesa, os linfócitos T apresentam um relevante papel na imunidade antitumoral, podendo mediar citotoxicidade (30).

Para desencadear uma resposta imunológica mediada por células T, é preciso que ocorram dois sinais de ativação (Figura 4). Esta sinalização ocorre no órgão linfóide, causando a ativação da célula T, produção de citocinas inflamatórias e proliferação celular (31, 32).

A interação do TCR (receptor da célula T) com uma molécula de MHC contendo o antígeno numa célula apresentadora, desencadeia a primeira sinalização. As células dendríticas desempenham um papel fundamental na ativação linfocitária por representarem as principais células apresentadoras de antígeno (APCs). As APCs também necessitam de ativação e o GM-CSF é uma citocina importante para sua maturação, ativação e direcionamento ao microambiente tumoral (TME) (33-36).

Quando se tornam ativadas, as células dendríticas expressam moléculas coestimulatórias, como o B7-1 e B7-2, que ao interagir com o receptor CD28 nas células T, fornecem o segundo sinal de ativação independente de antígeno aos linfócitos T (37, 38).

Além dos dois sinais, outros receptores de superfície das células T desempenham sinalizações co-estimulatórias, como aqueles da família do fator de necrose tumoral (TNFRs); CD27, OX40 (CD134 ou TNFRSF4) e 4-1BB (CD137) que potencializam a ativação e proliferação das células T (39). As citocinas também são importantes agentes contra o tumor e além do GM-CSF já mencionado, destacam-se a IL-2, que atua na ativação, diferenciação e proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺

e IL-12 que tem papel importante na diferenciação de células T CD4 Th1 e fortalecimento da função dos linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTL). (40-44).

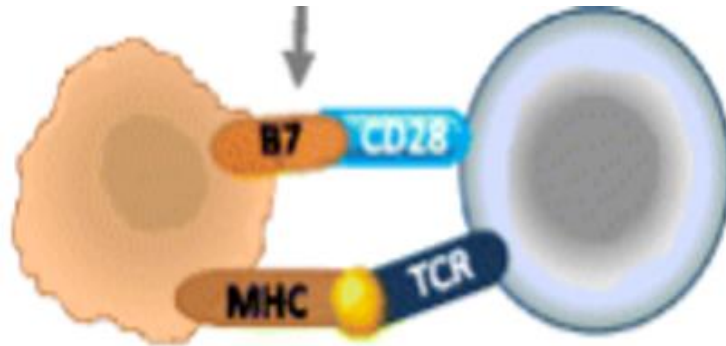


Figura 4 - **Sinais para ativação de célula T.** Células apresentadoras de antígeno (representadas em laranja) processam os antígenos tumorais e apresentam via moléculas MHC aos receptores das células T (TCR). Outra sinalização proveniente da ligação entre B7 da APC com CD28 da célula T fornece o segundo estímulo desencadeador à ativação das células T (representada em cinza). Fonte: Retirado e adaptado de FARKONA *et al.*, 2016 (33).

Os linfócitos apresentam uma gama de receptores de superfície que podem transduzir sinalizações coestimulatórias, ou mesmo sinalizações imunossupressoras. Os receptores coestimulatórios e co-inibitórios atuam na regulação do estado de equilíbrio entre imunotolerância e imunovigilância (Figura 5) (45). As sinalizações mediadas por receptores coinibitórios, como CTLA-4 e PD-1 estão associadas a indução de mecanismos de imunossupressão, favorecendo a imunotolerância. Receptores coestimulatórios como 4-1BB e OX-40 estão associados à ativação de células T e favorecem a imunovigilância (41, 46-49). Num organismo saudável, o sistema imunológico encontra-se em homeostase entre os sinais estimulatórios e inibitórios.

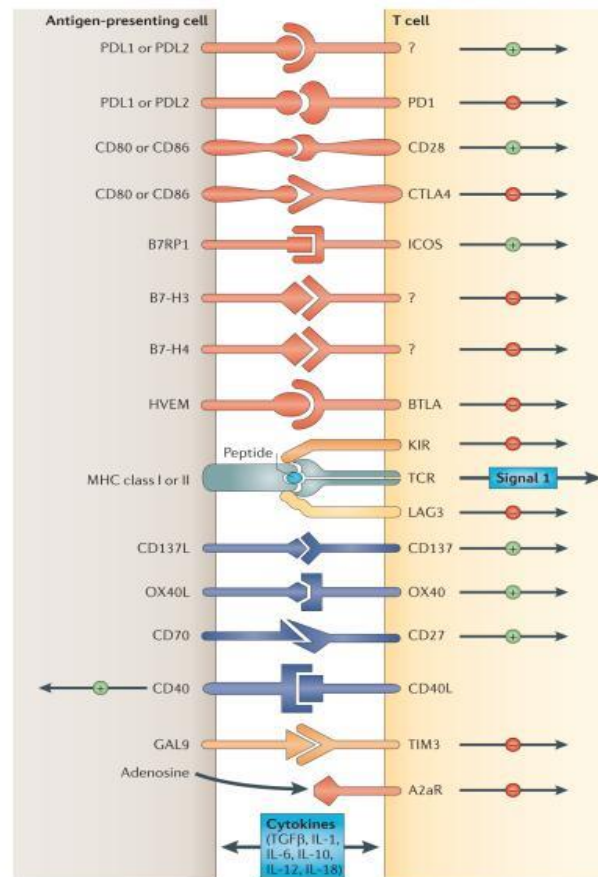


Figura 5 - **Interação entre imunomoduladores**. Esquema representativo de moléculas coestimulatórias (desencadeiam resposta imunológica – representados por sinal verde positivo) e coinibitórias (suprimem a ativação de células T – representados por sinal vermelho negativo) entre células apresentadoras de antígeno e células T. Fonte: Retirado de PARDOLL, 2012 (40).

As células cancerosas aproveitam-se desse sistema de redundância para evadir e proliferar (50). Conforme crescem, os tumores necessitam de mais fornecimento sanguíneo e causam pequenas lesões aos tecidos circundantes, desencadeando sinais inflamatórios, recrutamento de células de defesa (linfócitos T infiltrantes - TILs) e consequente eliminação de algumas células tumorais e apresentação de seus neoantígenos. As células tumorais sobreviventes a “pressão Darwiniana” entram em equilíbrio e tornam-se mais resistentes e capazes de escapar aos ataques do sistema imune e então, proliferam-se descontroladamente (29).

Visando auxiliar o sistema imunológico do indivíduo a reconhecer e preservar-se dos mecanismos de escape adotados pelas células tumorais, a imunoterapia surgiu como um tratamento adjuvante às terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia). Desta forma, fortalecer a apresentação de antígenos e a ativação das células T é um processo primordial (50). Essa estratégia desenvolveu-se

extraordinariamente na última década e a sua peculiaridade é que em contraste a outros tratamentos até agora usados contra o câncer, o sistema imune pode atingir metástases e é capaz de diferenciar as células tumorais de forma seletiva. Apesar disso, como dito anteriormente, o tumor apresenta a característica de adquirir formas de resistência, tal como a utilização de mecanismos de imunossupressão, e neste ponto, a imunoterapia se apresenta como uma opção terapêutica, buscando estimular o sistema imune, inibir anergia e a exaustão.

O número de linfócitos infiltrados nos tumores (TILs) está associado positivamente a resultados clínicos mais favoráveis em câncer de mama (51, 52) sendo um indicativo da resposta imune contra as células tumorais. Portanto, o desenvolvimento de estratégias antitumorais com o objetivo de fortalecer respostas mediadas por células T aparece como uma excelente opção, baseando-se principalmente em inibir mecanismos imunossupressores ou em induzir mecanismos associados a coestimulação.

1.5.1 A imunomodulação mediada por 4-1BBL e OX-40L pode favorecer a atividade antitumoral

O receptor de superfície celular, CD137 (4-1BB/ILA) pertence a superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFRSF) e é encontrado em células *natural killer* (NK), podendo ser induzido por ativação em monócitos, linfócitos T CD4 e CD8 (53, 54). Seu ligante (4-1BBL/CD137L) é expresso em células apresentadoras de antígeno, como macrófagos, células dendríticas e células B (Quadro 1) (55, 56).

Após sua sinalização em células T, o 4-1BB pode interagir com o fator associado ao TNFR (TRAF) 1-3; TRAF-1, TRAF-2 e TRAF-3 (57, 58); (59, 60). Essa interação desencadeia uma cascata de ativação, incluindo a via de NF- κ B (fator nuclear kappa B) (61-63) que culmina no estímulo à divisão celular e sobrevivência através da expressão de genes de sobrevivência como BCL-XL e BFL-1 (64-66), ao mesmo tempo em que reduz a sinalização de moléculas pró apoptóticas, como BIM (Bcl-2-like protein 11) (49, 67).

A interação entre receptor e ligante gera um sinal coestimulatório em células T CD4 mas sobretudo, em T CD8, potencializando a ativação, sobrevivência (64), proliferação e citotoxicidade de células T (68, 69). A produção de citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1, em linfócitos T CD4; aquelas que estimulam a imunidade

celular, são elevadas, como IL-2 (70-72) e interferon gama (IFN- γ) (73-75) enquanto que Th2 (imunidade humoral) são suprimidas, como IL-4, IL-6 e IL-10, as quais medeiam a ativação de células B e produção de anticorpos (76).

Na presença de forte estímulo ao TCR, a sinalização mediada por 4-1BBL pode desencadear a ativação de células T, independente de CD28. Essa resposta é dependente da via NF- κ B e ativa a proliferação celular, secreção de citocinas como IL-2 e IFN- γ , podendo gerar resposta antitumoral (77) entretanto, a presença de CD28 desencadeia uma resposta mais robusta e protetora (78-80).

Ainda que a maioria dos trabalhos demonstrem atividade antitumoral mediada pela coestimulação de 4-1BB/4-1BBL, existem dados de que a interação entre essas moléculas também pode resultar numa sinalização antagônica, visto por exemplo que em células L78 (carcinoma escamoso de pulmão) a secreção de IFN- γ é aumentada, favorecendo a imunidade antitumoral, enquanto que células HepG2.2.15 (hepatocarcinoma) foram capazes de gerar uma sinalização reversa, pró-tumoral, através de 4-1BB que induziu a secreção de IL-8, contribuindo à angiogênese, apoptose de linfócitos T independente de Fas e consequente estímulo para progressão tumoral (81-84)

O CD134 (OX-40) também é um membro da família TNFRSF que é encontrado transitoriamente após o reconhecimento do antígeno e interação com o TCR, sobretudo em células T CD4 ativadas mas também em T CD8 ativadas sob forte estímulo antigênico, T regulatórias (Treg) humanas ativadas (em camundongos é constitutivo) e, em menor proporção em neutrófilos e células NK (Quadro 1) (85-88).

O ligante de CD134 (CD134L/OX-40L/CD252) pode ser induzido em APCs ativadas, como células B, células dendríticas e macrófagos, bem como células endoteliais, NK e mastócitos (Figura 6) (89). A interação OX-40:OX-40L desencadeia uma cascata de ativação similar a 4-1BB:4-1BBL, incluindo a via NF- κ B. Essa sinalização sustenta a expressão de proteínas anti-apoptóticas como BCL-XL e a secreção de citocinas como IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ , promovendo a sobrevivência e proliferação de células T CD4 de perfil Th1 e Th2, assim como o desenvolvimento de células efetoras e de memória (87). Esses mecanismos e sinalizações são essenciais para o desenvolvimento de uma imunidade contra o câncer, tornando-a um alvo promissor para a imunoterapia tumoral (90).

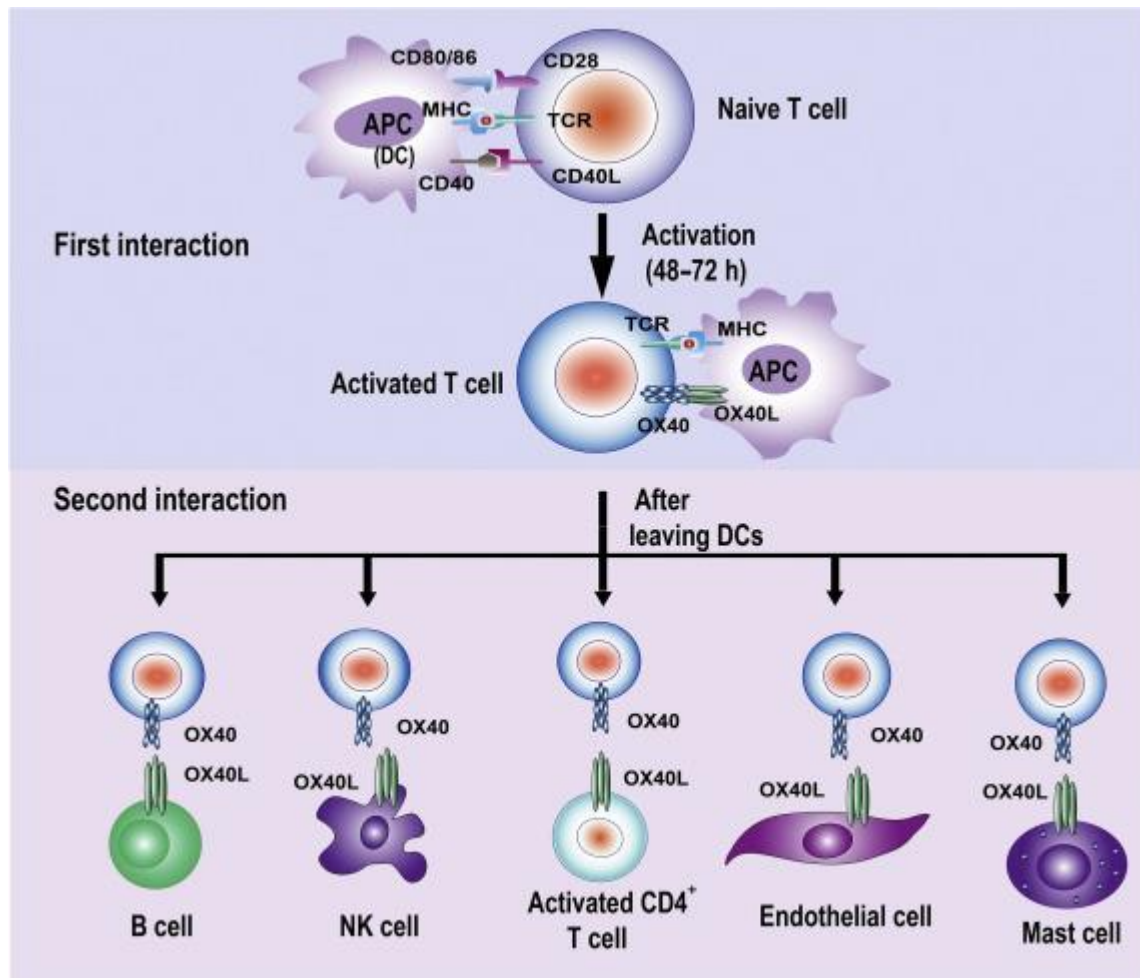


Figura 6 - **Interação entre OX-40/OX-40L.** Quanto ativada, a célula apresentadora de antígeno (APC) processa e expõe o antígeno via moléculas MHC e, passa a expressar moléculas coestimuladoras como CD80/CD86 (B7-1 e B7-2, respectivamente) e CD40. Ao encontrar uma célula T *naive*, ocorre a interação entre receptores e ligantes de ambas as células, fornecendo o primeiro (MHC/TCR) e segundo sinal (B7/CD28) necessários para a ativação da célula T. Entre 48-72 horas pós ativação, a célula T efetora passa a expressar outras moléculas coestimuladoras, como o OX-40, o qual pode se ligar ao ligante (OX-40L) de células B, células NK, células T CD4 ativadas, células endoteliais e mastócitos com o objetivo de impulsionar uma resposta imune. Fonte: Retirado de Fu *et al.*, 2020 (87).

1.5.2 A ambiguidade de GM-CSF na evolução do câncer

O GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos) é uma das quatro citocinas do fator estimulador de colônias (CSFs) que são essenciais na hematopoiese (91). Essa citocina é secretada em resposta a citocinas pró inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , por diferentes tipos celulares, como células T ativadas, células B, macrófagos, células endoteliais vasculares e fibroblastos (92). Seu receptor é o CD116 ou CSF2R e pode ser encontrado em células sanguíneas, epiteliais e apresentadoras de antígeno (Quadro 1) (93-95).

Dentre suas funções, o GM-CSF pode auxiliar em processos de cicatrização, pois é capaz de promover a proliferação e migração de queratinócitos e a migração de células endoteliais vasculares, contribuindo também na angiogênese (92). Além disso, ele também estimula a proliferação e ativação de macrófagos, células dendríticas, monócitos e neutrófilos, aumentando a apresentação antigênica, a fagocitose e consequentemente a quimiotaxia de linfócitos (96). Por esse motivo, o GM-CSF começou a ser utilizado como adjuvante em terapias tumorais para diminuir efeitos adversos da radioterapia e quimioterapia, como a neutropenia (diminuição de neutrófilos) e para aumento da resposta contra o tumor (97).

Por outro lado, o aumento dessa citocina no soro de pacientes oncológicos também pode estar associado a um câncer mais metastático por favorecer a angiogênese e aumentar a produção de metaloproteinases de matriz (MMP) -2; -9 e -26, cuja função é degradar proteínas da matriz extracelular possibilitando a migração e invasão (97, 98). O papel de GM-CSF como promotor de tumor foi relatado *in vivo* no câncer de cabeça e pescoço (99) e *in vitro* em células de câncer de pulmão (100).

Diversos estudos utilizando GM-CSF como adjuvante ou como vacina a partir de células autólogas ou alogênicas secretoras de GM-CSF (GVAX) estão em andamento e indicam boas perspectivas de resposta imune (101-104) e outros, necessitam de mais estudos mas sugerem ao menos, segurança clínica com baixa toxicidade (105, 106). Esse efeito antitumoral foi relatado em camundongos Balb/c vacinados de forma profilática com célula tumoral de câncer de mama, a qual foi previamente infectada com um vetor adenoviral recombinante para expressão de GM-CSF (107). Com início em 2006 e término ao final de 2021, ocorreram dois estudos de fase clínica para o tratamento de câncer de mama operável (NCT00880464) e metastático (NCT00317603) a partir de células autólogas secretoras de GM-CSF mediante transferência gênica mediada por adenovírus. Dados preliminares de ambos os estudos demonstraram baixo efeito adverso grave da terapia neoadjuvante, como distúrbio cardíaco e respiratório. No primeiro ensaio clínico, 28% dos pacientes chegaram ao final do estudo, enquanto que no segundo, 86% entretanto, ainda não existem dados publicados da correlação entre as vacinas e a estabilidade do quadro tumoral.

Efeitos positivos da vacina GVAX também foram visto em melanoma (108), carcinoma de células renais (109), câncer de pulmão de células não pequenas (110, 111) e próstata (112), que conta com a Sipuleucel-T; uma vacina antitumoral aprovada

pelo FDA (Food and Drug Administration) para casos metastáticos de câncer de próstata resistente a terapia hormonal (113). Essa vacina consiste em incubar a proteína recombinante de um antígeno frequentemente expresso pelas células tumorais dos pacientes com câncer de próstata, chamado de fosfatase ácida prostática (PAP), em fusão à citocina GM-CSF, juntamente com as células apresentadoras de antígeno, isoladas do paciente, afim de elevar a apresentação antigênica e a resposta das células T contra o tumor (114).

O Quadro 1 aborda de forma resumida o resultado das interações entre os imunomoduladores descritos acima.

Quadro 1 - A expressão dos imunomoduladores pelas células e a atividade resultante de suas respectivas interações.

Imunomodulador	Células que expressam o receptor	Células que expressam o ligante	Atividade	Marcadores
CD137/4-1BB	Células NK, Monócitos Linfócitos T CD4 e CD8 ativados	APCs como macrófagos, células dendríticas e células B	Expansão clonal, sobrevivência e citotoxicidade de células T	Citocinas de perfil Th1, como IL-2 e IFN- γ
CD134/OX-40	Induzível em células NK, Neutrófilos, Treg (constitutivo em camundongo), T CD4 e T CD8 ativados	Induzível em APCs (DC, macrófagos, células B), células endoteliais, NK e mastócitos	Sobrevivência e proliferação de células T CD4 e CD8 efetoras e de memória	Citocinas de perfil Th1 e Th2 como IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ
GM-CSF	Células sinalizadoras	Células Alvo	Regulação de células hematopoiéticas, maturação de células apresentadoras de antígeno e quimiotaxia de linfócitos	MHC-II, CD11c
	Células T ativadas, células B, macrófagos, células endoteliais vasculares e fibroblastos	Células apresentadoras de antígeno, células sanguíneas e epiteliais		

Fonte: Autoria própria.

1.6 Receptores hormonais subdividem o câncer de mama

O câncer de mama pode ser dividido com base em seus marcadores celulares em grandes grupos quanto a presença de receptor de estrogênio (ER +), receptor de progesterona (PR +), receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2 +) ou pela ausência destes, no caso do câncer de mama triplo-negativo (TNBC) (115, 116).

O TNBC corresponde a cerca de 15% dos cânceres de mama e é geralmente diagnosticado em mulheres de ascendência africana e hispânica com idade inferior a 50 anos (117, 118). As pacientes diagnosticadas apresentam um mau prognóstico com um aumento no risco de reincidência e metástase comparado com os outros tipos. Estima-se que 35% das pacientes diagnosticadas com este tipo de câncer irão apresentar metástase após quimioterapia (119-121).

Uma busca no banco de dados *PubMed* correlacionando os termos “*triple negative breast cancer*” AND “*immunotherapy*”, revelou que nos últimos 10 anos as pesquisas mundiais sobre imunoterapia e o câncer de mama ganharam notabilidade mundial (Figura 7), sobretudo o TNBC associado aos checkpoints imunológicos PD-1/PD-L1 (122).

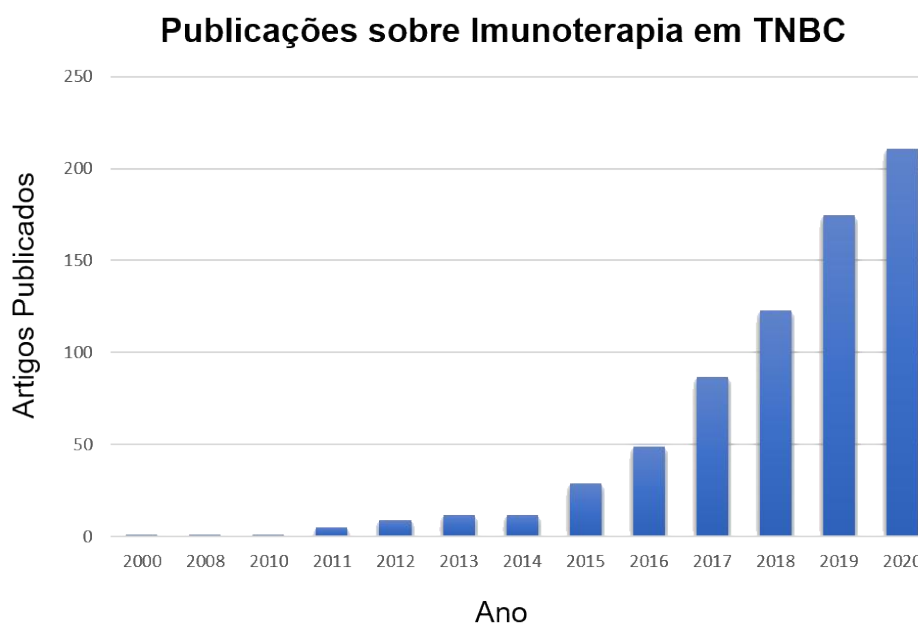


Figura 7 - **Avanço dos estudos de imunoterapia no câncer de mama triplo negativo (TNBC)**. Quantidade de publicações anuais sobre imunoterapia em câncer de mama triplo negativo entre os anos 2000 à 2020. Fonte: Autoria própria.

1.7 Terapias em câncer de mama triplo negativo

Entender a epidemiologia e traçar um perfil genético das doenças auxilia na profilaxia, possíveis formas de tratamento e terapia (123). Os fatores desencadeadores do câncer de mama são diversos e os estudos acerca deles transitam entre os hábitos de vida, fatores genéticos e também hormonais, como a utilização de métodos contraceptivos (124).

Sua heterogeneidade e agressividade tumoral dificultam o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica eficaz. A terapia padrão de cirurgia, quimioterapia e radioterapia funciona para aproximadamente 20% dos pacientes com TNBC sendo a quimioterapia a primeira linha de tratamento padrão mas a resposta é de curta duração, o que reflete numa sobrevida global mediana (OS) inferior a 2 anos, ou seja,

esses pacientes possuem aproximadamente 2 anos desde o início do tratamento até o falecimento (125).

Compreender a complexa interação entre células tumorais e o microambiente imunossupressor que as rodeia, trouxe abordagens terapêuticas que tentaram modular o desempenho do sistema imunológico, a evolução e o progresso do câncer (126). Uma terapia que desencadeie morte das células tumorais e consequente liberação de seus neoantígenos possibilita a resposta imune frente ao seu desenvolvimento, principalmente por linfócitos T (127).

Estudos recentes modificaram os paradigmas sobre o entendimento do câncer de mama. Considerado até então como um tumor “frio” (de baixa imunogenicidade), de escasso infiltrado de células T (TILs) e de pouca carga mutacional em relação a cânceres de pulmão, melanoma e rim (128, 129), as estratégias terapêuticas adotadas por muitas décadas foram cirurgia e quimioterapia (130). Atualmente, é sabido que o câncer de mama triplo negativo é imunogênico e que pacientes com este tipo tumoral e com grande prevalência de TILs; possuem melhor prognóstico, uma vez que estes linfócitos podem atuar na imunovigilância, potencializando o benefício de protocolos terapêuticos (131-134).

Estudos indicam que aproximadamente 20 à 30% de pacientes com câncer de mama expressam PD-L1 (135, 136). Além disso, é conhecido que este tipo oncológico está associado a mutações na via PTEN/PI3K (137-139) e o desequilíbrio de PTEN desencadeia uma regulação positiva de PD-L1, que por sua vez, suprime a proliferação e a sobrevivência das células T (135).

Baseado nas descobertas acima, terapias a base de taxanos e compostos de platina estão sendo utilizadas como agentes quimioterápicos principais no TNBC. Também tem sido estudado e aplicado inibidores que atuam em vias para supressão da angiogênese, proliferação e processos de reparo celular como inibidores de PARP-1 (Poli-ADP-ribose polimerase) e de ciclina 4 e 6 (140-142). Não menos importante, o estudo com anticorpos monoclonais a base de inibidor de *checkpoint* como PD-L1 também têm sido alvo de diversos estudos (143, 144). O Quadro 2 trás um resumo de algumas destas abordagens terapêuticas.

1.7.1 Agentes quimioterápicos induzem morte celular e podem potencializar a imunogenicidade tumoral

O objetivo da quimioterapia é utilizar uma droga que desencadeie a morte das células tumorais e, por consequência, também ocorre a liberação de neoantígenos e recrutamento de TILs (140). Vários quimioterápicos têm sido utilizados em associação a agentes imunoterapêuticos na tentativa de alterar o microambiente imunossupressor e auxiliar a atividade antitumoral (145-151).

Taxanos como paclitaxel, nab-paclitaxel (paclitaxel associado a nanopartículas de albumina) e docetaxel têm sido empregados no TNBC pois agem nos microtubulos; estruturas necessárias no processo de divisão celular, transporte intracelular e motilidade, desencadeando uma sinalização pró apoptótica e consequentemente antitumoral (142, 152-155). Compostos de platina como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina também fazem parte deste grupo terapeutico para TNBC (156-159).

O microambiente tumoral é de extrema importância na resposta contra o tumor. Foi constatado que estes agentes são capazes de inibir a mitose e induzir a morte celular imunogênica (ICD do inglês, *immunogenic cell death*) ou seja, as células tumorais passam a liberar padrões moleculares associados a dano (DAMPs), facilitando a atividade das células T. Somado a isso, também foi descrito que esses reagentes conseguem aumentar a expressão de MHC de classe I nas células tumorais; outro fator importante para a atividade antitumoral (160-162).

A aplicação destes medicamentos deve ser ponderada, uma vez que podem desencadear efeitos colaterais relevantes (163) como neurotoxicidade (164) pois podem induzir a apoptose dos neurônios (165). Outro desafio ainda em investigação tem sido como resolver a resistência intrínseca ou adquirida dos compostos a base de platina (166-168)

1.7.2 Terapia alvo-específica: Mutações em genes BRCA tornam células tumorais mais susceptíveis a terapias com inibidores de PARP

Os genes supressores de tumor, BRCA1 e BRCA2 regulam o reparo do DNA através do controle de pontos de verificação do ciclo celular, regulação da transcrição e apoptose (169). Mutações nestes genes são responsáveis por 5% dos casos de câncer de mama (170, 171) e para os casos hereditários, essa mutação é responsável por 80% deles (172).

Foi observado que mutações em BRCA tornavam as células mais receptivas aos inibidores de PARP-1 (173-177) pois, uma vez que a mutação não é reparada a

morte celular é induzida (178-180). A polimerase poli (ADP-ribose) (PARP) é uma família de proteínas importantes na detecção e remoção de bases danificadas no DNA, atuando em mecanismos de reparo do DNA (181). Resumidamente, células tumorais são marcadas por diversas mutações e os inibidores de PARP atuam impedindo que PARP efetue sua função em reparar a mutação, ocasionando o rompimento na dupla fita do DNA e morte celular. Caso a quebra da fita simples seja reparada, a célula sobrevive, podendo adquirir um perfil tumoral (182).

Diferentemente da maioria das outras terapias que não são alvo-específicas, esta demonstrou-se direcionada a células com deficiência em BRCA1 ou 2 (175, 176) contudo, apenas 20-40% dos pacientes beneficiam-se dos inibidores de PARP; ainda assim o tratamento não é muito eficaz, resultando em recidiva precoce e metástase (183, 184). A competência abaixo do esperado pode ser resultante da alta sensibilidade a PARP que o medicamento gera (185, 186), uma vez que o organismo tende a adquirir resistência. Dentre as drogas hoje utilizadas estão o Olaparibe (Lynparza) e o Talazoparibe (Pfizer Inc.) (184).

Com o intuito de aumentar o efeito citotóxico e desencadear a morte celular, foi descrito que os inibidores de PARP também podem atuar em combinação com agentes danificadores do DNA provenientes da quimioterapia ou radioterapia de forma a deixar a célula mais vulnerável a danos (187, 188).

1.7.3 Terapia de TNBC com inibidores de CDKs

O gene do retinoblastoma (RB1) é capaz de regular a proliferação celular ao interagir com o fator de transcrição E2F, inibindo a transcrição e a parada do ciclo celular (Figura 8 A), mantendo o crescimento controlado (189-191). A inativação da proteína do retinoblastoma (pRb) é desencadeada após sua hiperfosforilação pelas cinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6) e liberação do fator de transcrição E2F, permitindo a continuidade do ciclo celular; um fator chave e desencadeante de tumor para células malignas (Figura 8 B) (192).

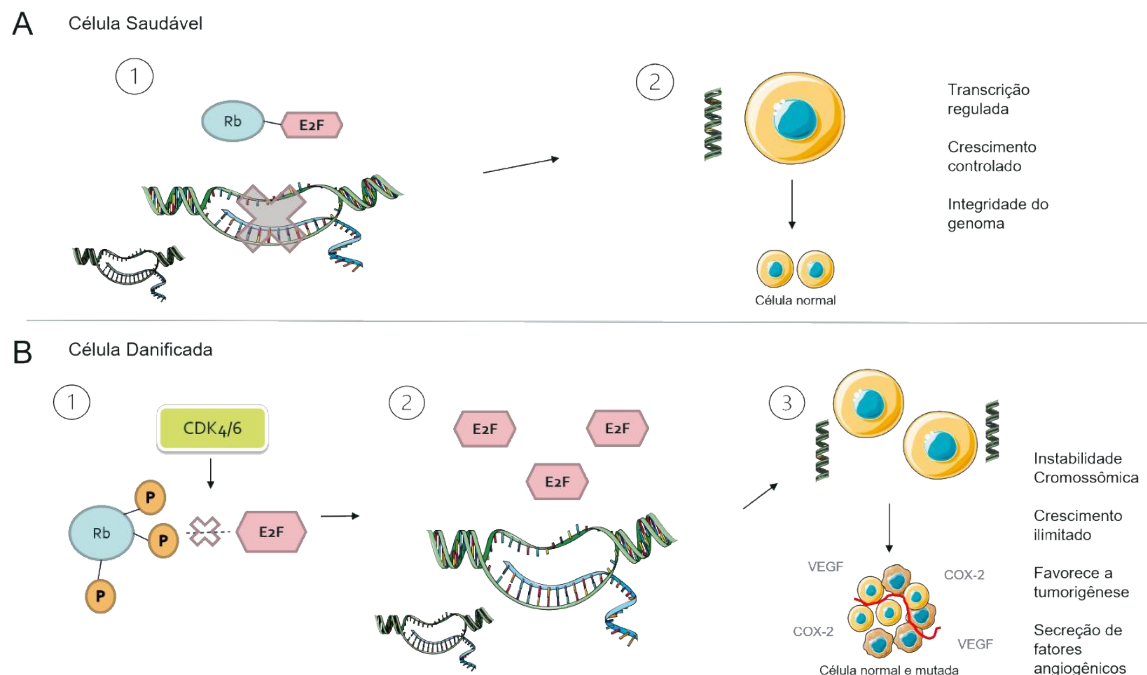


Figura 8 - Regulação transcricional pelo gene supressor de tumor do retinoblastoma (Rb). Numa célula saudável, quando Rb se liga ao fator de transcrição E2F (A1), o Rb pode reprimir sua atividade, bem como a de genes necessários para a continuidade do ciclo celular. Logo, Rb regula a transcrição, mantendo os níveis de crescimento celular controlado e a integridade do genoma (A2). Por outro lado, quando cinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6) hiperfosforilam Rb (B1), o fator de transcrição E2F fica livre, possibilitando a continuidade do ciclo celular (B2). O crescimento celular descontrolado pode desencadear instabilidade cromossômica, propiciando o surgimento de células mutadas com genótipo tumoral. Essas células alteradas podem começar a secretar fatores angiogênicos, como VEGF, para gerar um microambiente mais nutritivo e também com potencial metastático, através da secreção de COX-2, por exemplo (B3). Fonte: Autoria própria.

Novos medicamentos que inibam as cinases dependentes de ciclina 4 e 6 e, consequentemente mantenham a função de Rb em suprimir o ciclo celular para reparo do genoma foram testados no câncer de mama, resultando no desenvolvimento de medicamentos como Palbociclib, Ribociclib e Abemaciclib para câncer de mama HER2 (193).

A princípio, essa estratégia não parecia promissora para os casos de TNBC, uma vez que aproximadamente 30% deles possuem perda da função do retinoblastoma (194, 195) e níveis alterados de ciclina (196) contudo, um modelo pré-clínico de TNBC tratado com Abemaciclib demonstrou aumento de MHC-I e regressão tumoral, indícios positivos para tratamento de uma parcela de pacientes TNBC (197).

Quadro 2 - Abordagens terapêuticas utilizadas/estudadas para tratamento do câncer de mama triplo negativo.

	Composto	Tipo	Ação
Quimioterapia	Paclitaxel, Nab-paclitaxel (paclitaxel associado a nanopartículas de albumina) e Docetaxel	Taxano	Atuam nos microtúbulos desencadeando sinalização pró apoptótica e atividade antitumoral
	Cisplatina, carboplatina e oxaliplatina	Compostos de Platina	Inibição de mitose, morte celular imunogênica e recrutamento de células efetoras
Alvo específica para células com deficiência em BRCA 1 ou 2	Olaparibe (Lynparza) e Talazoparibe (Pfizer Inc.)	Inibidor de PARP	Impede o reparo da excisão de base do DNA ocasionando morte celular
Alvo específica – reparo do gene e função do retinoblastoma	Palbociclibe, Ribociclibe e Abemaciclibe	Inibidor de CDK4 e 6	Reparo do gene do retinoblastoma, supressão do ciclo celular para reparo do genoma

Fonte: Autoria própria.

1.7.4 Terapia para TNBC com anticorpos monoclonais

O pior prognóstico e a dificuldade de progresso nas terapias alvo dirigidas em relação a outros tipos de câncer de mama são em parte, devido a alta heterogeneidade do TNBC contudo, a comunidade científica obteve avanços promissores para esse tipo oncológico no campo da imunoterapia baseada em inibidores de *checkpoints* imunológicos (198).

O ensaio clínico do KEYNOTE-086 (identificador do *ClinicalTrial* NCT02447003), utilizou um anticorpo monoclonal anti-PD-1 (pembrolizumabe) que bloqueia a interação com seus ligantes (PD-L1 e PD-L2). O uso do pembrolizumabe em monoterapia de primeira linha desencadeou boa resposta antitumoral para pacientes TNBC PD-L1 positivos e baixos efeitos adversos (199). Por outro lado, ao compará-lo com o KEYNOTE-012 (NCT01848834) que estudou pembrolizumabe como monoterapia de segunda/terceira linha em pacientes TNBC PD-L1 positivos, embora a atividade antitumoral tenha sido durável e a administração segura, a sobrevida livre de progressão foi menor do que se administrado como primeira linha de tratamento (122, 200), indicando que as respostas dos inibidores de PD-L1 são mais favoráveis quando em tratamentos de primeira linha. Estes dados desencadearam o estudo do KEYNOTE-355 (NCT02819518) envolvendo pembrolizumabe ou placebo associado a quimioterapia (nab-paclitaxel, paclitaxel e gemcitabina/carboplatina) para pacientes TNBC inoperável ou metastático como terapia de primeira linha. Uma análise prévia do estudo indicou melhora estatística e clínica em sobrevida livre de progressão (201).

No início de 2019, após publicação de dados promissores do estudo IMpassion130, o FDA (*Food & Drug Administration*) aprovou o uso do atezolizumab; um anticorpo monoclonal anti PD-L1 (Tecentriq) associado a um quimioterápico (nab-paclitaxel) para pacientes TNBC metastático não tratado com perfil PD-L1 positivo (202). Após 2 anos, o tratamento passou por uma segunda análise demonstrando uma mediana de 7 meses de sobrevida global para pacientes PD-L1 positivos tratados com a imunoterapia enquanto que a mediana da sobrevida livre de progressão foi de apenas 2.2 meses a mais em relação ao grupo placebo (145).

Embora os dados tenham indicado melhora clínica nas taxas de sobrevida global e livre de progressão para pacientes TNBC avançados, estes mesmos dados não foram estatisticamente significativos conforme metodologia para estudo clínico prospectivo de “análise por intenção de tratar” (145, 202). Outro estudo, IMpassion132 (NCT03371017), avaliando atezolizumabe ou placebo com quimioterapia (gemcitabina mais carboplatina ou capecitabina) em primeira linha para TNBC avançado/metastático inoperável recorrente menor ou igual a 12 meses após quimioterapia neo(adjuvante) a base de antraciclina ou taxano ainda está em desenvolvimento (203).

Desta maneira, faz-se necessário estudos que tenham como alvo o desenvolvimento de estratégias que consigam maior eficácia na terapia destes tumores e evitem reincidências.

Quadro 3 - Ensaios clínicos utilizando imunoterapia como monoterapia ou associada a quimioterapia para casos de câncer de mama triplo negativo. PFS: Progression-free Survival (sobrevida livre de progressão).

Ensaio Clínico	Estudo	Medicamento	Ação	Paciente	Resultado
NCT02447003	KEYNOTE-086	Pembrolizumabe	Anti PD-1	Monoterapia de primeira linha em TNBC PD-L1+	Aplicação segura e mediana de PFS de 2 meses
NCT01848834	KEYNOTE-012	Pembrolizumabe	Anti PD-1	Monoterapia de segunda/terceira linha em TNBC avançado PD-L1+	Aplicação segura e mediana de PFS de 1.9 meses
NCT02819518	KEYNOTE-355	Pembrolizumabe + quimioterapia (nab-paclitaxel, paclitaxel e gemcitabina/carboplatina) ou placebo	Anti PD-1 + Quimioterapia	Primeira linha para NBC inoperável ou metastático	Mediana de PFS em Pembro/Quimio foi de 9.7 meses e Placebo+ Quimio de 5.6 meses
NCT02425891	IMpassion130	Atezolizumabe (Tecentriq) + Quimioterapia (nab-paclitaxel)	Anti PD-L1 + Quimioterapia	TNBC metastático não tratado com PD-L1+	Mediana de PFS de 2 meses a mais que o placebo
NCT03371017	IMpassion132	Atezolizumabe (Tecentriq) ou Placebo + Quimioterapia (nab-paclitaxel)	Anti PD-L1 + Quimioterapia	TNBC avançado/metastático inoperável	Sem resultado

Fonte: Autoria própria.

1.7.5 Proposta de Abordagens inovadoras baseadas em Vacinas Antitumorais para terapia de TNBC

Diferentemente das vacinas tradicionais que contém antígenos purificados com efeito profilático, a vacina terapêutica ou antitumoral almeja através da imunoterapia, capacitar o sistema imunológico do indivíduo a reagir ao câncer de forma específica e que possa atingir metástases através de diferentes métodos, como por exemplo, a vacina baseada em células autólogas (204).

Uma vacina baseada em células bem sucedida é capaz de elevar a atividade de APCs e consequentemente a apresentação antigênica, de maneira a tornar os linfócitos T CD4 e CD8 mais responsivos ao tumor. A partir de um sistema imunológico robusto, mais células cancerosas serão identificadas e eliminadas por um processo conhecido como morte celular imunogênica (ICD). A morte destas células libera DAMPS e aumenta o recrutamento de APCs, fortalecendo o ciclo eliminatório (205, 206).

Observamos em nosso laboratório que combinações de vacinas derivadas de células tumorais expressando os imunomoduladores OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF que coestimulam as células T e são expressos por células apresentadoras de antígenos

fortalecem a resposta antitumoral em modelos animais, suprimindo tumores e induzindo uma resposta duradoura, que pode impedir a recidiva (207). Verificamos também que animais tratados com estas vacinas apresentam um aumento no infiltrado de células T citotóxicas nos tumores e no baço.

Sabidamente, o TNBC é um tumor que apresenta relevante quantidade de infiltrado de células T, contudo, essas células podem estar anérgicas ou imunossuprimidas, podendo contribuir para a diminuição da eficácia com terapias baseadas em inibidores de *checkpoint* (133, 208). Os resultados observados nos experimentos *in vivo* com animais e dados da literatura nos motivaram a ampliar nossos estudos de forma mais dirigida ao desenvolvimento de uma aplicabilidade clínica.

Para o desenvolvimento deste projeto, iniciamos uma parceria com o CAISM da UNICAMP em colaboração com a Professora Dra. Sophie Derchain, professora titular em Ginecologia do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Dra. Susana Oliveira Botelho Ramalho, médica oncologista clínica do Departamento de Tocoginecologia da FCM/UNICAMP CAISM e com a Dra. Geisilene Russano de Paiva Silva, médica patologista. Dessa forma, além de todo o suporte clínico científico, também pudemos utilizar amostras provenientes do biobanco de pacientes diagnosticadas com TNBC. Estas pacientes receberam quimioterapia neoadjuvante e não tiveram resposta terapêutica satisfatória. Dessa forma, nossa proposta consistiu em explorar estratégias de imunoterapia baseadas em vacinas antitumorais geradas a partir de células tumorais provenientes da biopsia destas pacientes com TNBC do CAISM. Nestes ensaios também planejamos investigar a modulação de linfócitos primários oriundos das pacientes TNBC do CAISM em ensaios *in vitro*, avaliando a ativação linfocitária e potencialidade de eliminação tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este projeto tem como objetivo central realizar uma avaliação *in vitro* do efeito de vacinas antitumorais derivadas de células tumorais primárias de câncer de mama triplo negativo geneticamente modificadas com imunomoduladores OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF.

2.2 Objetivos Específicos

1. Clonagem dos genes humanos OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF em vetores plasmidiais utilizados na produção de vetor viral recombinante.
2. Construção de vetores virais (OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF).
3. Isolamento de células primárias provenientes do tumor da paciente e estabelecimento de linhagens.
4. Transdução dos vetores virais para estabelecimento de células imunomodulatórias a partir de células primárias isoladas do tumor.
5. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) de doador saudável e da paciente.
6. Ensaios *in vitro* com as células tumorais primárias em co-cultivo com PBMCs previamente incubados com células tumorais geneticamente modificadas expressando imunomoduladores para verificar a indução de citotoxicidade dos PBMCs contra o tumor.

3. METODOLOGIA

Para desenvolver este projeto, seguimos o fluxo de trabalho como consta na Figura 9. Os passos de cada etapa, foi descrito em detalhes nos tópicos que o seguem.

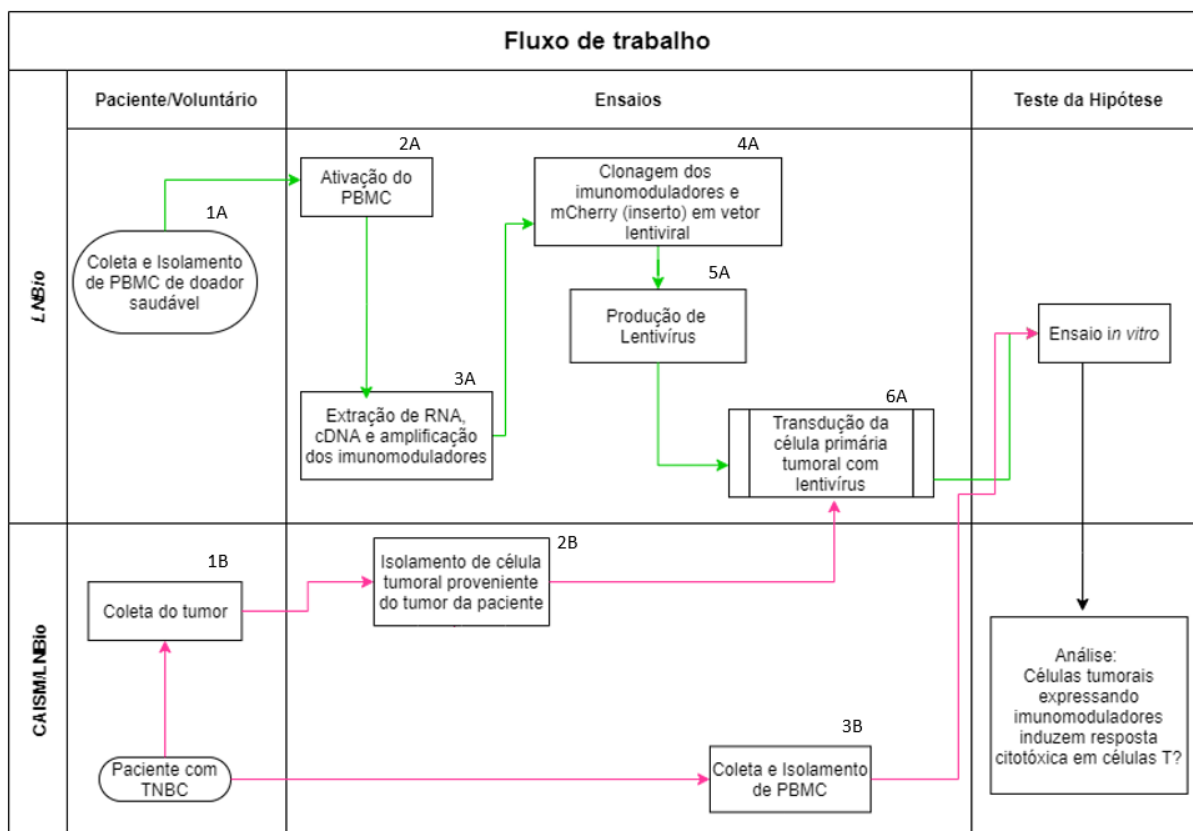


Figura 9 - Fluxo de trabalho para o desenvolvimento do projeto. Fonte: Autoria própria.

3.1 Coleta de sangue, isolamento e ativação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Para obter as moléculas imunomodulatórias, o sangue venoso de um doador saudável foi coletado através de sistema a vácuo em tubo de heparina (Figura 9, 1A). Após gradiende de densidade com Ficoll-Paque (GE) conforme protocolo do fabricante, as células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC*) foram coletadas, lavadas em PBS 1X, contabilizadas e colocadas em cultura com meio RPMI 1640 completo (CM) (1% de penicilina/estreptomicina (Gibco), 10% de soro fetal bovino (Vitrocell), 1% de HEPES (Gibco), 1% de piruvato de sódio (Gibco), 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco),

1% de glutamina (Gibco) e 50 μ M de β -mercaptoetanol (Gibco)). Para expressarem as moléculas de interesse, cerca de 10^7 células foram estimuladas com 5 μ g/mL de anticorpo anti-CD3 (Tonbo) e 5 μ g/mL de anticorpo anti-CD28 (Tonbo) (Figura 9, 2A).

3.2 Extração de RNA, cDNA e RT-PCR

Após 72 horas de estímulo, o RNA foi extraído com TRIzol® Reagent (Invitrogen) seguido por transcrição reversa do RNA (RT-PCR) com o kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems™) (Figura 9, 3A). O inserto GM-CSF (NM_000758.4) foi amplificado a partir do DNA complementar (cDNA) com enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega) numa temperatura de melting (T_m) de 60°C através de primers contendo sequências *sticky ends* de sítios de restrição; (*foward* ERI) CGGCGAATTCAAGGCTAAAGTTCTCTGG e (*reverse* BHI) GATTGGATCCTTTCATGAGAGAGCAGCTCC; bem como o inserto OX-40L (NM_003326.5) T_m 57°C com os primers (*foward* BHI) GCAAGGATCCCTTCCCTCTACCCAGATTGT e (*reverse* BHI) TAAAGGATCCTTTCATGCTGGTGCCTGGT. Diferentemente, o inserto de 4-1BBL (NM_003811.4) foi amplificado numa T_m de 59°C com enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase utilizando-se os primers sem sítios de restrição mas com sequências *sticky ends*; (*foward*) GCTATCATGGAATACGCCTCTG e (*reverse*) GTACTTATTCCGACCTCGGTGA e posterior *nested* PCR com GoTaq.

O Quadro 4 traz o resumo da estratégia utilizada para amplificação dos imunomoduladores e a temperatura de *melting* proveniente da reação de amplificação.

Quadro 4 - Estratégia de amplificação dos imunomoduladores. A amplificação por PCR convencional do GM-CSF foi feita com enzima GoTaq utilizando temperatura de melting (T_m) de 60°C e primers com sequências de EcoRI (Foward) e BamHI (Reverse) para posterior clonagem em vetor plasmidial. O OX-40L também foi amplificado com enzima GoTaq em T_m de 57°C com sequência de BamHI em ambos os primers. Diferentemente, o 4-1BBL foi

inicialmente amplificado com enzima Phusion e posteriormente, foi realizado uma nested PCR com GoTaq em Tm de 59°C e sem sequência para enzima de restrição nos primers.

Imunomodulador	Primer	Enzima de Restrição	Enzima Utilizada	Temperatura de Melting
GM-CSF F(oward)	CGGC <u>GAATT</u> CAAGGCTAAAGTTCTCTGG	EcoRI	GoTaq	60°C
GM-CSF R(everse)	GATT <u>GGATC</u> CTTTCATGAGAGAGCAGCTCC	BamHI	GoTaq	60°C
OX-40L F	GCAA <u>GGATC</u> CCTTCCCTCTACCCAGATTGT	BamHI	GoTaq	57°C
OX-40L R	TAAA <u>GGATC</u> CTTTCATGCTGGTGCCTGGT	BamHI	GoTaq	57°C
4-1BBL F	GCTATCATGGAATACGCCTCTG	Sem enzima	Phusion e GoTaq	59°C
4-1BBL R	GTACTTATTCCGACCTCGGTGA	Sem enzima	Phusion e GoTaq	59°C

Fonte: Autoria própria.

3.3 Clonagem dos genes humanos OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF em vetores plasmidiais

Após amplificação com enzima GoTaq, os insertos OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF humanos foram subclonados no vetor pGEM T-Easy® (Promega), sendo que o primeiro foi retirado deste vetor através de digestão com BamHI e os outros dois com EcoRI.

Os insertos recuperados da subclonagem foram purificados com QIAquick Gel Extraction Kit® (QIAGEN) e ligado com enzima T4 DNA Ligase (NewEngland BioLabs) no vetor lentiviral FUW (Addgene #14882), o qual foi previamente digerido com as mesmas enzimas de seu respectivo inserto (Figura 9, 4A e Figura 10).

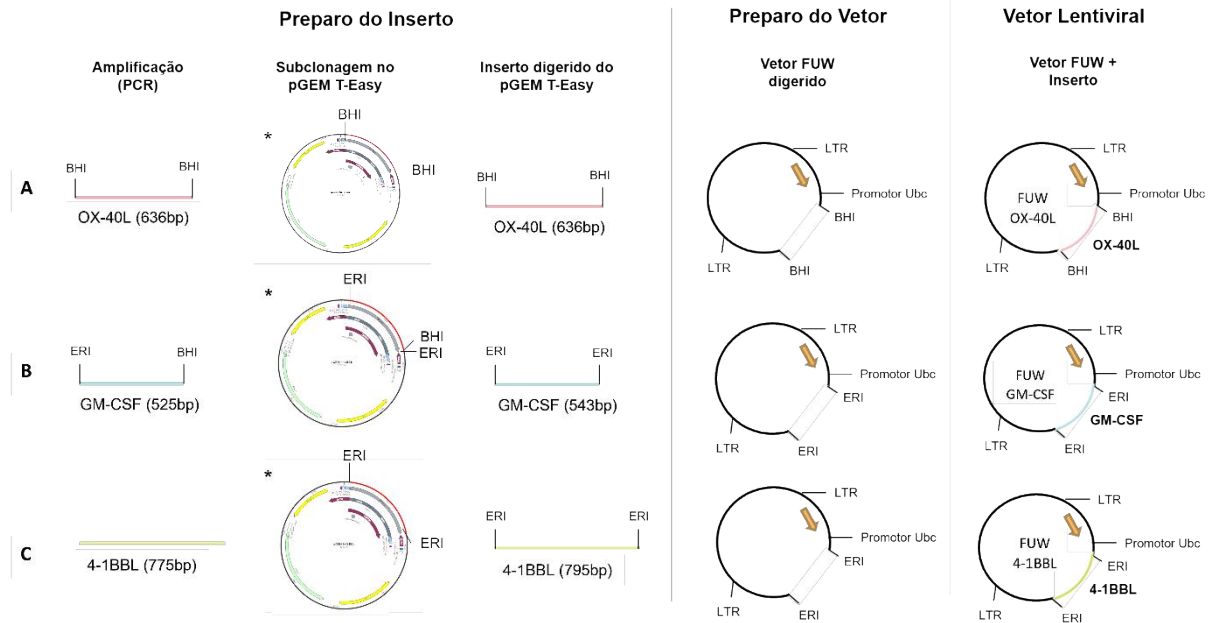
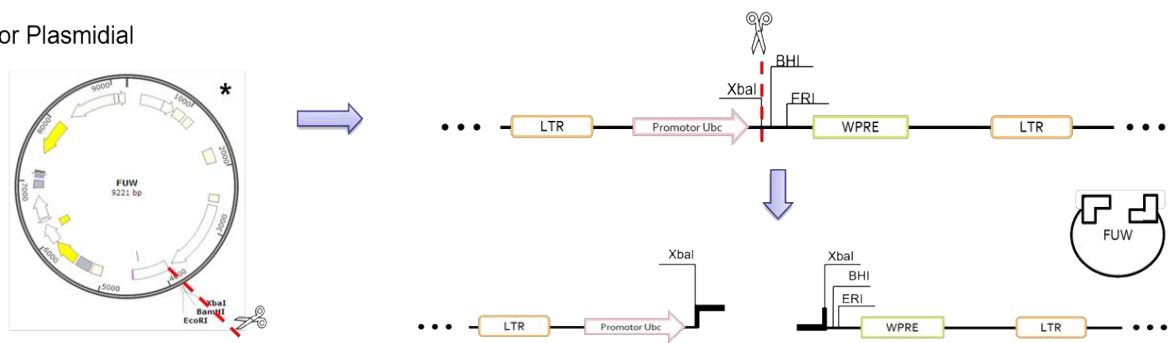


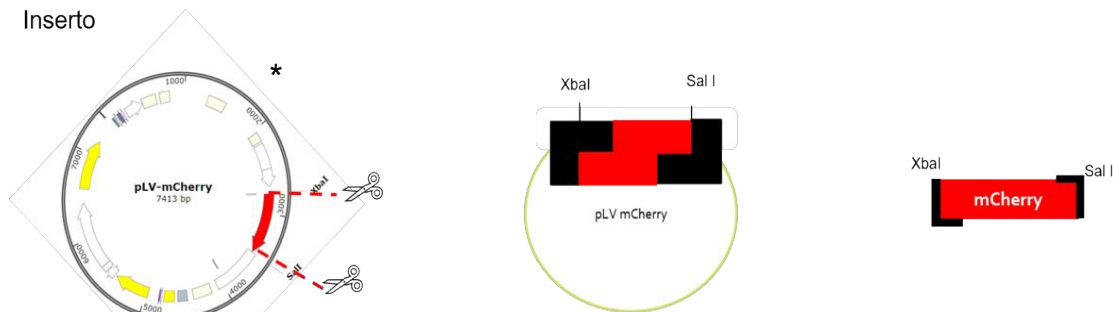
Figura 10 - Clonagem dos imunomoduladores em vetor lentiviral. O inserto OX-40L foi amplificado por PCR com enzima GoTaq e primers flanqueados com BamHI (BHI). O produto resultante foi subclonado em vetor pGEM T-Easy, recuperado através de digestão com enzima BamHI presente nas extremidades dos primers de amplificação do gene alvo, purificado e ligado no vetor FUW (Addgene) previamente digerido com a mesma enzima (linha A). O imunomodulador GM-CSF humano foi amplificado por PCR com enzima GoTaq e primers flanqueados por EcoRI (ERI) no sentido forward (F) e BHI em reverse (R). O produto resultante da amplificação foi subclonado no vetor pGEM T-Easy de acordo com o protocolo do fabricante. O gene foi recuperado do pGEM utilizando-se a enzima ERI presente no sítio de múltipla clonagem do vetor. Após purificação, o inserto foi ligado no vetor FUW também digerido com ERI (linha B). O imunomodulador 4-1BBL foi amplificado com a enzima Phusion seguido por nested PCR com GoTaq e posterior subclonagem no pGEM T-Easy. O inserto foi recuperado através da digestão do vetor com enzima ERI, seguido de purificação e ligação com o FUW previamente linearizado com ERI (linha C). Todas as ligações foram transformadas em bactéria DH5α e as colônias resultantes foram processadas através de miniprep caseira. Os melhores clones de cada vetor foram escolhidos após análise de sequenciamento de nova geração (NGS). Fonte: Autoria própria. * Vetor retirado do software Snapgene.

Para clonagem do FUMW (FUW + mCherry), o vetor foi linearizado com XbaI e o inserto mCherry foi retirado do vetor comercial pLV-mCherry (Addgene #36084) com Xba-I e Sal-I HF. Para que a ligação entre eles fosse compatível, ambos foram tratados com T4 DNA Polimerase (NewEngland BioLabs) para preenchimento das extremidades 5' e 3' (*Fill in*) seguido por purificação e ligação (Figura 11).

Vetor Plasmidial



Inserto



Vetor Lentiviral

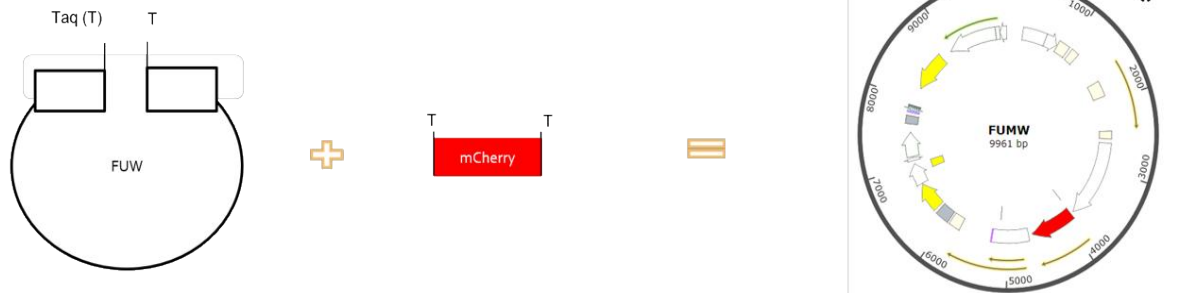


Figura 11 – **Clonagem do vetor FUW mCherry (FUMW)**. A estratégia de clonagem para obtenção do vetor FUMW consistiu em linearizar o vetor FUW (Addgene) com enzima XbaI. O inserto (mCherry) foi obtido através da digestão do vetor comercial pLV-mCherry (Addgene) com XbaI e SalI. Para tornar as extremidades entre vetor e inserto compatíveis, ambos foram tratados com a enzima T4 DNA Polimerase para preenchimento das extremidades 5' e 3' (*fill in*). Em seguida, vetor e inserto foram purificados e ligados. A seleção do melhor clone FUMW foi feita após investigação das colônias resultantes da transformação da ligação através de sequenciamento e PCR de colônia. Fonte: Autoria própria. * Vetor retirado do software Snapgene.

Todas as ligações acima foram transformadas com bactéria DH5α (NewEngland BioLabs), as colônias provenientes foram processadas por miniprep caseira ou PCR de colônia e submetidas a mapa de restrição com enzimas que liberassem o inserto. Os clones positivos na digestão ou na PCR foram sequenciados através do sequenciamento de nova geração (NGS), possibilitando análise de identidade e o sentido de ligação do inserto no vetor.

3.4 Construção de vetores lentivirais (OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF) e titulação

Os vetores virais foram produzidos em células HEK293T (ATCC) por transfecção transiente pelo protocolo de fosfato de cálcio a partir do plasmídeo codificando o gene imunomodulatório humano obtido na clonagem. Estes plasmídeos foram incubados com vetores de empacotamento para a produção de partículas virais expressando os genes humanos OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF, bem como o gene repórter mCherry.

O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado após 24; 48 e 72 horas da transfecção, seguindo por centrifugação a 400g, 5 minutos, 4°C para remoção de debri. Uma alíquota de 200µL de cada coleta foi guardada antes dos passos a seguir para posterior controle de rendimento. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi filtrado em filtro de seringa de 0.22µM e ultracentrifugado a 110.000g à 4°C por 90 minutos na ultracentrífuga Beckman Optima XL-80 para concentração viral. O pellet resultante da ultracentrifugação contendo as partículas virais foi ressuspendido em PBS 1x, aliqotado e armazenado em biofreezer para posterior titulação e transdução nas células primárias.

Após as três coletas, as células produtoras de vírus foram recuperadas da placa para coloração com anticorpo anti os imunomoduladores OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF por 30 minutos. A célula parental não transfectada também foi corada e utilizada como controle negativo. Em seguida, as amostras foram submetidas a citometria de fluxo para comprovar a transfecção do plasmídeo viral.

Como demonstrado na Figura 12, a fim de determinar o título viral para subsequente estabelecimento das linhagens, foram plaqueados seis poços com 5×10^4 células HEK293T em placa de 24 poços para cada vírus e mais 6 poços para controle biológico da citometria, ou seja, poços de células sem vírus e sem marcação com anticorpo e também poços de células sem vírus mas que foram coradas com anticorpo dos vírus a serem investigados, como um isotipo. Após 24 horas, um dos poços controle foi tripsinizado e contado para que fosse sabido o número de células no momento da transdução para posterior cálculo de titulação. Dos seis poços para uma das preparações virais, cada um recebeu um volume de vírus (5µL e 50 µL de vírus não concentrado e mais 4 volumes do vírus ultracentrifugado e diluído 100 vezes; 0.5µL; 5µL; 50µL e 500µL). Todos os poços foram transduzidos com meio D10 e

8µg/mL de polibreno. Passado mais 24 horas, o meio foi trocado e a célula foi incubada novamente até o dia seguinte para posterior citometria de fluxo (NovoCyte/ACEA). A partir dos dados obtidos, a concentração viral foi calculada seguindo a fórmula:

$$\text{Número de células} \times \frac{(\% \text{ cél. Transduzida} - \% \text{ branco})}{100} \times 1000 \times \frac{\text{Diluição viral}}{\text{Vol. Vírus transduzido}}$$

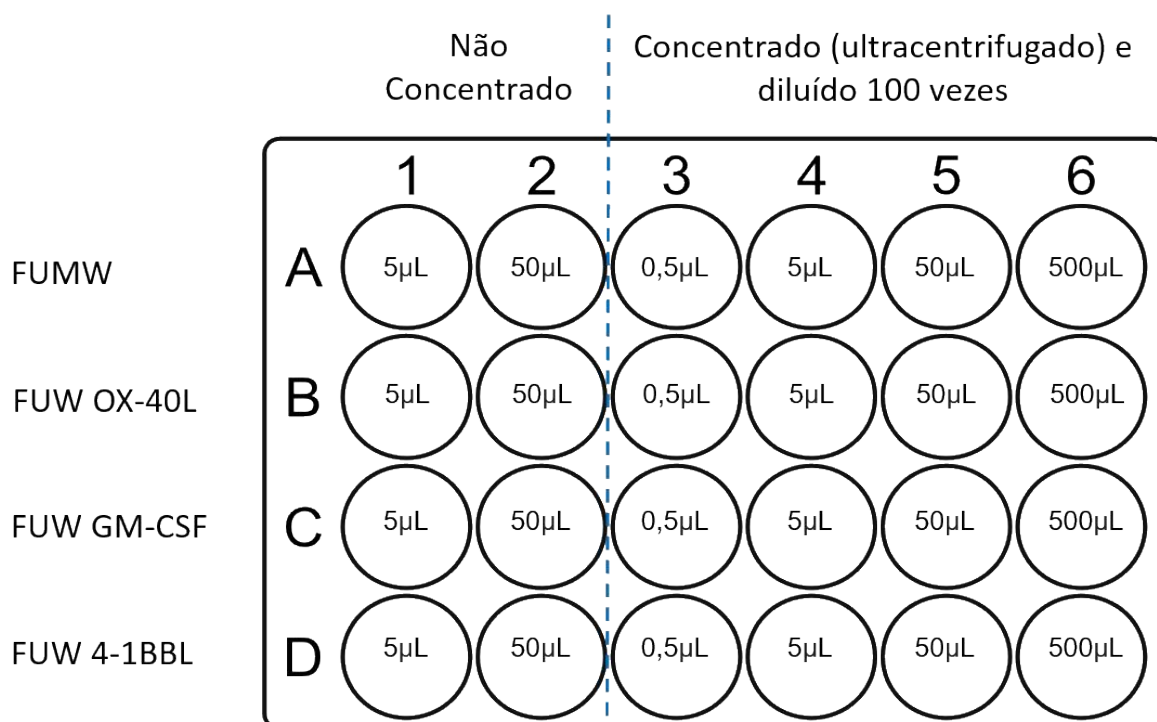


Figura 12 – **Esquema representativo de placa para titulação viral.** As preparações virais são tituladas células HEK293T em seis volumes diferentes (5µL e 50 µL de vírus não concentrado e mais 4 volumes do vírus ultracentrifugado e diluído 100 vezes; 0.5µL; 5µL; 50µL e 500µL) e a eles são adicionados meio DMEM com 10% de soro e 8µg/mL de polibreno. A citometria de fluxo é realizada após 48 horas da transdução e os dados obtidos são utilizados para cálculo do título viral. Fonte: Autoria própria.

3.5 Estabelecimento de células primárias isoladas de tumores de pacientes

O Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM-UNICAMP), selecionou mulheres diagnosticadas com câncer de mama triplo negativo, que tenham assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concedendo amostras ao Biobanco para participarem da pesquisa (CEP 3.691.644 disponível no anexo).

Para critérios de inclusão foram inseridas mulheres com diagnóstico de carcinoma de mama invasivo triplo negativo que não apresentaram resposta após quimioterapia neoadjuvante padrão do hospital CAISM e que por isso, foram

submetidas à cirurgia. Foram excluídas mulheres com antecedentes de outros carcinomas, doenças autoimunes, mulheres que apresentaram resposta à quimioterapia e gestantes.

Durante a avaliação clínico-radiológica, pacientes que apresentaram pouca resposta ao tratamento foram selecionadas para a coleta de material no dia da intervenção cirúrgica. A peça cirúrgica foi recebida pelo patologista que fez a análise macroscópica e no caso de doença residual extensa foi coletado o fragmento para o Biobanco. Parte desse fragmento coletado à fresco foi cedido para o presente projeto.

O tecido contendo células tumorais da paciente foi levado ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)/Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e foi processado no Laboratório de Vetores Virais (LVV). Através de dissociação mecânica com uma lâmina de bisturi, o tecido foi fragmentado em pequenos pedaços e colocado em poços da placade 24 well (Greiner) com meio completo (CM – RPMI 1640 contendo 1% de penicilina/estreptomicina, 10% de soro fetal bovino, 1% de HEPES, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de glutamina e 50 μ M de β -mercaptoetanol).

As células foram tratadas com 50ug/mL de G418 (Gibco) por aproximadamente 3 semanas para eliminar possíveis fibroblastos associados às células primárias do tumor. O meio foi trocado constantemente e aos poucos, substituído por DMEM com 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina e 1% glutamina e as células foram repicadas conforme o crescimento.

3.6 Transdução dos vetores virais para estabelecimento de células imunomodulatórias

Para o estabelecimento das linhagens, foram plaqueadas em placas de 24 poços, 5×10^4 células primárias provenientes dos tumores. Após 24 horas, foram transduzidas com os vetores virais contendo os imunomoduladores ou gene repórter com MOI (*Multiplicity of infection*) de 40 em meio D10 acrescido de 4 μ g/mL de sulfato de protamina por mais 24 horas. Como controle das transduções, foi utilizado a célula MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), uma linhagem de câncer de mama triplo negativo proveniente de um banco de células, a qual foi transduzida em MOI 10. Também testamos a transdução dos imunomoduladores em outras linhagens tumorais que não

fossem provenientes de câncer de mama triplo negativo, como a HT1080 (fibrossarcoma) e PC-3 (próstata), ambas transduzidas pelo mesmo processo.

As células foram subcultivadas conforme crescimento e a expressão dos transgenes foi verificada por citometria de fluxo através de coloração com os respectivos anticorpos; *anti-human* 4-1BBL PE (BD Biosciences), *anti-human* OX-40L PE (BD Biosciences, clone ik-1) e *anti-human* GM-CSF PE (BD Biosciences), sendo que neste último, foi necessário um processo anterior de fixação e permeabilização celular com o kit *Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer* (eBioscience) seguindo o protocolo do fabricante, visto que o GM-CSF possui localização intracelular.

3.7 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade tumoral e o perfil das citocinas inflamatórias IL-2 e IFN- γ por ELISA

Testamos o efeito da imunomodulação dos linfócitos sobre as células tumorais através de PBMCs pré-ativados ou não e incubados por apenas 24 horas com células tumorais expressando os imunomoduladores (células vacinais). Para tanto, no dia 0, PBMCs isolados com Ficoll-Paque foram descongelados e colocados em dois poços da placa de 6 well, ambos com meio CM mas apenas um dos poços recebeu estímulo com 5 μ g/mL de anti-CD3 para pré ativar os linfócitos (Figura 13 A). Após 24 horas, 5x10⁵ células vacinais (célula expressando os imunomoduladores; OX-40L ou 4-1BBL) ou controle (célula parental ou mCherry) foram semeadas em placa de 6 poços com meio CM em duplicata (Figura 13A) e, uma das duplicatas recebeu cerca de 3x10⁶ PBMCs pré-ativados e a outra a mesma quantidade de PBMC sem estímulo (Figura 13 B).

Afim de verificar se os PBMCs (ativado ou não) foram estimulados com as células vacinais ou controle, eles foram coletados do sobrenadante dos poços com as células modificadas após as 24 horas de incubação em estufa. Os PBMCs provenientes de cada célula modificada foram contados separadamente com azul de tripan e plaqueados em ao menos quatro replicatas na placa de 96 well com a célula tumoral não modificada. A proporção utilizada foi de 5 partes de célula efetora (PBMC) para 1 parte de célula tumoral. Essa mistura foi incubada em meio CM por 72 horas à 37°C com 5% de CO₂ (Figura 13 C) e então, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior análise do perfil das citocinas IL-2 e IFN- γ por

ELISA conforme protocolo do fabricante (Invitrogen), enquanto que as células presentes na placa foram imediatamente submetidas a ensaio de citotoxicidade por MTT, conforme protocolo do fabricante. A absorbância foi medida no EnSpire 2300 (Perkin Elmer) ou CLARIOStar (BMG Labtech) e todos os poços foram corrigidos pela subtração da média do branco (MTT + DMEM). A célula tumoral incubada com PBMC proveniente de célula tumoral não modificada (sem imunomodulador ou gene repórter), foi utilizada como normalizados afim de gerar a porcentagem de células viáveis através do seguinte cálculo: $100 \times (\text{absorbância corrigida do poço de interesse} \div \text{absorbância corrigida do normalizador})$. Posteriormente, as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 5.0 com One-way Anova seguido pelo Teste de Múltipla Comparação de Tukey com gráficos contendo a média e desvio padrão para ensaios com PBMCs provenientes de voluntários saudáveis com $p < 0.001$ e $p < 0.05$ para pacientes com câncer de mama triplo negativo.

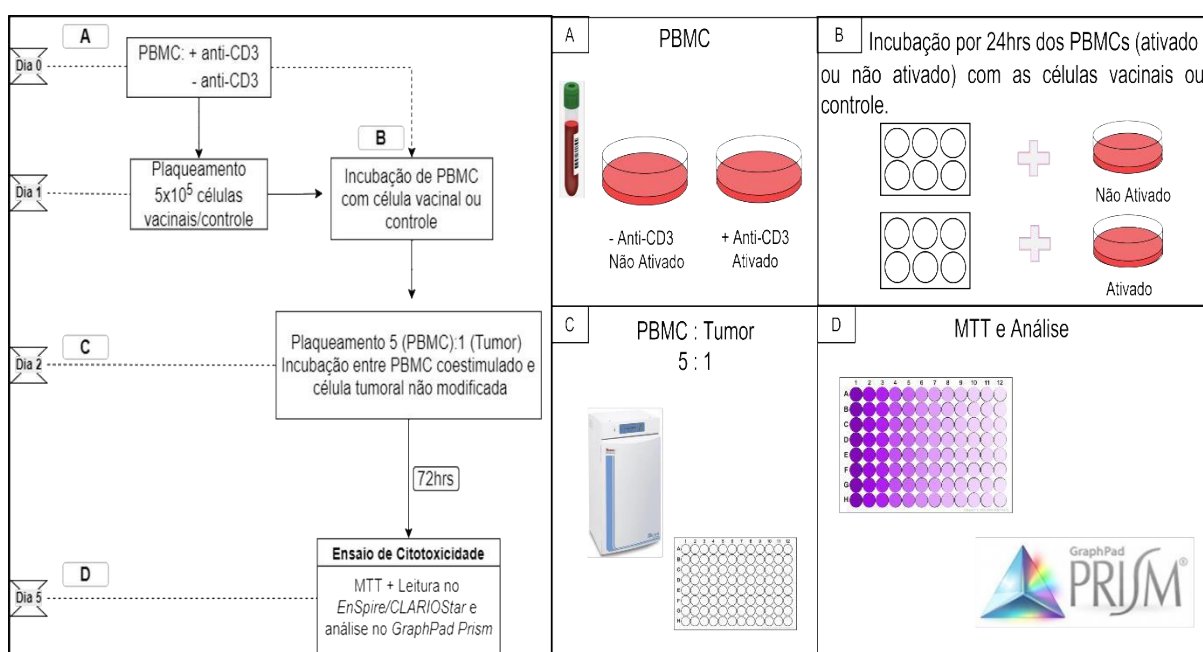


Figura 13 – Fluxo de trabalho e desenho experimental do ensaio de citotoxicidade. Para desenvolver o teste de citotoxicidade, o ensaio foi dividido em quatro tempos. No dia 0, os PBMCs foram descongelados e, metade recebeu estímulo com 5ug de anti-CD3 e a outra metade permaneceu apenas em CM (A). Após 24 horas (dia 1), as células tumorais modificadas para expressar os imunomoduladores (OX-40L ou 4-1BBL) ou controle (célula parental ou FUMW) foram plaqueadas em duplicata com 5×10^5 células por poço da placa de 6 well e então, a elas foi adicionado o PBMC (ativado ou não) (B). No dia 2, os PBMCs de cada vacina ou controle foram recolhidos do sobrenadante das células modificadas, contados e plaqueados separadamente numa placa de 96 well, numa proporção de 5 partes de PBMC previamente coestimulado para 1 parte de tumor (célula tumoral não modificada) (C). A mistura de célula efetora e tumoral foi incubada por 72 horas, seguido por ensaio de MTT para análise de viabilidade celular. A absorbância foi medida no EnSpire 2300 (Perkin Elmer) e no

CLARIOstar (BMG Labtech) e as análises foram feitas no GraphPad Prism (D). CM: Meio Completo (RPMI 1640 contendo 1% de penicilina/estreptomicina, 10% de soro fetal bovino, 1% de HEPES, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de glutamina e 50 μ M de β -mercaptoetanol). Fonte: Autoria própria.

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem dos genes de imunomoduladores a partir de PBMC estimulado com anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 por 72 horas

O primeiro passo para o estabelecimento de vacinas antitumorais consiste em construir vetores para expressão de imunomoduladores. Esses vetores podem então ser utilizados para transfectar células-alvo que irão expressar os transgenes de interesse. Para construção de nossos vetores, inicialmente foi necessário a obtenção de cDNA codificando imunomoduladores. Este cDNA foi gerado a partir de RNA isolado de PBMCs humanos. O sangue de doador saudável foi coletado em tubo de heparina e o PBMC foi separado por gradiente de Ficoll-Paque. A quantidade de células presente no PBMC é variável entre indivíduos mas de forma geral, é constituído de aproximadamente; 15% células B, 70% células T, 5% monócitos e 10% células NK (209). Durante 72 horas, as células isoladas ficaram incubadas em CM com estímulo de 5 μ g/mL de anticorpo anti-CD3 e 5 μ g/mL anti-CD28. Esta estimulação é necessária para indução da expressão dos genes alvo. A Figura 17 demonstra que

o estímulo com o coquetel de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 utilizado funcionou para a expressão dos imunomoduladores de interesse.

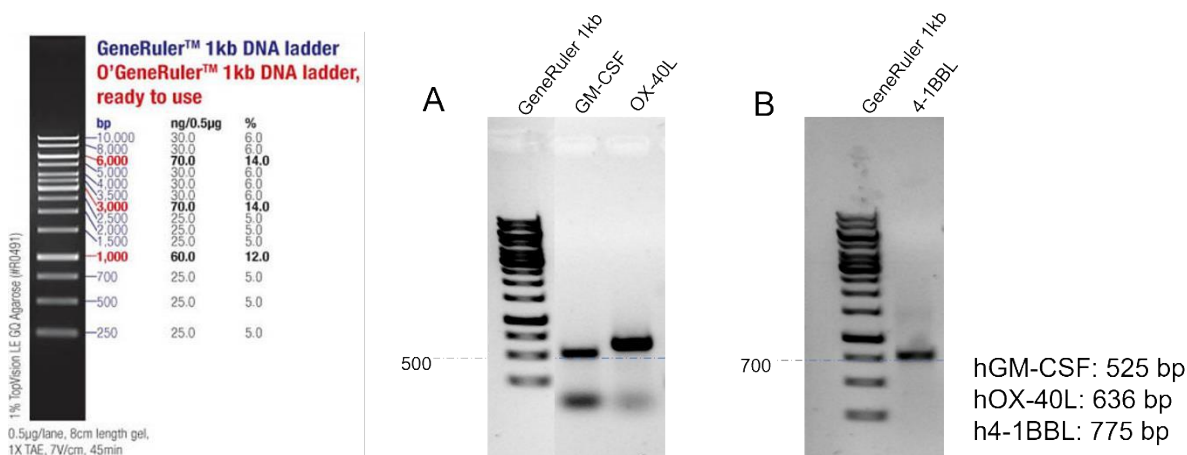


Figura 14 - Amplificação das moléculas imunomodulatórias. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo referente a amplificação das moléculas imunomodulatórias; GM-CSF (525bp), OX-40L (636bp) e 4-1BBL (775bp) a partir de PBMC coletado de doador saudável e estimulado por 72 horas com 5µg/mL de anticorpo anti-CD3 e 5µg/mL anti-CD28 após posterior extração de RNA.

4.2 Construção de vetores virais e titulação

Uma vez obtido o cDNA de nossos genes imunomoduladores, iniciamos a construção de vetores virais recombinantes que possibilitam a transdução de células alvo. A figura 15 trás resultados das clonagens com OX-40L (linha 1, imagens A-C), a linha 2 de 4-1BBL (imagens D-F) e a linha 3 do GM-CSF (imagens G-I). Após amplificação (Figura 14), os imunomoduladores, OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF foram subclonados no vetor pGEM T-Easy e as colônias resultantes foram processadas por miniprep caseira e digeridas com enzimas de restrição que liberassem o inserto do vetor. A seta da figura 15, imagem A; D e G, demonstram os clones positivos para OX-40L (digerido com BamHI), 4-1BBL e GM-CSF (ambos digeridos com EcoRI), respectivamente. Em seguida, os imunomoduladores foram recuperados do pGEM através de enzimas de restrição inseridas nos *primers* de amplificação dos alvos ou através de enzimas presentes no sítio de múltipla clonagem do vetor, purificados do gel de agarose (Figura 15; B, E e H) e por fim, os insertos recuperados foram ligados ao vetor lentiviral final previamente digerido com as mesmas enzimas do imunomodulador correspondente (Figura 16). A ligação foi transformada em bactéria

DH5 α e os clones resultantes foram processados por miniprep caseira, digeridos com enzima de restrição para que liberassem o inserto (Figura 15, C, F e I) e então foram sequenciados. Um clone positivo de cada imunomodulador foi escolhido para a produção lentiviral.

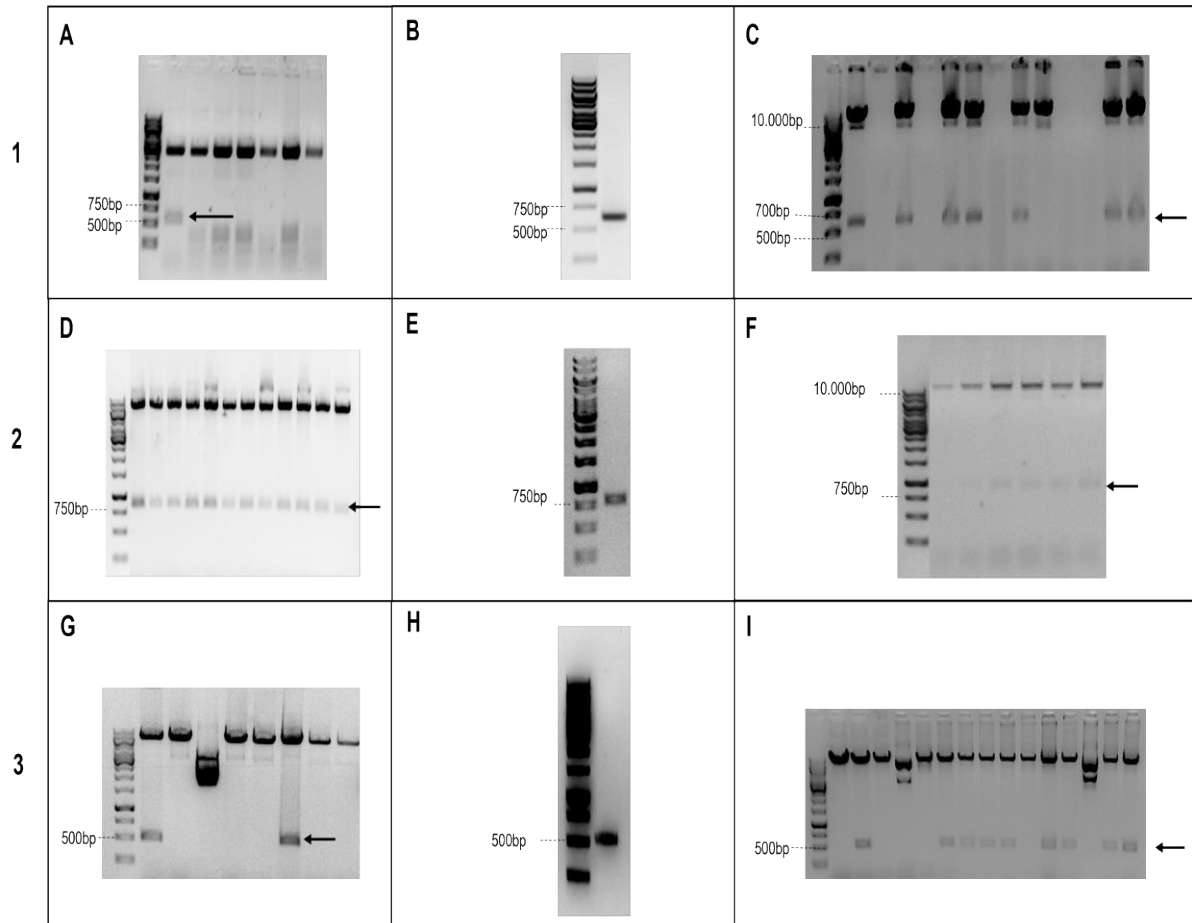


Figura 15 - Etapas de clonagem dos imunomoduladores. As linhas 1, 2 e 3 representam etapas das clonagens com os imunomoduladores OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF, respectivamente. Os imunomoduladores foram obtidos a partir de extração de RNA de PBMC previamente estimulados com 5ug/mL dos anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, os quais foram amplificados por PCR e subclonados no vetor comercial pGEM-T Easy conforme protocolo do fabricante. O produto da ligação entre vetor e inserto, foi transformado em bactéria DH5 α e as colônias resultantes foram processadas por miniprep caseira, digeridas com enzimas de restrição que liberassem o inserto e confirmadas por sequenciamento NGS. As setas pretas das imagens A, D e G demonstram os clones positivos no vetor pGEM em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo das minipreps digeridas com enzima BamHI para OX-40L e EcoRI para 4-1BBL e GM-CSF respectivamente. Em seguida, o imunomodulador foi recuperado do vetor comercial através de digestão com a mesma enzima de restrição utilizada no screening de colônia e purificação do gel de agarose. Após a purificação, o inserto foi submetido a gel de agarose de confirmação (imagens B, E e H). Por último, o inserto purificado foi ligado no vetor lentiviral FUW previamente digerido com a mesma enzima de restrição (BamHI para OX-40L e EcoRI para 4-1BBL e GM-CSF), transformado em bactéria DH5 α e as colônias foram investigadas por miniprep caseira seguida pelo sequenciamento dos clones positivos encontrados após digestão com enzima de restrição (setas pretas das imagens C; F

e I). Após confirmação por sequenciamento, foi escolhido um clone positivo para cada imunomodulador, o qual foi expandido por midiprep (MN) para posterior produção viral.

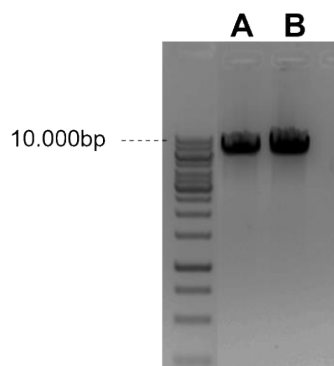


Figura 16 - Vetor lentiviral FUW linearizado e purificado. Para a clonagem do vetor lentiviral contendo os imunomoduladores OX-40L, 4-1BBL e GM-CSF, 30µg do vetor FUW (Addgene) de 9.221bp foi digerido por 2 horas a 37°C com a enzima BamHI e em paralelo, outros 30ug foi digerido através do mesmo processo com a enzima EcoRI. Em seguida, para prevenir a religação do vetor, eles foram tratados com CIP e aplicados em gel de agarose 1%, 100 V por 40 minutos. A banda do vetor linearizado foi recuperada do gel após exposição em transiluminador e purificada com QIAquick Gel Extraction Kit. Para confirmar a digestão e purificação dos vetores, foi realizado um gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos vetores digeridos e purificados. Em A, vetor lentiviral FUW digerido com BamHI para clonagem do OX-40L e em B, vetor lentiviral FUW digerido com enzima EcoRI para clonagem do 4-1BBL e GM-CSF.

Diferentemente das etapas de clonagem dos imunomoduladores, para inserir o gene repórter mCherry no vetor lentiviral FUW e obter o FUMW, foi preciso linearizar o vetor com a enzima XbaI, enquanto que o inserto mCherry; o qual foi retirado do vetor comercial pLV-mCherry, foi digerido com as enzimas Xba-I e Sal-I HF. Devido a incompatibilidade das diferentes enzimas utilizadas, vetor e inserto foram tratados para o preenchimento das extremidades 5' e 3' (*Fill in*) aplicados em gel de agarose, cortado do gel e purificado. Um gel de agarose foi realizado para a confirmação da linearização de 9.2kb do FUW (Figura 17, imagem A1) e da obtenção do mCherry com 711bp (Figura 17, imagem A2). Em seguida, vetor e inserto foram ligados, transformados em bactéria e as colônias foram processadas por miniprep caseira ou PCR de colônia utilizando *primers* do vetor em que se o inserto não estivesse presente, obteríamos apenas uma banda de 522 pares de base (bp) e, caso houvesse inserto, obteríamos um fragmento maior com 1.233bp, conforme apontado pela seta preta na figura 17, B.

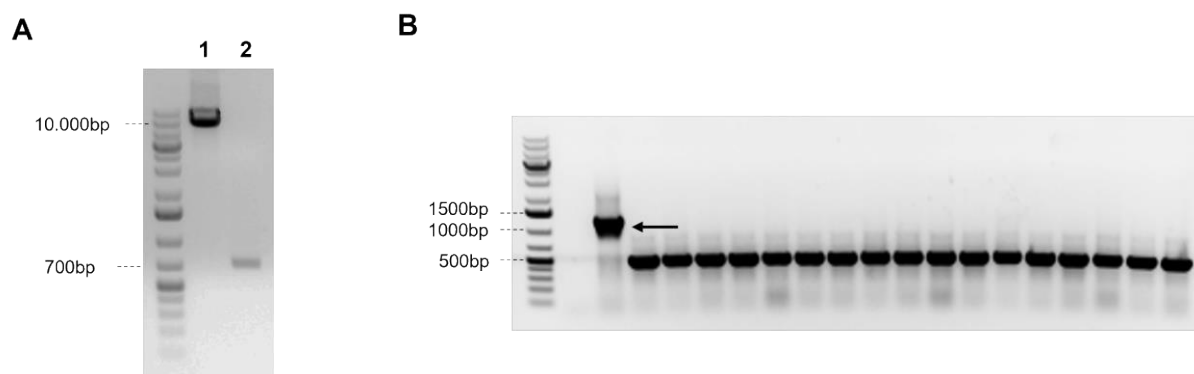


Figura 17 - Clonagem do vetor lentiviral FUMW. Para clonar o gene repórter mCherry no vetor lentiviral FUMW, o inserto foi retirado do vetor comercial pLV-mCherry (Addgene #36084) com as enzimas de restrição Xba-I e Sal-I HF, enquanto que o vetor FUMW foi digerido com XbaI. Devido as diferenças entre as enzimas utilizadas, para que a ligação entre eles fosse possível, ambos tiveram suas extremidades 5' e 3' preenchidas por um processo chamado *Fill in*. Posteriormente, eles foram aplicados em gel de agarose com uma corrente de 100 V por 40 minutos, purificados com kit de extração de gel e, um gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo foi realizado para verificar uma banda linearizada e purificada de 9.2kb do vetor FUMW (A1) e a obtenção de 711 pares de base do inserto mCherry recuperado e purificado (A2). Em seguida, o FUMW e o mCherry foram ligados, transformados em bactéria DH5 α e as colônias resultantes foram processadas por PCR de colônia com primers para amplificação do vetor em que se o inserto não estivesse presente, a banda resultante seria de 522 bp e, caso contrário, o fragmento seria maior, com 1.233bp representando a ligação com o mCherry, conforme apontado pela seta preta em B.

Tais plasmídeos puderam ser utilizados para a produção de vetores lentivirais. Nossos vetores virais recombinantes são defectivos e carecem de informações de replicação (210), desta forma, o vírus defectivo codificará apenas um cassete de expressão contendo o gene de interesse a comando de um promotor constitutivo que se integrará ao genoma da célula hospedeira, podendo se propagar para células filhas em caso de divisão celular.

Para produção de partículas lentivirais carreando os genes de interesse (OX-40L, 4-1BBL, GM-CSF e mCherry), plasmídeos virais foram transfectados em células empacotadoras HEK293T. Após coletar o sobrenadante contendo as partículas virais, verificamos através de citometria de fluxo que as células produtoras expressavam os plasmídeos de interesse após transfecção, demonstrando a correta clonagem dos transgenes (Figura 18).

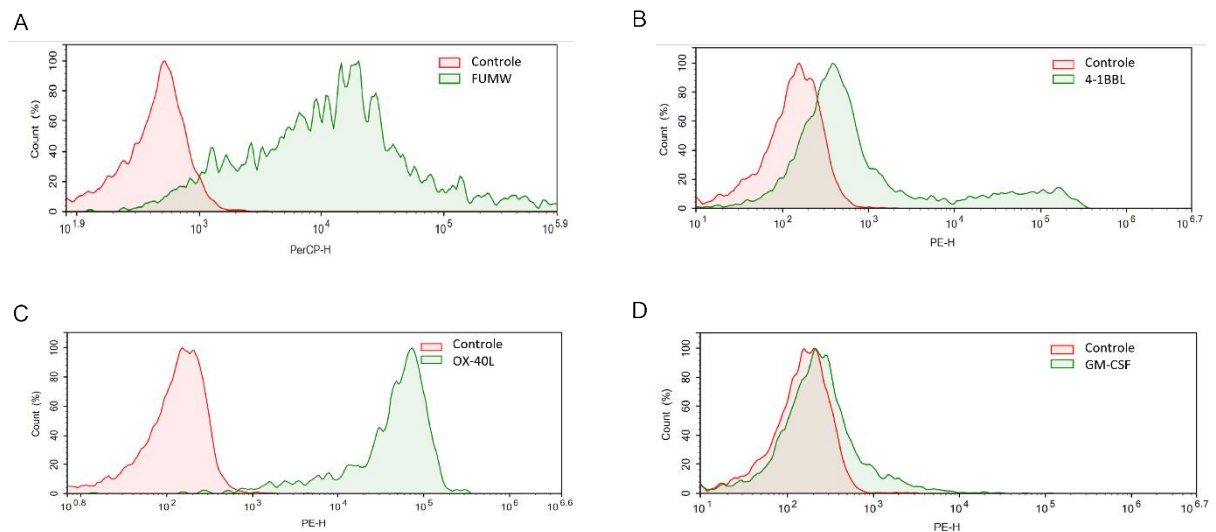


Figura 18 - Histograma de HEK293T transfectada com vetores lentivirais. Citometria de fluxo de células HEK293T transfectada pelo método de fosfato de cálcio para produção de vetor lentiviral carreando os imunomoduladores (OX-40L; GM-CSF e 4-1BBL) ou o gene repórter mCherry. Após transfecção e coleta dos vetores virais, as células produtoras do FUMW foram coletadas com PBS 1X, enquanto que as células produtoras dos vírus carreando os imunomoduladores foram coradas com os respectivos anticorpos e depois, todas foram adquiridas no citômetro de fluxo no canal de PerCP para o mCherry (vírus FUMW – A) e no canal do PE para os imunomoduladores 4-1BBL (B), OX-40L (C) e GM-CSF (D). Nos histogramas, o pico vermelho é o controle biológico, ou seja, a célula parental (sem expressão do imunomodulador ou gene repórter) corada com o anticorpo de interesse e o pico em verde, são as células produtoras dos genes alvos coradas com o anticorpo e, no caso do vetor FUMW; a fluorescência do próprio gene repórter. O deslocamento à direita das curvas em verde em relação à vermelha (controle negativo), representa a intensidade capturada dos transgenes analisados e portanto, o sucesso de transfecção do vetor alvo.

Da mesma maneira, células HEK293T foram transduzidas conforme descrito no item 3.4 do presente projeto para determinar o título da produção viral e para posterior estabelecimento das linhagens celulares. Construímos um total de 4 vetores plasmídeos e os respectivos mapas estão apresentados nos apêndices de 1 a 4.

4.3 Transdução dos vetores virais para estabelecimento de linhagens imunomodulatórias

Obtivemos seis pacientes com câncer de mama triplo negativo após quimioterapia neoadjuvante que entraram no presente estudo e destas, foi possível coletar amostra de biópsia de apenas cinco. Todos os fragmentos foram coletados em ambiente não estéril e apresentavam alta composição de tecido necrosado em diferentes intensidades. Conforme demonstrado no quadro 5, a técnica de remoção do tecido na rotina cirúrgica, bem como o processo de biópsia na análise patológica e

a condição de necrose do tecido removido dificultam a obtenção de células primárias livres de contaminantes, como fungos e bactérias. Sob tais condições, foi possível obter células cultiváveis apenas da primeira paciente, enquanto que as células das pacientes 3, 5 e 6, embora houvessem aderido à placa de cultivo, foram contaminadas por fungo ou bactéria. De todos os 5 tecidos coletados, o único a não prosperar foi o da paciente 2.

É possível notar ainda no quadro 5 que além do tecido tumoral também foram coletados os PBMCs da maioria das pacientes que participaram deste estudo. Contudo, a obtenção de um número satisfatório deste tipo celular para o presente estudo foi de relativa complexidade. Devido ao tratamento a qual são submetidas em decorrência de seu tumor, as veias das pacientes se tornam mais finas e, embora o sangue tenha sido coletado por enfermeiras da área oncológica, a quantidade de sangue retirada e PBMC obtido foi suficiente para um único ensaio e, no caso da paciente 6, insuficiente.

Quadro 5 - Seis pacientes com câncer de mama triplo negativo após quimioterapia neoadjuvante entraram no estudo. Coletado em ambiente não estéril, foi possível obter fragmento proveniente da biópsia de apenas cinco pacientes, pois uma não apresentava mais tumor. Os cinco fragmentos apresentavam pontos de necrose e fibrose em diferentes níveis e um deles (paciente #6) obteve diagnóstico inconclusivo. Todos os tecidos foram processados por dissociação mecânica afim de isolar as células tumorais e modificá-las para gerar vacinas. Apenas o tecido da primeira paciente foi cultivado com sucesso e sem contaminações.

Paciente #	Observação da patologista sobre a condição do tecido	PBMC	Resultado do cultivo do tecido tumoral
1	Necrosado	Coletado	Cultivado
2	Muito necrosado	Não coletado	Não cresceu
3		Coletado	Contaminou (Fungo)
4	Sem tumor	Não coletado	_____
5		Coletado	Contaminou (Bactéria)
6	Inconclusivo/Fibroso	Insuficiente	Contaminou (Bactéria)

Para gerar as vacinas antitumorais, células imortalizadas de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231 foram utilizadas como controle de transdução dos transgenes de interesse. Após transdução, a expressão do transgene foi testada via citometria de fluxo. Foi possível estabelecer linhagens MDA expressando todos os imunomoduladores e gene repórter de interesse (Figura 19). O mesmo teste foi

realizado com células de fibrossarcoma HT1080 e células de câncer de próstata PC-3.

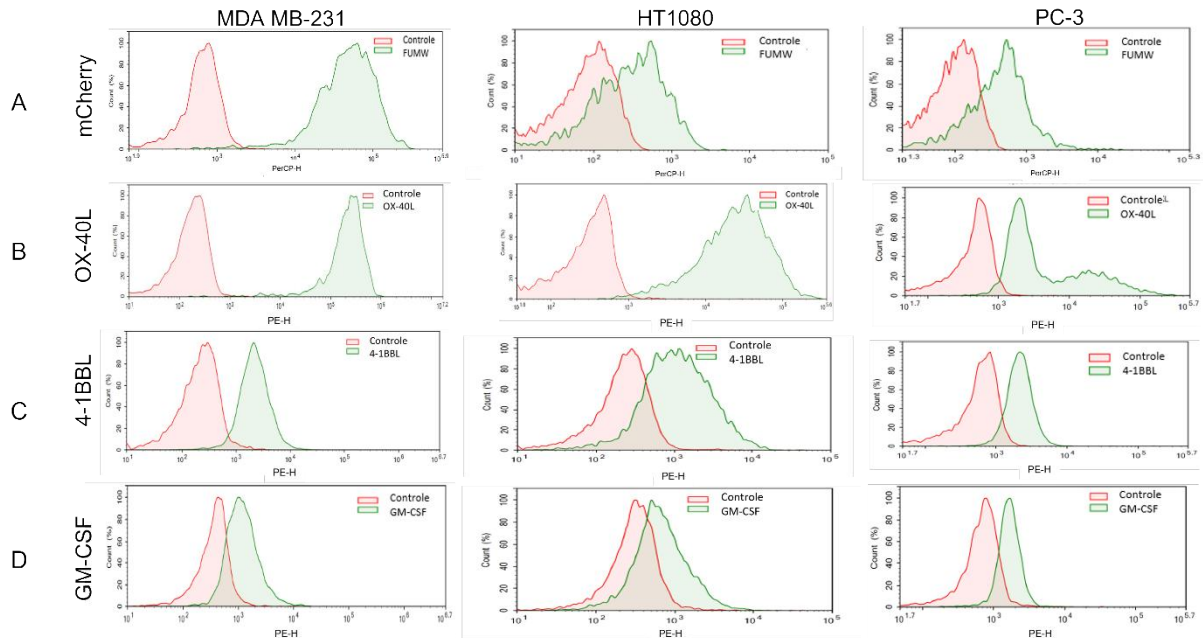


Figura 19 - Transdução de células MDA-MB-231, HT1080 e PC-3 com vetores lentivirais. As linhagens de célula foram transduzidas com pelos vetores lentivirais FUMW (A), FUW OX-40L (B), FUW GM-CSF (C) e FUW 4-1BBL (D). As curvas em vermelho representam o controle negativo; células parentais, no caso do item A e, para os demais, células parentais coradas com os respectivos anticorpos. As curvas em verde representam as células transduzidas com os genes de interesse e seu deslocamento à direita representa a intensidade de fluorescência da expressão do vetor alvo.

A mesma metodologia de transdução foi aplicada às células primárias provenientes de amostra da biópsia da paciente #1, entretanto, foram transduzidas 40 partículas virais por célula com 4µg/mL de sulfato de protamina em meio D10. Conforme demonstrado na figura 20, foram geradas apenas três linhagens com o tumor da paciente #1, sendo elas, OX-40L, 4-1BBL e FUMW. Não foi possível estabelecer a linhagem contendo o GM-CSF, uma vez que as células tumorais primárias morriam após 48 a 72 horas da transdução com o vírus contendo este imunomodulador.

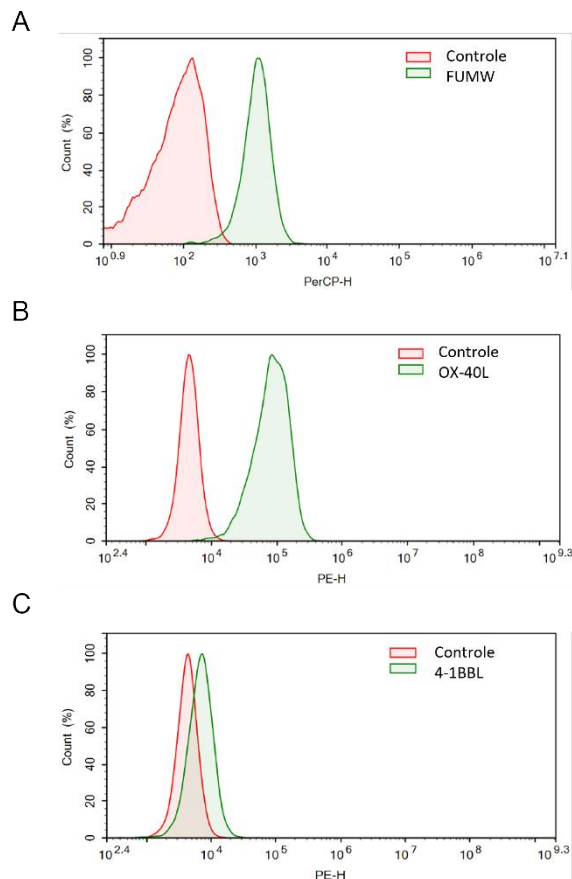


Figura 20 - **Estabelecimento de linhagens a partir de célula primária da paciente #1.** Histograma de célula primária proveniente de câncer de mama triplo negativo humano transduzidas com lentivírus recombinante em MOI 40 com FUMW (A), FUW hOX-40L (B) e FUW h4-1BBL (C). Curvas em vermelho são células parentais e curva em verde são células coradas com anticorpos expressando transgenes. Nos gráficos B e C foram utilizados anticorpos marcados com fluoróforo PE.

4.4.1 Vacinas imunomodulatórias induzem resposta antitumoral mediada por linfócitos de indivíduos saudáveis

A célula tumoral da paciente 1 foi modificada, como descrito acima, afim de gerar as linhagens vacinais. Para testar a capacidade das vacinas em estimular a resposta antitumoral via linfócitos T, foram realizados ensaios *in vitro* com as células tumorais da paciente #1 em conjunto com PBMCs pré ativados de doadores saudáveis ou das pacientes com câncer de mama triplo negativo - foram utilizados os PBMCs de todas as pacientes com tumor, mesmo daquelas que não conseguimos isolar e cultivar as células tumorais (paciente #3 e #5) (Figura 21 A).

Os ensaios utilizando PBMCs de voluntários saudáveis ou das pacientes sem pré ativação não funcionaram (dados não mostrados), por outro lado, ao utilizar o

anticorpo anti-CD3 para tal finalidade, pudemos notar na figura 21 B que as células vacinais expressando os imunomoduladores conseguem elevar a resposta antitumoral através da coestimulação de linfócitos T. A média das replicatas em três experimentos independentes (Figura 21 B1 a B3) demonstraram redução da viabilidade das células tumorais incubadas com PBMCs pré-ativados estimulados com as vacinas reduziram, resultando em diferença estatística com $p < 0.001$ das células controle (tumoral não modificada ou modificada para expressão de gene repórter não coestimulador). As vacinas de OX-40L e a mistura mostraram maior imunomodulação do que apenas a vacina com 4-1BBL.

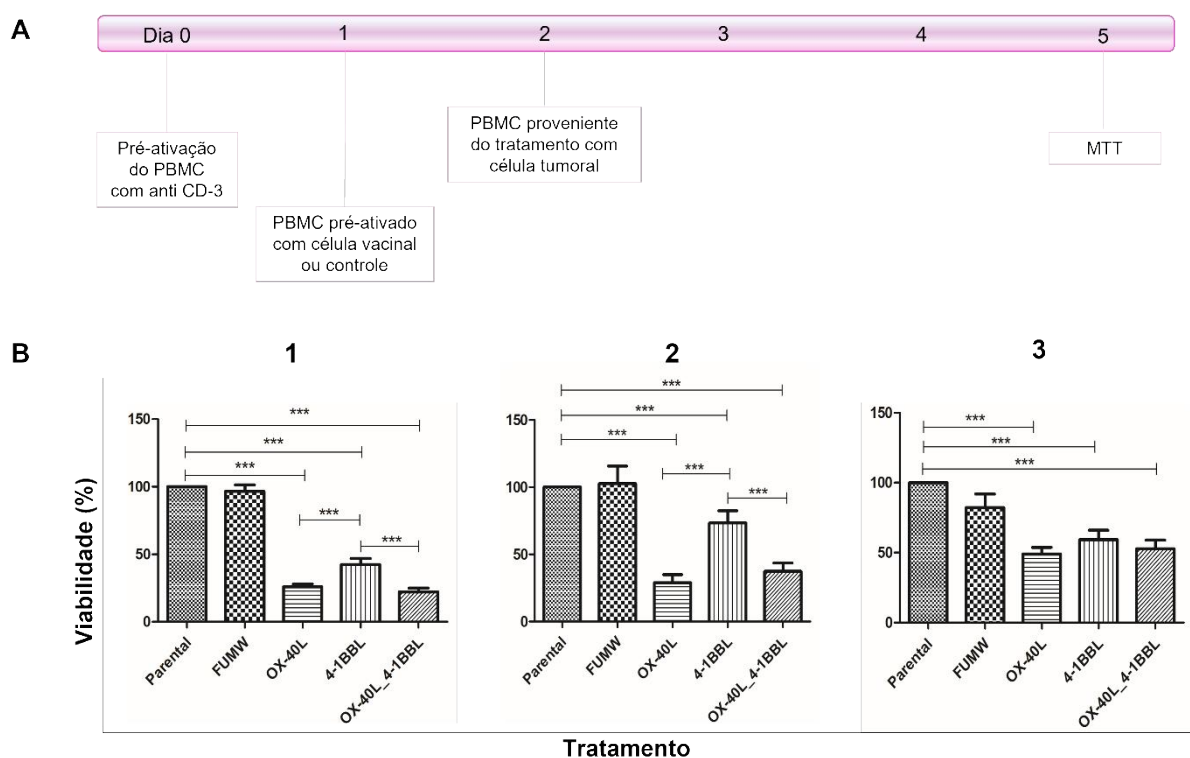


Figura 21 - Ensaio de Ccoestimulação de PBMC pré-ativado de voluntário saudável mediada por célula tumoral modificada para expressão de OX-40L e/ou 4-1BBL. Na imagem A, uma linha do tempo ilustra o ensaio realizado em que células tumorais de pacientes portadores de câncer de mama triplo negativo após quimioterapia neoadjuvante foram coletadas, isoladas e modificadas para expressarem moléculas coestimuladoras de células T; OX-40L, 4-1BBL ou ambas. Este ensaio, consiste em pré-ativar PBMCs de voluntários saudáveis com 5µg do anticorpo anti-CD3 por 24 horas e em seguida, incubá-los por mais 24 horas com as respectivas vacinas. Tais PBMCs foram recuperados e cultivados em conjunto com as células tumorais não modificadas numa proporção de 5:1, respectivamente, durante 72 horas até posterior ensaio de MTT. A absorbância foi medida no Enspire e as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism versão 5.0 pelo Teste de Múltipla Comparação de Tukey. B. Três ensaios independentes (B1 à B3) foram realizados e o mesmo perfil de coestimulação foi observado; todas as células vacinais testadas coestimularam os PBMCs, elevaram a resposta antitumoral e reduziram significativamente a viabilidade das células tumorais quando comparado com uma célula tumoral não modificada

ou modificada para expressar apenas um gene repórter (não imunomodulador). Análise pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey com média e desvio padrão e significância estatística de $p < 0.001$. PBMC: Células mononucleares de sangue periférico.

4.4.2 Vacinas imunomodulatórias induzem resposta antitumoral mediada por linfócitos de indivíduos com TNBC

O mesmo ensaio descrito acima foi realizado com o PBMC das pacientes #1, #3 e #5 conforme gráficos da figura 22. A paciente 1 (Figura 22, A) apresentou redução significativa com $p < 0.05$ quando seus PBMCs foram expostos com a vacina contendo a mistura entre OX-40L e 4-1BBL, reduzindo a viabilidade das células tumorais em aproximadamente 30%. O PBMC da paciente #3 (Figura 22, B) respondeu significativamente com as vacinas de 4-1BBL e também com a mistura, apresentando redução de 23,5% e 34,5% das células tumorais respectivamente. Por outro lado, foram observados resultados promissores com todos os modelos vacinais com as células do sangue periférico da paciente #5, com redução da viabilidade das células tumorais em 36,3% quando estimulada por OX-40L, 31,4% com 4-1BBL e 43,5% com a mistura (Figura 22, C).

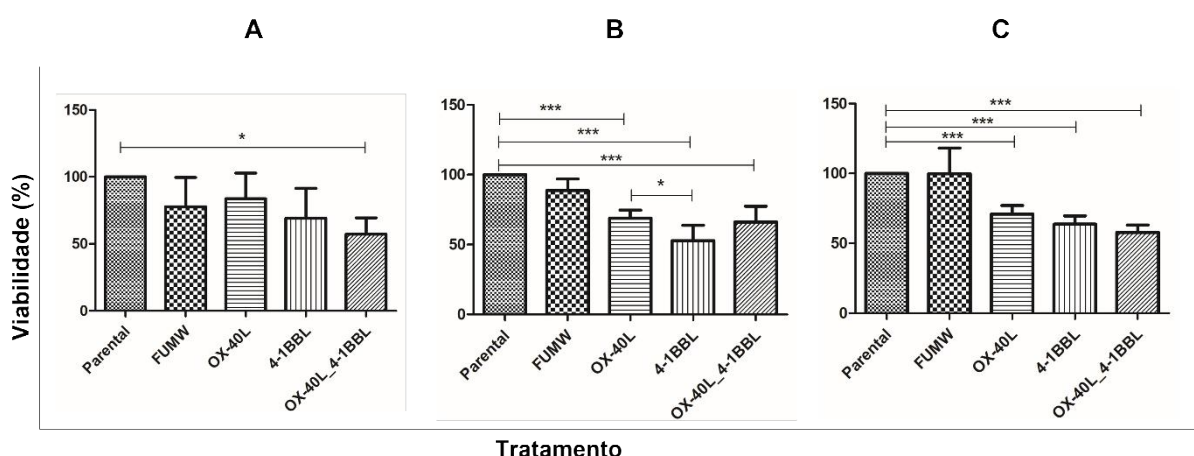


Figura 22 - Imunomoduladores OX-40L e 4-1BBL potencializam resposta antitumoral em pacientes com câncer de mama triplo negativo. Três pacientes com câncer de mama triplo negativo tiveram suas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) coletadas e isoladas através de gradiente de densidade com Ficoll-Paque após quimioterapia neoadjuvante. Tais PBMCs foram pré-ativados com 5 μ g do anticorpo anti-CD3 por 24 horas e depois expostos a células tumorais não modificadas (controle) e modificadas para expressarem o gene repórter mCherry (FUMW) e as moléculas coestimuladoras OX-40L e 4-1BBL. Posteriormente, os PBMCs coestimulados foram recuperados e incubados com células tumorais primárias não modificadas da paciente #1 e após 72 horas, foi realizado o ensaio de

MTT afim de analisar a capacidade das células vacinais em imunomodular linfócitos T e potencializar a resposta antitumoral. A viabilidade das células tumorais foi medida pela absorbância no CLARIOStar e as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism pelo método do One-Way Anova, seguido pelo Teste de múltipla comparação de Tukey com gráficos contendo média e desvio padrão. Apenas a vacina contendo a mistura de OX-40L e 4-1BBL coestimulou significativamente o PBMC da paciente #1 (A), enquanto que com a paciente #3, além da mistura, esse benefício também foi observado com a vacina contendo 4-1BBL (B). A paciente #5 obteve os resultados mais promissores, com aumento da resposta antitumoral em decorrência da coestimulação mediada pelas três vacinas testadas, sobretudo com a mistura (C). Gráfico de experimentos individuais realizados em quadruplicata com $p < 0.05$.

4.4.3 Estudo da produção de citocinas nos ensaios imunomodulatórios com PBMC de indivíduos saudáveis e de pacientes com TNBC

As citocinas desempenham um importante papel na comunicação celular e sua secreção desencadeia uma cascata de sinalizações que podem estimular as células efectoras do sistema imune, como no caso das citocinas inflamatórias IL-2 e IFN- γ . A fim de compreender como nossas vacinas atuam na resposta mediada por células T, selecionamos algumas das condições apresentadas acima para análise do perfil de expressão das citocinas IL-2 e IFN- γ no sobrenadante resultante do ensaio de viabilidade de doador saudável e das pacientes #1 e #3 através de ELISA. Conforme ilustrado pela figura 23, o PBMC de voluntário saudável demonstrou elevada redução das células tumorais com os três tratamentos vacinais testados, assim como níveis de IFN- γ significativamente elevados para todas elas, entretanto, no caso da citocina IL-2, apenas a combinação vacinal de OX-40L com 4-1BBL foi estatisticamente relevante (Figura 23 A).

O ELISA também foi realizado com o PBMC da paciente #1, a qual expressou atividade antitumoral apenas com a mistura vacinal, acompanhada por níveis mais elevados de IL-2 e IFN- γ para o mesmo tratamento. Embora sem resultado estatístico significativo com as outras vacinas testadas, concentrações elevadas de IL-2 também foram encontradas para a vacina com 4-1BBL e, os três tratamentos resultaram em IFN- γ superior ao controle não vacinal (Figura 23 B). Por outro lado, embora a paciente #3 tenha apresentado resposta com os três tratamentos vacinais, não foram visualizados níveis elevados de IL-2 para nenhum deles, enquanto que as concentrações de IFN- γ foram proeminentes em todas as condições vacinais, sobretudo para a combinação e também com 4-1BBL (Figura 23 C).

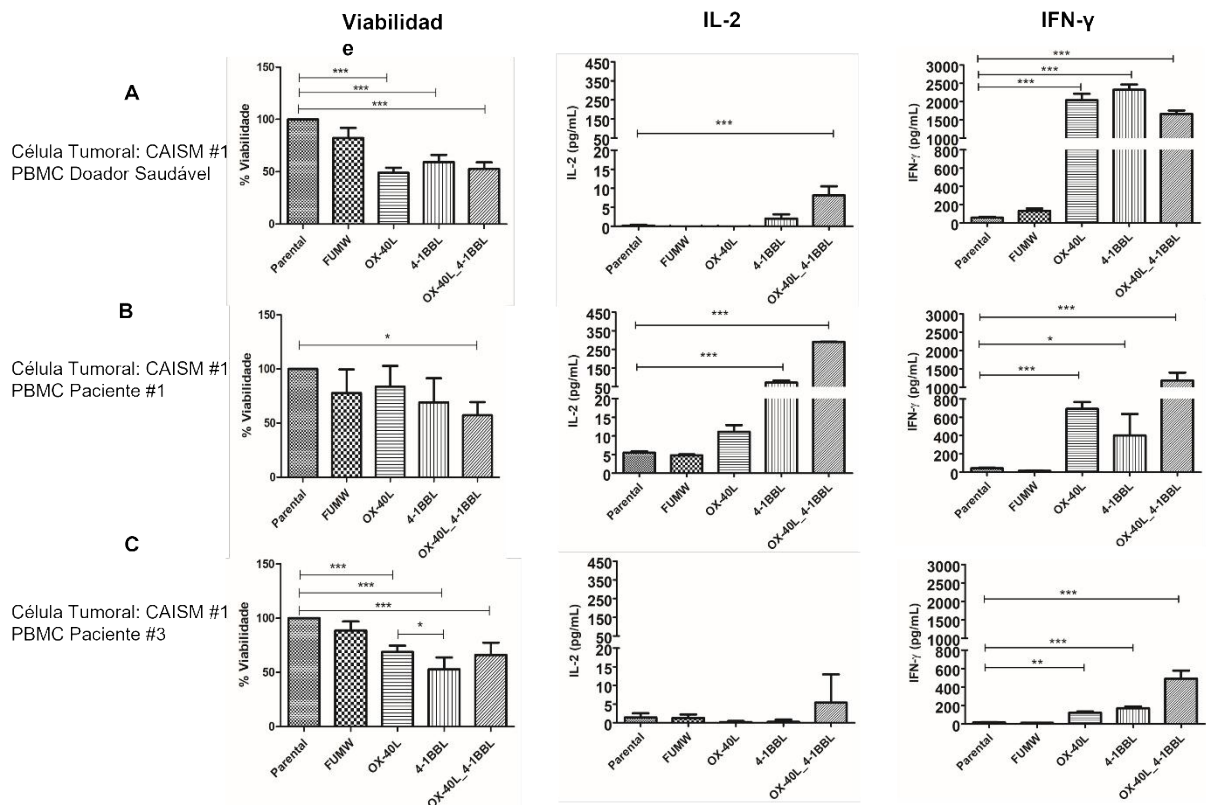


Figura 23 - **Atividade antitumoral versus perfil de citocinas inflamatórias IL-2 e IFN-γ.** O sobrenadante proveniente da incubação de PBMCs expostos as células vacinais ou controle e incubados com as células tumorais foi coletado e através de ELISA, foi realizado o perfil de expressão das citocinas inflamatórias IL-2 e IFN-γ com as células de três indivíduos distintos. **A.** O PBMC de doador saudável foi eficientemente coestimulado com todos os modelos vacinais testados (OX-40L; 4-1BBL e OX-40L + 4-1BBL) e seu perfil de IFN-γ também foi elevado para os três, contudo, apenas a combinação vacinal demonstrou níveis significativos de IL-2. **B.** A paciente #1 apresentou boa resposta antitumoral com a mistura de OX-40L + 4-1BBL e níveis elevados de IL-2 para 4-1BBL e dupla mas os aumentos de IFN-γ foram significativos em todos os tratamentos. **C.** O perfil encontrado com a paciente #3 foi muito semelhante ao do voluntário saudável; todas as vacinas apresentaram redução significativa das células tumorais com elevadas concentrações de IFN-γ em todas elas, porém, os níveis de IL-2 foram baixos em todas as situações testadas. As análises estatísticas dos gráficos de viabilidade foram feitas pelo método do One-Way Anova, seguido pelo Teste de múltipla comparação de Tukey com média e desvio padrão das replicatas com $p < 0.001$ para voluntários saudáveis (A) e $p < 0.05$ para portadores de TNBC (B e C), assim como todos os gráficos de dosagem de citocinas para IL-2 e IFN-γ.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho iniciou com a construção de vetores plasmidiais codificando imunomoduladores. Efetuamos a amplificação de genes humanos a partir de células primárias e obtivemos sucesso nas clonagens, conforme relatamos em nossos resultados. Os plasmídios codificando transgenes foram utilizados para geração de partículas virais recombinantes. Essas preparações foram tituladas e caracterizadas quanto a expressão dos transgenes humanos em cultura de células MDA-MB-231, HT1080 e PC-3, demonstrando sucesso das construções.

Por meio de colaboração com uma equipe do CAISM Unicamp, coordenada pela prof. Dra. Sophie Derchain, obtivemos acesso a uma amostra de biopsia de tecido tumoral, com a qual pudemos estabelecer uma linhagem TNBC. O isolamento das células primárias foi efetuado através de dissociação mecânica, a qual se estabilizou após 2 meses, originando a linhagem CAISM #1. Esta linhagem pôde ser transduzida com vetores lentivirais para a expressão do gene repórter mCherry e das moléculas imunomodulatórias OX-40L e 4-1BBL, mas não com GM-CSF, já que as células morriam durante a transdução com esta condição. Ainda não temos respostas para esta observação, uma vez que outras linhagens foram eficientemente geradas com o vetor FUW GM-CSF. Consideramos interessante efetuar ensaios de espectrometria de massas utilizando células primárias parentais e células transduzidas para ampliarmos nossa compreensão.

Uma vez que obtivemos linhagens tumorais primárias transduzidas com vetores de 4-1BBL e OX-40L, efetuamos ensaios de imunomodulação *in vitro*, utilizando PBMCs de doadores saudáveis e de pacientes portadoras do câncer de mama triplo negativo. Nossos dados demonstram que as vacinas testadas como monoterapia, ou seja, apenas OX-40L ou 4-1BBL podem potencializar a resposta antitumoral em voluntários saudáveis e em duas das três pacientes testadas (paciente #3 e #5), sendo que observamos um padrão de resposta ainda mais exacerbada quando utilizamos a combinação vacinal entre OX-40L e 4-1BBL em todos os indivíduos testados. Nos ensaios *in vitro*, incubamos as linhagens vacinais com PBMCs e coletamos também o sobrenadante da cultura para análise de citocinas. Efetuamos ensaios de ELISA para medir as citocinas IL-2 e IFN- γ , que tem grande importância na atividade antitumoral mediada por linfócitos T (211). Os resultados observados nos ensaios de ELISA

complementam as informações dos ensaios *in vitro*, em que medimos a viabilidade de células tumorais incubadas com PBMCs ativados por vacinas antitumorais.

Em nossos resultados, observamos vantagens de combinar os imunomoduladores OX-40L e 4-1BBL, em comparação à monoterapias. Isto corrobora resultados anteriormente observados por nosso grupo com vacinas antitumorais em modelos animais (207). A associação dos imunomoduladores traz a vantagem de atuar em duas linhas diferentes de coestimulação, pois a interação entre a molécula de OX-40 com seu ligante desencadeia a expressão de proteínas anti apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xL, prolongando a sobrevivência celular e, essa relação também desencadeia a liberação de citocinas pró inflamatórias, como IL-2 e IFN- γ , estimulando a sobrevivência e proliferação, principalmente de linfócitos T CD4⁺ de perfil Th1, induzindo resposta imune mediada por células T CD4, T CD8 e macrófagos, por exemplo (90, 212). A ligação 4-1BB/4-1BBL também promove imunidade mediada por células através da secreção de citocinas de perfil Th1, como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , bem como estímulo à células T CD4⁺ mas, principalmente em células T CD8 de memória e com capacidade efetora, viabilizando a morte celular por apoptose através da liberação de granzimas e perforinas (76, 213).

Em nossos experimentos *in vitro*, observamos que utilizando PBMCs de voluntários sadios, 66.66% dos ensaios demonstraram resultados mais promissores com as vacinas de OX-40L em monoterapia ou quando associado à 4-1BBL, sem diferenças estatísticas significativas entre elas e nos outros 33.33%, todas as vacinas foram igualmente relevantes (Figura 21). Ao utilizarmos PBMCs isolados de pacientes com TNBC, observamos um aumento nos níveis de citocinas correspondente ao fortalecimento da resposta imune antitumoral indicado pela citotoxicidade antitumoral mediada pelos PBMCs pré-ativados com vacinas antitumorais. Uma observação interessante foi obtida com os PBMCs da paciente #1, para medida de IL-2, que foi bem acima do nível observado com PBMCs de outros doadores. A paciente #1 doou o PBMC#1 e também as células para o estabelecimento da linhagem tumoral CAISM #1 utilizada em todos os ensaios *in vitro*. Esse nível aumentado de IL-2 pode refletir a pré-exposição aos antígenos tumorais, que no entanto não é suficiente para modular a resposta antitumoral. Dessa forma, ao administrarmos as vacinas, é possível verificar o aumento no IFN- γ e indução de resposta antitumoral *in vitro* (Figura 23 B). Essa observação é muito relevante no ponto de vista de uma perspectiva terapêutica, em que a vacina antitumoral imunomodulatória potencializa a resposta antitumoral em

PBMC de paciente TNBC. A paciente #3 também apresentou níveis significativos de IFN- γ no sobrenadante de PBMCs estimulados, contudo, ela obteve ótimos resultados em todas as condições, sendo a vacina com 4-1BBL a mais responsiva das 3 (Figura 23 C), enquanto que o PBMC da paciente #5 foi responsivo equitativamente em todas as condições (Figura 22 C). É interessante lembrar que as pacientes #3 e #5 podem ter apresentado melhores respostas devido a incompatibilidade de suas moléculas MHC com as células tumorais CAISM #1, uma vez que PBMCs e células tumorais provêm de indivíduos diferentes, potencializando-se a resposta imunológica observada. Durante a maturação no timo, os genes dos receptores de células T (TCR) dos linfócitos T são rearranjados aleatoriamente, gerando populações celulares com um TCR único e de alta especificidade tornando-os responsivos aos antígenos apresentados via moléculas MHC (214).

Observamos em nossos ensaios que os PBMCs de pessoas saudáveis parecem ser mais responsivos a imunoterapia testada do que as células provenientes das pacientes TNBC. Além da quimioterapia neoadjuvante, as pacientes podem ter passado por outros procedimentos terapêuticos desconhecidos por nós e que poderiam atuar em maior imunossupressão e consequente diminuição da resposta contra o tumor. É válido ressaltar que embora os dados estatísticos demonstrem que todas as vacinas utilizadas conseguiram elevar a atividade antitumoral em PBMCs de voluntários sadios e de mulheres com câncer de mama triplo negativo após quimioterapia neoadjuvante, é perceptível a diferença da resposta entre esses dois grupos testados. Neste sentido, achamos muito interessante explorar aspectos associados a anergia de células T, com caracterização fenotípica de nossos PBMCs, ensaios *in vitro* para outras estratégias com alvo no fortalecimento de células linfocitárias, como a utilização de células T CAR (215, 216), que também poderia ser apresentada como possibilidade terapêutica, em combinação às nossas vacinas antitumorais, com alvo de potencializar ainda mais a resposta imune antitumoral.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente projeto demonstram que vacinas antitumorais provenientes de células primárias de câncer de mama triplo negativo modificadas para expressarem os imunomoduladores de OX-40L e/ou 4-1BBL são capazes de aumentar a atividade antitumoral *in vitro* em PBMCs pré ativados de voluntários saudáveis e também de PBMCs isolados de pacientes com TNBC recidivo após quimioterapia neoadjuvante. Foi consistente a observação que em todos os indivíduos testados, a combinação vacinal de 4-1BBL com OX-40L induziu estimulação antitumoral, de forma mais acentuada que em condições de monoterapia. Esses resultados sugerem que a tecnologia de vacinas antitumorais, contendo elementos coestimulatórios, apresenta potencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de TNBC.

7. REFERÊNCIAS

1. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 2011;117(5):1097-102.
2. Lukong KE. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA clinical*. 2017;7:64-77.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
4. Skuse A. Constructions of Cancer in Early Modern England: Ravenous Natures. 2015.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
6. Stumpf CR, Moreno MV, Olshen AB, Taylor BS, Ruggero D. The translational landscape of the mammalian cell cycle. *Mol Cell*. 2013;52(4):574-82.
7. Watson M, Holman DM, Maguire-Eisen M. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. *Semin Oncol Nurs*. 2016;32(3):241-54.
8. Thomson CA, Thompson PA. HEALTHY LIFESTYLE AND CANCER PREVENTION. *ACSM's Health & Fitness Journal*. 2008;12(3):18-26.
9. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*. 2010;19(5):698-711.
10. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*. 2012;22(1):9-20.
11. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):59.
12. Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med*. 2013;19(6):747-52.
13. Segal NH, Parsons DW, Peggs KS, Velculescu V, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res*. 2008;68(3):889-92.
14. Jeong HM, Kwon MJ, Shin YK. Overexpression of Cancer-Associated Genes via Epigenetic Derepression Mechanisms in Gynecologic Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:12.
15. Okarvi SM, AlJammaz I. Development of the Tumor-Specific Antigen-Derived Synthetic Peptides as Potential Candidates for Targeting Breast and Other Possible Human Carcinomas. *Molecules*. 2019;24(17).
16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
17. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
18. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):24-37.
19. ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(12):a016873.
20. Zhan Y, Carrington EM, Zhang Y, Heinzl S, Lew AM. Life and Death of Activated T Cells: How Are They Different from Naïve T Cells? *Front Immunol*. 2017;8:1809.
21. Franciszkiewicz K, Boissonnas A, Boutet M, Combadière C, Mami-Chouaib F. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res*. 2012;72(24):6325-32.
22. Maimela NR, Liu S, Zhang Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1-13.
23. Hodge G, Barnawi J, Jurisevic C, Moffat D, Holmes M, Reynolds PN, et al. Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)- γ by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells. *Clin Exp Immunol*. 2014;178(1):79-85.

24. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
25. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*. 2017;8(4):7175-80.
26. Campoli M, Ferrone S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene*. 2008;27(45):5869-85.
27. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
28. Makkouk A, Weiner GJ. Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer research*. 2015;75(1):5-10.
29. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
30. Sharpe M, Mount N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech*. 2015;8(4):337-50.
31. Aruffo A, Seed B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(23):8573-7.
32. Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol*. 1989;143(8):2714-22.
33. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med*. 2016;14:73.
34. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
35. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.
36. Shaffer DR, Savoldo B, Yi Z, Chow KK, Kakarla S, Spencer DM, et al. T cells redirected against CD70 for the immunotherapy of CD70-positive malignancies. *Blood*. 2011;117(16):4304-14.
37. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106.
38. O'Neill RE, Cao X. Chapter Three - Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in cancer immunotherapy. In: Wang X-Y, Fisher PB, editors. *Advances in Cancer Research*. 143: Academic Press; 2019. p. 145-94.
39. Palameta S, Manrique-Rincón AJ, Toscaro JM, Semionatto IF, Fonseca MC, Rosa RSM, et al. Boosting antitumor response with PSMA-targeted immunomodulatory VLPs, harboring costimulatory TNFSF ligands and GM-CSF cytokine. *Mol Ther Oncolytics*. 2022;24:650-62.
40. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
41. de Graaf JF, de Vor L, Fouchier RAM, van den Hoogen BG. Armed oncolytic viruses: A kick-start for anti-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;41:28-39.
42. Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(3-4):265-73.
43. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med*. 2018;7(9):4509-16.
44. Lee S, Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2011;3(4):3856-93.
45. Manrique-Rincón AJ, de Carvalho AC, Ribeiro de Camargo ME, Franchini KG, Bajgelman MC. Development of a flow cytometry assay which allows to evaluate the efficiency of immunomodulatory vaccines to enhance T cell-mediated antitumor response. *J Biotechnol*. 2018;284:11-6.
46. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2015;33(17):1974-82.
47. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996;271(5256):1734-6.

48. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol.* 2005;17(2):133-44.
49. Mascarelli DE, Rosa RSM, Toscaro JM, Semionatto IF, Ruas LP, Fogagnolo CT, et al. Boosting Antitumor Response by Costimulatory Strategies Driven to 4-1BB and OX40 T-cell Receptors. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:692982.
50. Wedekind MF, Wagner LM, Cripe TP. Immunotherapy for osteosarcoma: Where do we go from here? *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(9):e27227.
51. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer.* 1992;28A(4-5):859-64.
52. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, Conte P, Delaloue S, Andre F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1698-704.
53. Kienzle G, von Kempis J. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol.* 2000;12(1):73-82.
54. Langstein J, Michel J, Fritsche J, Kreutz M, Andreesen R, Schwarz H. CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J Immunol.* 1998;160(5):2488-94.
55. Vinay DS, Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol.* 1998;10(6):481-9.
56. Melero I, Johnston JV, Shufford WW, Mittler RS, Chen L. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol.* 1998;190(2):167-72.
57. Xu LG, Li LY, Shu HB. TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(17):17278-82.
58. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):745-56.
59. Saoulli K, Lee SY, Cannons JL, Yeh WC, Santana A, Goldstein MD, et al. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med.* 1998;187(11):1849-62.
60. Zapata JM, Perez-Chacon G, Carr-Baena P, Martinez-Forero I, Azpilikueta A, Otano I, et al. CD137 (4-1BB) Signalosome: Complexity Is a Matter of TRAFs. *Front Immunol.* 2018;9:2618.
61. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science.* 1995;269(5229):1424-7.
62. Fröhlich A, Loick S, Bawden EG, Fietz S, Dietrich J, Diekmann E, et al. Comprehensive analysis of tumor necrosis factor receptor TNFRSF9 (4-1BB) DNA methylation with regard to molecular and clinicopathological features, immune infiltrates, and response prediction to immunotherapy in melanoma. *EBioMedicine.* 2020;52:102647.
63. Arch RH, Thompson CB. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Molecular and cellular biology.* 1998;18(1):558-65.
64. 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.
65. Bukczynski J, Wen T, Fau - Watts TH, Watts TH. Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand. (0014-2980 (Print)).
66. Bukczynski J, Wen T, Fau - Watts TH, Watts TH. Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand. 2003(0014-2980 (Print)).
67. Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 1990;348(6299):334-6.

68. 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. *J Exp Med.* 1997;186(1):47-55.
69. Semionatto IF, Palameta S, Toscaro JM, Manrique-Rincón AJ, Ruas LP, Paes Leme AF, et al. Extracellular vesicles produced by immunomodulatory cells harboring OX40 ligand and 4-1BB ligand enhance antitumor immunity. *Sci Rep.* 2020;10(1):15160.
70. DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH. Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol.* 1997;158(2):551-9.
71. Eun SY, Lee SW, Xu Y, Croft M. 4-1BB ligand signaling to T cells limits T cell activation. (1550-6606 (Electronic)).
72. Eun SY, Lee SW, Xu Y, Croft M. 4-1BB ligand signaling to T cells limits T cell activation. 2014(1550-6606 (Electronic)).
73. Lippert U, Zachmann K, Ferrari DM, Schwarz H, Brunner E, Mahbub-UI Latif AH, et al. CD137 ligand reverse signaling has multiple functions in human dendritic cells during an adaptive immune response. *Eur J Immunol.* 2008;38(4):1024-32.
74. Laderach D, Movassagh M, Johnson A, Mittler RS, Galy A. 4-1BB co-stimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8(+) T cells. *Int Immunol.* 2002;14(10):1155-67.
75. Innamarato P, Asby S, Morse J, Mackay A, Hall M, Kidd S, et al. Intratumoral Activation of 41BB Costimulatory Signals Enhances CD8 T Cell Expansion and Modulates Tumor-Infiltrating Myeloid Cells. *J Immunol.* 2020;205(10):2893-904.
76. Kim Y-J, 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.
77. Guinn BA, Bertram EM, DeBenedette MA, Berinstein NL, Watts TH. 4-1BBL enhances anti-tumor responses in the presence or absence of CD28 but CD28 is required for protective immunity against parental tumors. *Cell Immunol.* 2001;210(1):56-65.
78. Cheuk AT, Mufti GJ, Guinn BA. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2004;11(3):215-26.
79. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:23-68.
80. Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB Ligand-Mediated Costimulation of Human T Cells Induces CD4 and CD8 T Cell Expansion, Cytokine Production, and the Development of Cytolytic Effector Function. *The Journal of Immunology.* 2002;168(10):4897.
81. Wang Q, Zhang P, Zhang Q, Wang X, Li J, Ma C, et al. Analysis of CD137 and CD137L expression in human primary tumor tissues. *Croat Med J.* 2008;49(2):192-200.
82. Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, et al. Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol.* 2000;165(5):2903-10.
83. Ho WT, Pang WL, Chong SM, Castella A, Al-Salam S, Tan TE, et al. Expression of CD137 on Hodgkin and Reed-Sternberg cells inhibits T-cell activation by eliminating CD137 ligand expression. *Cancer Res.* 2013;73(2):652-61.
84. Grimmig T, Gasser M, Moench R, Zhu LJ, Nawalaniec K, Callies S, et al. Expression of Tumor-mediated CD137 ligand in human colon cancer indicates dual signaling effects. *Oncoimmunology.* 2019;8(12):e1651622.
85. 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.
86. Bansal-Pakala P, Halteman BS, Cheng MH, Croft M. Costimulation of CD8 T cell responses by OX40. *J Immunol.* 2004;172(8):4821-5.
87. Fu Y, Lin Q, Zhang Z, Zhang L. Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10(3):414-33.
88. Turaj AH, Cox KL, Penfold CA, French RR, Mockridge CI, Willoughby JE, et al. Augmentation of CD134 (OX40)-dependent NK anti-tumour activity is dependent on antibody cross-linking. *Sci Rep.* 2018;8(1):2278.

89. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4⁺ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol.* 2004;173(6):3716-24.
90. Willoughby J, Griffiths J, Tews I, Cragg MS. OX40: Structure and function - What questions remain? *Mol Immunol.* 2017;83:13-22.
91. Liu L, Liu Y, Yan X, Zhou C, Xiong X. The role of granulocyte colony-stimulating factor in breast cancer development: A review. *Mol Med Rep.* 2020;21(5):2019-29.
92. Hong IS. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp Mol Med.* 2016;48(7):e242.
93. Goldstein JI, Kominsky DJ, Jacobson N, Bowers B, Regalia K, Austin GL, et al. Defective leukocyte GM-CSF receptor (CD116) expression and function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2011;141(1):208-16.
94. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):533-44.
95. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol.* 2004;28(5):509-54.
96. Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(6):351-6.
97. Gutschalk CM, Yanamandra AK, Linde N, Meides A, Depner S, Mueller MM. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. *Cancer Med.* 2013;2(2):117-29.
98. Tomita T, Fujii M, Tokumaru Y, Imanishi Y, Kanke M, Yamashita T, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor upregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane type-1 MMP (MT1-MMP) in human head and neck cancer cells. *Cancer Lett.* 2000;156(1):83-91.
99. Gutschalk CM, Herold-Mende CC, Fusenig NE, Mueller MM. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo. *Cancer Res.* 2006;66(16):8026-36.
100. Pei XH, Nakanishi Y, Takayama K, Bai F, Hara N. Granulocyte, granulocyte-macrophage, and macrophage colony-stimulating factors can stimulate the invasive capacity of human lung cancer cells. *Br J Cancer.* 1999;79(1):40-6.
101. Pinedo HM, Buter J, Luykx-de Bakker SA, Pohlmann PR, van Hensbergen Y, Heideman DA, et al. Extended neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer combined with GM-CSF: effect on tumour-draining lymph node dendritic cells. *Eur J Cancer.* 2003;39(8):1061-7.
102. Norell H, Poschke I, Charo J, Wei WZ, Erskine C, Piechocki MP, et al. Vaccination with a plasmid DNA encoding HER-2/neu together with low doses of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial. *J Transl Med.* 2010;8:53.
103. Chen G, Gupta R, Petrik S, Laiko M, Leatherman JM, Asquith JM, et al. A feasibility study of cyclophosphamide, trastuzumab, and an allogeneic GM-CSF-secreting breast tumor vaccine for HER2⁺ metastatic breast cancer. *Cancer immunology research.* 2014;2(10):949-61.
104. Lacher MD, Bauer G, Fury B, Graeve S, Fledderman EL, Petrie TD, et al. SV-BR-1-GM, a Clinically Effective GM-CSF-Secreting Breast Cancer Cell Line, Expresses an Immune Signature and Directly Activates CD4. *Front Immunol.* 2018;9:776.
105. Clifton GT, Hale D, Vreeland TJ, Hickerson AT, Litton JK, Alatrash G, et al. Results of a Randomized Phase IIb Trial of Nelipepimut-S + Trastuzumab versus Trastuzumab to Prevent Recurrences in Patients with High-Risk HER2 Low-Expressing Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(11):2515-23.
106. Mittendorf EA, Ardavanis A, Symanowski J, Murray JL, Shumway NM, Litton JK, et al. Primary analysis of a prospective, randomized, single-blinded phase II trial evaluating the HER2 peptide AE37 vaccine in breast cancer patients to prevent recurrence. *Ann Oncol.* 2016;27(7):1241-8.

107. Ogawa T, Kusumoto M, Mizumoto K, Sato N, Tanaka M. Adenoviral GM-CSF Gene Transduction into Breast Cancer Cells Induced Long-Lasting Antitumor Immunity in Mice. *Breast Cancer*. 1999;6(4):301-4.
108. 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.
109. Tani K, Azuma M, Nakazaki Y, Oyaizu N, Hase H, Ohata J, et al. Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan: clinical and immunological findings. *Mol Ther*. 2004;10(4):799-816.
110. Nemunaitis J, Sterman D, Jablons D, Smith JW, Fox B, Maples P, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):326-31.
111. Salgia R, Lynch T, Skarin A, Lucca 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.
112. Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, et al. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res*. 1999;59(20):5160-8.
113. Patel PH, Kockler DR. Sipuleucel-T: a vaccine for metastatic, asymptomatic, androgen-independent prostate cancer. *Ann Pharmacother*. 2008;42(1):91-8.
114. Anassi E, Ndefo UA. Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P T*. 2011;36(4):197-202.
115. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control*. 2009;20(7):1071-82.
116. Dolle JM, Daling JR, White E, Brinton LA, Doody DR, Porter PL, et al. Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(4):1157-66.
117. Amirikia KC, Mills P, Bush J, Newman LA. Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women : Implications for breast cancer screening recommendations. *Cancer*. 2011;117(12):2747-53.
118. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502.
119. Santagata S, Thakkar A, Ergonul A, Wang B, Woo T, Hu R, et al. Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *J Clin Invest*. 2014;124(2):859-70.
120. Malorni L, Shetty PB, De Angelis C, Hilsenbeck S, Rimawi MF, Elledge R, et al. Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136(3):795-804.
121. Pogoda K, Niwińska A, Murawska M, Pieńkowski T. Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. *Med Oncol*. 2013;30(1):388.
122. Ahn SK, Hwang JW. Global Trends in Immunotherapy Research on Breast Cancer over the Past 10 Years. *J Oncol*. 2020;2020:4708394.
123. Yadav BS, Chanana P, Jhamb S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol*. 2015;6(6):252-63.
124. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast cancer (Dove Medical Press)*. 2019;11:151-64.
125. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(11):674-90.

126. Wang DY, Jiang Z, Ben-David Y, Woodgett JR, Zacksenhaus E. Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes. *Sci Rep.* 2019;9(1):19107.
127. Gingras I, Azim HA, Jr., Ignatiadis M, Sotiriou C. Immunology and breast cancer: toward a new way of understanding breast cancer and developing novel therapeutic strategies. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2015;13(6):372-82.
128. Gatti-Mays ME, Balko JM, Gameiro SR, Bear HD, Prabhakaran S, Fukui J, et al. If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2019;5:37.
129. Loi S. Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology.* 2013;2(7):e24720.
130. Oualla K, El-Zawahry HM, Arun B, Reuben JM, Woodward WA, Gamal El-Din H, et al. Novel therapeutic strategies in the treatment of triple-negative breast cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2017;9(7):493-511.
131. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;148(3):467-76.
132. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R48.
133. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018;19(1):40-50.
134. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2020;20(1):179.
135. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(4):361-70.
136. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia (New York, NY).* 2006;8(3):190-8.
137. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70.
138. Saal LH, Holm K Fau - Maurer M, Maurer M Fau - Memeo L, Memeo L Fau - Su T, Su T Fau - Wang X, Wang X Fau - Yu JS, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. (0008-5472 (Print)).
139. Saal LH, Holm K Fau - Maurer M, Maurer M Fau - Memeo L, Memeo L Fau - Su T, Su T Fau - Wang X, Wang X Fau - Yu JS, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Research.* 2005(0008-5472 (Print)).
140. de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(2):183-92.
141. Chacón RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast cancer research : BCR.* 2010;12 Suppl 2(Suppl 2):S3-S.
142. Sparano JA. Taxanes for breast cancer: an evidence-based review of randomized phase II and phase III trials. *Clin Breast Cancer.* 2000;1(1):32-40; discussion 1-2.
143. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F, Chrétien AS, Viens P, Sabatier R, et al. PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The First Clinical Evidences Are Emerging. *A Literature Review. Cancers (Basel).* 2019;11(7).
144. Marra A, Viale G, Curigliano G. Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. *BMC Med.* 2019;17(1):90.
145. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or

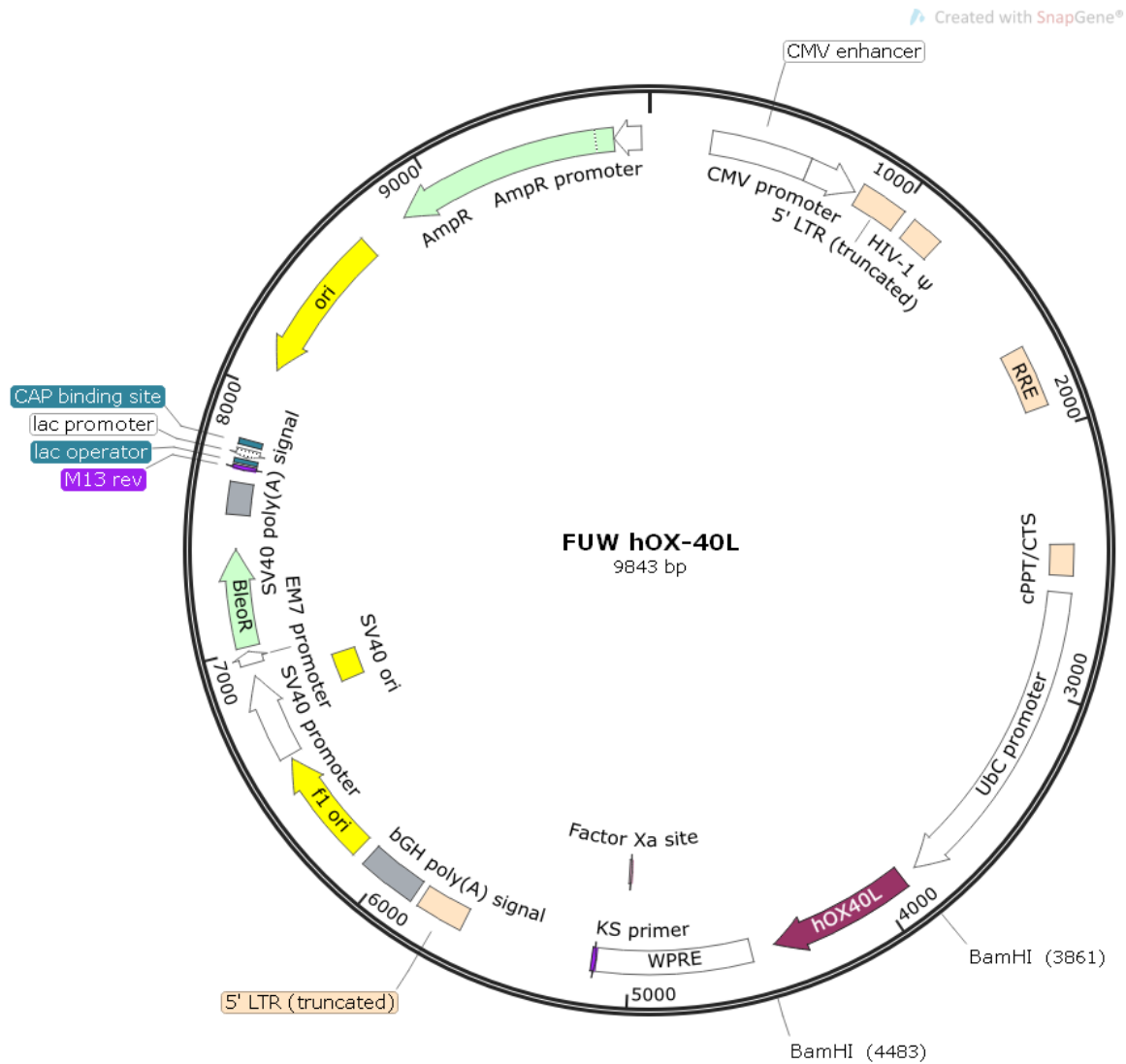
- metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(1):44-59.
146. Rugo HS, Delord JP, Im SA, Ott PA, Piha-Paul SA, Bedard PL, et al. Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(12):2804-11.
 147. Tolaney SM, Kalinsky K, Kaklamani V, Savulsky C, Olivo M, Aktan G, et al. Abstract PD6-13: Phase 1b/2 study to evaluate eribulin mesylate in combination with pembrolizumab in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer Research.* 2018;78(4 Supplement):PD6-13.
 148. Adams S, Diamond JR, Hamilton E, Pohlmann PR, Tolaney SM, Chang C-W, et al. Atezolizumab Plus nab-Paclitaxel in the Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer With 2-Year Survival Follow-up: A Phase 1b Clinical Trial. *JAMA oncology.* 2019;5(3):334-42.
 149. Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, Bachelot T, Hui R, Curigliano G, et al. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. 2019(1474-5488 (Electronic)).
 150. Domchek SM, Postel-Vinay S, Bang YJ, Park YH, Alexandre J, Delord JP, et al. Abstract PD6-11: An open-label, multitumor, phase II basket study of olaparib and durvalumab (MEDIOLA): Results in germline *BRCA*-mutated (g*BRCA*m) HER2-negative metastatic breast cancer (MBC). *Cancer Research.* 2018;78(4 Supplement):PD6-11.
 151. Vinayak S, Tolaney SM, Schwartzberg LS, Mita MM, McCann GA-L, Tan AR, et al. TOPACIO/Keynote-162: Niraparib + pembrolizumab in patients (pts) with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC), a phase 2 trial. *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(15_suppl):1011-.
 152. Fauzee NJ. Taxanes: promising anti-cancer drugs. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(4):837-51.
 153. Ferguson T, Wilcken N, Vagg R, Ghersi D, Nowak AK. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(4):CD004421.
 154. Mustacchi G, De Laurentiis M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4303-18.
 155. Lakshmaiah KC, Anand A, Babu KG, Dasappa L, Jacob LA, Babu M C S, et al. Role of Taxanes in Triple-Negative Breast Cancer: A Study From Tertiary Cancer Center in South India. *World J Oncol.* 2017;8(4):110-6.
 156. Tan AR, Swain SM. Therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Cancer J.* 2008;14(6):343-51.
 157. McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(1):10-6.
 158. Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, Wessels LF, Wesseling J, Vd Vijver MJ, et al. Genomic patterns resembling *BRCA1*- and *BRCA2*-mutated breast cancers predict benefit of intensified carboplatin-based chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2014;16(3):R47.
 159. Lips EH, Benard-Slagter A, Opdam M, Scheerman CE, Wesseling J, Hogervorst FBL, et al. *BRCAness* digitalMLPA profiling predicts benefit of intensified platinum-based chemotherapy in triple-negative and luminal-type breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):79.
 160. de Biasi AR, Villena-Vargas J, Adusumilli PS. Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: a review of preclinical and clinical evidence. *Clin Cancer Res.* 2014;20(21):5384-91.
 161. Wan S, Pestka S, Jubin RG, Lyu YL, Tsai YC, Liu LF. Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS One.* 2012;7(3):e32542.
 162. Park SJ, Ye W, Xiao R, Silvín C, Padgett M, Hodge JW, et al. Cisplatin and oxaliplatin induce similar immunogenic changes in preclinical models of head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2019;95:127-35.

163. Rébé C, Demontoux L, Pilot T, Ghiringhelli F. Platinum Derivatives Effects on Anticancer Immune Response. *Biomolecules*. 2019;10(1).
164. McKeage MJ, Hsu T, Screnci D, Haddad G, Baguley BC. Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs. *Br J Cancer*. 2001;85(8):1219-25.
165. McDonald ES, Randon KR, Knight A, Windebank AJ. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2005;18(2):305-13.
166. Zhou J, Kang Y, Chen L, Wang H, Liu J, Zeng S, et al. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front Pharmacol*. 2020;11:343.
167. Rottenberg S, Disler C, Perego P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(1):37-50.
168. Chen X, Wu Y, Dong H, Zhang CY, Zhang Y. Platinum-based agents for individualized cancer treatment. *Curr Mol Med*. 2013;13(10):1603-12.
169. Savage KI, Harkin DP. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS J*. 2015;282(4):630-46.
170. De Talhouet S, Peron J, Vuilleumier A, Friedlaender A, Viassolo V, Ayme A, et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. *Sci Rep*. 2020;10(1):7073.
171. De Talhouet S, Peron J, Vuilleumier A, Friedlaender A, Viassolo V, Ayme A, et al. Publisher Correction: Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. *Sci Rep*. 2020;10(1):19248.
172. de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet*. 2002;39(4):225-42.
173. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.
174. Farmer H, McCabe N Fau - Lord CJ, Lord Cj Fau - Tutt ANJ, Tutt An Fau - Johnson DA, Johnson Da Fau - Richardson TB, Richardson Tb Fau - Santarosa M, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. (1476-4687 (Electronic)).
175. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. 2005.
176. Farmer H, McCabe N Fau - Lord CJ, Lord Cj Fau - Tutt ANJ, Tutt An Fau - Johnson DA, Johnson Da Fau - Richardson TB, Richardson Tb Fau - Santarosa M, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. 2005(1476-4687 (Electronic)).
177. Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development. *J Clin Oncol*. 2015;33(12):1397-406.
178. Saffhill R, Ockey CH. Strand breaks arising from the repair of the 5-bromodeoxyuridine-substituted template and methyl methanesulphonate-induced lesions can explain the formation of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*. 1985;92(3):218-24.
179. Schultz N, Lopez E Fau - Saleh-Gohari N, Saleh-Gohari N Fau - Helleday T, Helleday T. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. 2003(1362-4962 (Electronic)).
180. Spry M, Scott T, Pierce H, D'Orazio JA. DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes. *Front Biosci*. 2007;12:4191-207.
181. Boulton S, Kyle S, Durkacz BW. Interactive effects of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase on cellular responses to DNA damage. *Carcinogenesis*. 1999;20(2):199-203.
182. Ronson GE, Piberger AL, Higgs MR, Olsen AL, Stewart GS, McHugh PJ, et al. PARP1 and PARP2 stabilise replication forks at base excision repair intermediates through Fbh1-dependent Rad51 regulation. *Nat Commun*. 2018;9(1):746.
183. Sulai NH, Tan AR. Development of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in the treatment of BRCA-mutated breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018;16(7):491-501.
184. Han Y, Yu X, Li S, Tian Y, Liu C. New Perspectives for Resistance to PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:578095.

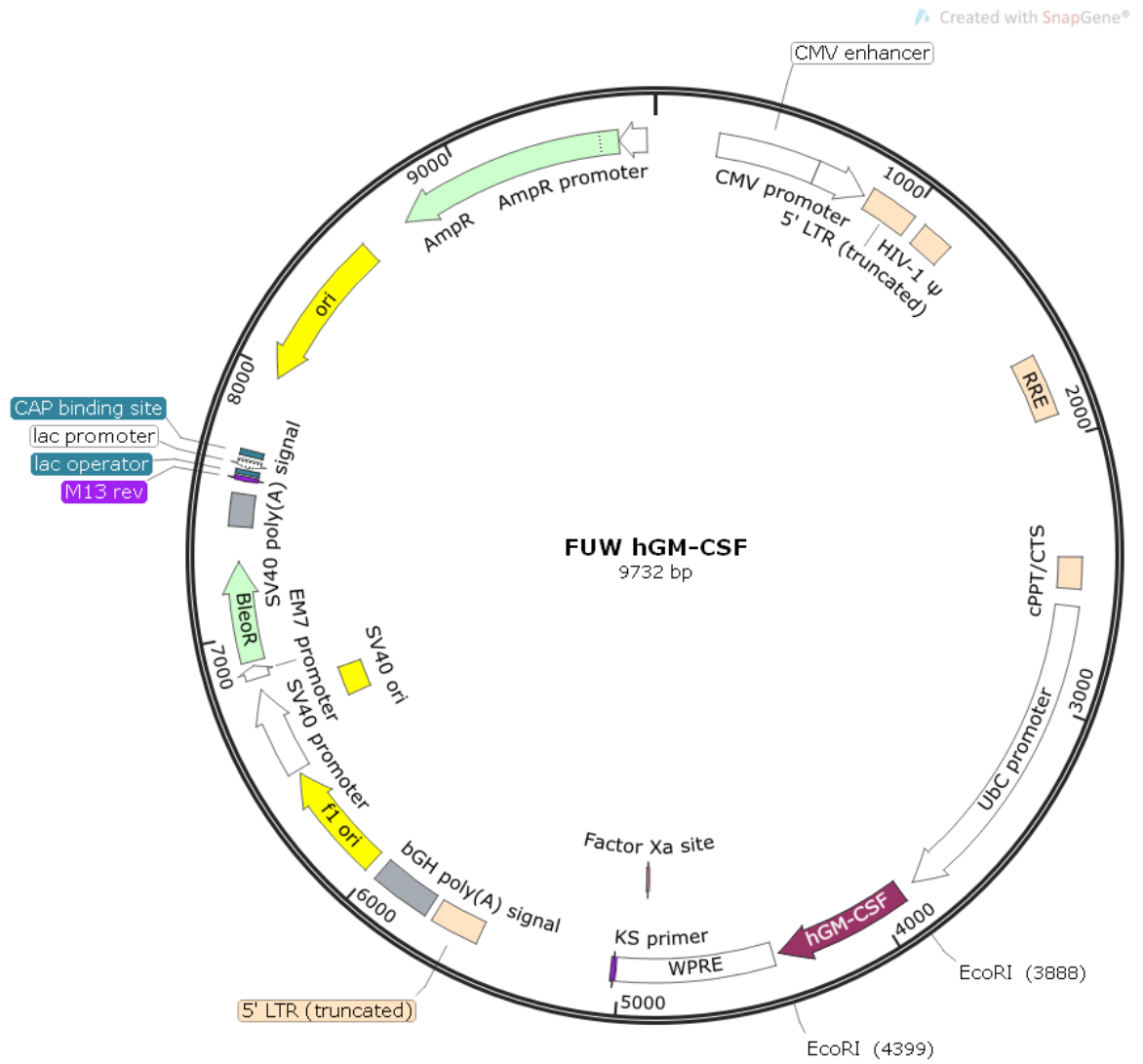
185. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* 2006;66(16):8109-15.
186. Lord CJ, McDonald S, Swift S, Turner NC, Ashworth A. A high-throughput RNA interference screen for DNA repair determinants of PARP inhibitor sensitivity. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(12):2010-9.
187. Vinayak S, Ford JM. PARP Inhibitors for the Treatment and Prevention of Breast Cancer. *Curr Breast Cancer Rep.* 2010;2(4):190-7.
188. Gonçalves A, Bertucci A, Bertucci F. PARP Inhibitors in the Treatment of Early Breast Cancer: The Step Beyond? *Cancers (Basel).* 2020;12(6).
189. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995;81(3):323-30.
190. Jiang Y, Chu WK. Potential Roles of the Retinoblastoma Protein in Regulating Genome Editing. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:81.
191. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene.* 2006;25(38):5220-7.
192. Cretella D, Fumarola C, Bonelli M, Alfieri R, La Monica S, Digiacomio G, et al. Pre-treatment with the CDK4/6 inhibitor palbociclib improves the efficacy of paclitaxel in TNBC cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):13014.
193. Dean JL, Thangavel C, McClendon AK, Reed CA, Knudsen ES. Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure. *Oncogene.* 2010;29(28):4018-32.
194. Witkiewicz AK, Chung S, Brough R, Vail P, Franco J, Lord CJ, et al. Targeting the Vulnerability of RB Tumor Suppressor Loss in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep.* 2018;22(5):1185-99.
195. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Hilmarisdottir H, Olafsdottir G, Esteller M, et al. CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics.* 2011;6(5):638-49.
196. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(20):1566-75.
197. Guo Q, Goreczny GJ, Maynard A, Spasic M, McAllister SS. Abstract A18: Investigating CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunology Research.* 2020;8(3 Supplement):A18.
198. Vikas P, Borchering N, Zhang W. The clinical promise of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2018;10:6823-33.
199. Adams S, Loi S, Toppmeyer D, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol.* 2019;30(3):405-11.
200. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol.* 2016;34(21):2460-7.
201. Cortés J, Guo Z, Karantza V, Aktan G. KEYNOTE-355: Randomized, double-blind, phase III study of pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) vs placebo (PBO) + chemo for previously untreated, locally recurrent, inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(5_suppl):TPS18-TPS.
202. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2108-21.
203. Cortés J, André F, Gonçalves A, Kümmel S, Martín M, Schmid P, et al. IMpassion132 Phase III trial: atezolizumab and chemotherapy in early relapsing metastatic triple-negative breast cancer. *Future Oncol.* 2019;15(17):1951-61.
204. Ramlogan-Steel CA, Steel JC, Morris JC. Lung cancer vaccines: current status and future prospects. *Transl Lung Cancer Res.* 2014;3(1):46-52.

205. Gordon B, Gadi VK. The Role of the Tumor Microenvironment in Developing Successful Therapeutic and Secondary Prophylactic Breast Cancer Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3).
206. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(6):360-78.
207. 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;8:1150.
208. Chen Q, He Y, Wang Y, Li C, Zhang Y, Guo Q, et al. Penetrable Nanoplatfor for "Cold" Tumor Immune Microenvironment Reeducation. *Adv Sci (Weinh)*. 2020;7(17):2000411.
209. Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A*. 2010;77(5):410-9.
210. 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;272(5259):263-7.
211. Gabeen AA, Abdel-Hamid FF, El-Houseini ME, Fathy SA. Potential immunotherapeutic role of interleukin-2 and interleukin-12 combination in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*. 2014;1:55-63.
212. Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJ. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;50(3):312-32.
213. Lee DY, Choi BK, Lee DG, Kim YH, Kim CH, Lee SJ, et al. 4-1BB signaling activates the t cell factor 1 effector/ β -catenin pathway with delayed kinetics via ERK signaling and delayed PI3K/AKT activation to promote the proliferation of CD8⁺ T Cells. *PLoS One*. 2013;8(7):e69677.
214. Ellis GI, Sheppard NC, Riley JL. Genetic engineering of T cells for immunotherapy. *Nat Rev Genet*. 2021;22(7):427-47.
215. Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(1):5-18.
216. Akhoundi M, Mohammadi M, Sahraei SS, Sheykhasan M, Fayazi N. CAR T cell therapy as a promising approach in cancer immunotherapy: challenges and opportunities. *Cell Oncol (Dordr)*. 2021;44(3):495-523.

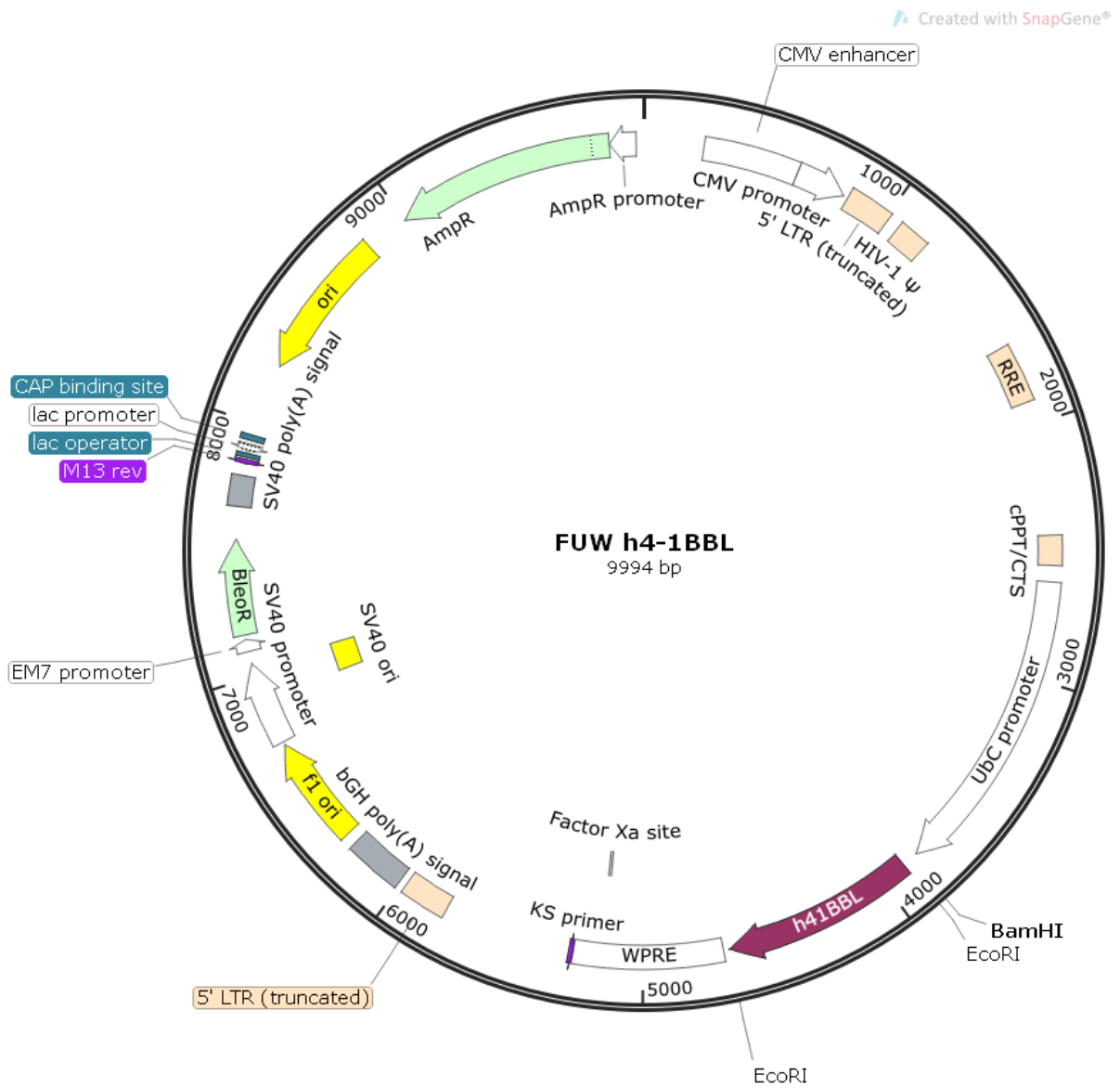
8.2: Mapa do vetor lentiviral FUW OX-40L.



8.3: Mapa do vetor lentiviral FUW GM-CSF.



8.4: Mapa do vetor lentiviral FUW 4-1BBL.



9. ANEXOS

9.1 Parecer aprovado do CEP

	UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Desenvolvimento de uma plataforma in vitro para avaliar o potencial imunomodulatório de vacinas antitumorais desenvolvidas a partir de células provenientes de amostras de tumores triplo negativos resistentes a quimioterapia neoadjuvante.		
Pesquisador: SUSANA OLIVEIRA BOTELHO RAMALHO		
Área Temática:		
Versão: 4		
CAAE: 08897219.9.0000.5404		
Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 3.691.644		
Apresentação do Projeto: As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.		
Situação do Parecer: Aprovado		
Necessita Apreciação da CONEP: Não		

CAMPINAS, 07 de Novembro de 2019

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

9.2 Aprovação da CIBio

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2019-23

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

1. Título do projeto: Estudos com vacinas antitumorais utilizando células humanas, ensaios in vitro e ensaios in vivo utilizando animais humanizados.

2. Pesquisador responsável: Marcio Chaim Bajgelman

3. Experimentador(es):

Jessica Marcelino Toscaro, Luciana Pereira Ruas, Gabriel Correia Lima

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 11/12/2019.

Parecer final: [☒]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências.

comentários da CIBio:

Marcio C.B.
Presidente da CIBio CNPEM
Marcio Chaim Bajgelman

celso benedetti
Membro da CIBio CNPEM
Celso Eduardo Benedetti

Rafael Elias
Membro da CIBio CNPEM
Rafael Elias Marques Pereira Silva

Douglas Galante
Membro da CIBio CNPEM
Douglas Galante

Juliana Velasco
Membro da CIBio CNPEM
Juliana Velasco de Castro Oliveira

Daniel Kolling
Membro da CIBio CNPEM
Daniel Kolling

Juliana Conceição Teodoro
Membro da CIBio CNPEM
Juliana Conceição Teodoro

Mateus Borba Cardoso
Membro da CIBio CNPEM
Mateus Borba Cardoso

9.3 Colaboração em artigo científico publicado em 2020.

www.nature.com/scientificreports

**SCIENTIFIC
REPORTS**
 nature research


OPEN

Extracellular vesicles produced by immunomodulatory cells harboring OX40 ligand and 4-1BB ligand enhance antitumor immunity

Isadora Ferraz Semionatto^{1,2}, Soledad Palameta^{1,2}, Jéssica Marcelino Toscaro^{1,3},
 Andrea Johanna Manrique-Rincón^{4,5}, Luciana Pereira Ruas¹, Adriana Franco Paes Leme^{4,5} &
 Marcio Chaim Bajgelman^{1,2,6}✉

Genetically modified tumor cells harboring immunomodulators may be used as therapeutic vaccines to stimulate antitumor immunity. The therapeutic benefit of these tumor vaccines is extensively investigated and mechanisms by which they boost antitumor response may be further explored. Tumor cells are large secretors of extracellular vesicles (EVs). These EVs are able to vehiculate RNA and proteins to target cells, and engineered EVs also vehiculate recombinant proteins. In this study, we explore immunomodulatory properties of EVs derived from antitumor vaccines expressing the TNFSF ligands 4-1BBL and OX40L, modulating immune response mediated by immune cells and eliminating tumors. Our results suggest that the EVs secreted by genetically modified tumor cells harboring TNFSF ligands can induce T cell proliferation, inhibit the transcription factor FoxP3, associated with the maintenance of Treg phenotype, and enhance antitumor activity mediated by immune cells. The immunomodulatory extracellular vesicles have potential to be further engineered for developing new approaches for cancer therapy.

Extracellular vesicles secreted by cells can act as important mediators in the modulation of the immune system¹. The EVs are a heterogeneous group of membranous structures, of submicron size, secreted by practically all the cells of the organism. They are classified according to their size and subcellular origin. Vesicles produced by budding of the plasma membrane, measuring between 100–1,000 nm, are called microvesicles. In contrast, EVs smaller than 100 nm, generated inside multivesicular bodies (MVBs) and secreted after the fusion of the MVBs with the cell surface, are called exosomes². The EVs may carry on their surface numerous proteins inherited from their parent cells, such as tetraspanins CD63, CD81 and CD9, the heat shock proteins Hsp90 and Hsp70 and specific cellular proteins. These proteins may interact specifically with target cells and cause direct stimulation of these cells^{3,4}. In this manner, EVs are essential elements for cellular communication, playing a key role in the regulation of multiple biological processes such as pregnancy, blood coagulation, regulation of inflammation and cancer^{5–9}.

Tumor cells are large EVs-secreting cells. Although numerous studies evidenced that tumor EVs participate in the progression of cancer, other studies have demonstrated that genetically modified tumor cells can secrete EVs capable of transporting RNA and proteins of interest to target cells, inducing tumor elimination^{10–12}. In this work, we investigated the antitumor role of EVs derived from genetically modified tumor cells for expression of 4-1BB and OX40 membrane ligands.

The 4-1BB receptor (also known as CD137 or TNFRSP9) is expressed on activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, functioning as a potent costimulator of adaptive immune responses. The interaction between 4-1BB and its ligand, the 4-1BBL molecule, induced in activated antigen presenting cells (APCs), stimulates the proliferation,

¹Brazilian Biosciences National Laboratory, Center for Research in Energy and Materials, Campinas, SP, Brazil. ²Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ³Medical School, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. [✉]email: marcio.bajgelman@inbio.cnpem.br

9.4 Colaboração em artigo científico publicado em 2021.



Boosting Antitumor Response by Costimulatory Strategies Driven to 4-1BB and OX40 T-cell Receptors

Daniela E. Mascarelli^{1,2}, Rhubia S. M. Rosa^{1,2}, Jessica M. Toscano^{1,3}, Isadora F. Semionatto^{1,2}, Luciana P. Ruas¹, Caroline T. Fogagnolo^{1,4}, Gabriel C. Lima^{1,4} and Marcio C. Bajgelman^{1,2,5*}

¹ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPq), Campinas, Brazil, ² Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil, ³ Medical School, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, ⁴ Medical School of Ribeirão Preto (FMRP), University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ⁵ Pro Factory of Graduation, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Rodrigo Nello Ramos,
INSERM U1138 Centre de Recherche
des Cordeliers (CRIC), France

Reviewed by:

Maximilien Grandjean,
Dana-Farber Cancer Institute,
United States
Saraite Komiotti,
INSERM U976 Immunologie,
Dermatologie, Oncologie, France

*Correspondence:

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

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 09 April 2021

Accepted: 27 May 2021

Published: 30 June 2021

Citation:

Mascarelli DE, Rosa RSM,
Toscano JM, Semionatto IF, Ruas LP,
Fogagnolo CT, Lima GC and
Bajgelman MC (2021) Boosting
Antitumor Response by Costimulatory
Strategies Driven to 4-1BB and OX40
T-cell Receptors.
Front. Cell Dev. Biol. 9:692982.
doi: 10.3389/fcell.2021.692982

Immunotherapy explores several strategies to enhance the host immune system's ability to detect and eliminate cancer cells. The use of antibodies that block immunological checkpoints, such as anti-programmed death 1/programed death 1 ligand and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, is widely recognized to generate a long-lasting antitumor immune response in several types of cancer. Evidence indicates that the elimination of tumors by T cells is the key for tumor control. It is well known that costimulatory and coinhibitory pathways are critical regulators in the activation of T cells. Besides blocking checkpoints inhibitors, the agonistic signaling on costimulatory molecules also plays an important role in T-cell activation and antitumor response. Therefore, molecules driven to costimulatory pathways constitute promising targets in cancer therapy. The costimulation of tumor necrosis factor superfamily receptors on lymphocytes surface may transduce signals that control the survival, proliferation, differentiation, and effector functions of these immune cells. Among the members of the tumor necrosis factor receptor superfamily, there are 4-1BB and OX40. Several clinical studies have been carried out targeting these molecules, with agonist monoclonal antibodies, and preclinical studies exploring their ligands and other experimental approaches. In this review, we discuss functional aspects of 4-1BB and OX40 costimulation, as well as the progress of its application in immunotherapies.

Keywords: Immunotherapy, T cell costimulation, TNFR, 4-1BB, OX40, cancer therapy, aptamers, agonistic antibody

INTRODUCTION

Immunotherapy explores the host immune system to enhance antitumor response. The inhibition of immunological checkpoints, on T cells, such as anti-programmed death 1 (PD-1)/programed death 1 ligand (PD-L1) and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), has been shown to generate long-lasting antitumor immune responses in cancer therapy. However, this approach is effective in only 30% of patients because of mechanisms of tumor resistance (Chen and Mellman, 2013; Swart et al., 2016). There are several signaling mechanisms that may drive T-cell phenotype switching the balance between immunotolerance and surveillance.

9.5 Colaboração em artigo científico publicado em 2021.



Serological Testing for COVID-19, Immunological Surveillance, and Exploration of Protective Antibodies

Luis A. Peroni¹, Jessica M. Toscano^{1,2}, Camilla Canatelli¹, Celisa C. C. Tonoli¹, Renata R. de Oliveira¹, Celso E. Benedetti¹, Lais D. Coimbra¹, Alexandre Borin Pereira¹, Rafael E. Marques¹, José L. Proença-Modena^{3,4}, Gabriel C. Lima^{1,5}, Renata Viana⁶, Jessica B. Borges⁶, Hui Tzu Lin-Wang⁶, Cely S. Abboud⁷, Carlos Gun⁶, Kleber G. Franchini^{1,2} and Marcio C. Bajgelman^{1,2*}

¹ Brazilian Biosciences National Laboratory, Center for Research in Energy and Materials, Campinas, Brazil; ² Medical School, University of Campinas, Campinas, Brazil; ³ Laboratory of Emerging Viruses (LEVS), Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil; ⁴ Experimental Medicine Research Center (EMRC), University of Campinas, Campinas, Brazil; ⁵ Molecular Sciences Undergrad Program, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁶ Research Division, Dante Pazzanese Cardiology Institute, São Paulo, Brazil; ⁷ Infectious Diseases Section and Hospital Infection Control Committee, Dante Pazzanese Cardiology Institute, São Paulo, Brazil; ⁸ Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Stefan Voth, Paul Ehrlich Institut (PEI), Germany

Reviewed by:

Sarah Rowland-Jones, University of Oxford, United Kingdom
Wanbing Liu, General Hospital of Central Theater Command, China

*Correspondence:

Marcio C. Bajgelman
marcio.bajgelman@fmbio.unicamp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 30 November 2020

Accepted: 28 July 2021

Published: 19 August 2021

Citation:

Peroni LA, Toscano JM, Canatelli C, Tonoli CCQ, de Oliveira RR, Benedetti CE, Coimbra LQ, Pereira AB, Marques RE, Proença-Modena JL, Lima GC, Viana R, Borges JB, Lin-Wang HT, Abboud CS, Gun C, Franchini KG and Bajgelman MC (2021) Serological Testing for COVID-19, Immunological Surveillance, and Exploration of Protective Antibodies. *Front. Immunol.* 12:635701. doi: 10.3389/fimmu.2021.635701

Serological testing is a powerful tool in epidemiological studies for understanding viral circulation and assessing the effectiveness of virus control measures, as is the case of SARS-CoV-2, the pathogenic agent of COVID-19. Immunoassays can quantitatively reveal the concentration of antiviral antibodies. The assessment of antiviral antibody titers may provide information on virus exposure, and changes in IgG levels are also indicative of a reduction in viral circulation. In this work, we describe a serological study for the evaluation of antiviral IgG and IgM antibodies and their correlation with antiviral activity. The serological assay for IgG detection used two SARS-CoV-2 proteins as antigens, the nucleocapsid N protein and the 3CL protease. Cross-reactivity tests in animals have shown high selectivity for detection of antiviral antibodies, using both the N and 3CL antigens. Using samples of human serum from individuals previously diagnosed by PCR for COVID-19, we observed high sensitivity of the ELISA assay. Serological results with human samples also suggest that the combination of higher titers of antiviral IgG antibodies to different antigen targets may be associated with greater neutralization activity, which can be enhanced in the presence of antiviral IgM antibodies.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, immunoassay, nucleocapsid, 3CL, seroneutralization

INTRODUCTION

SARS-CoV-2 is a single-stranded RNA virus that belongs to the *Betacoronavirus* genus. The virus genome encodes 27 proteins. The virus envelope of SARS-CoV-2 consists of a phospholipid bilayer containing structural proteins such as spike protein (S), membrane protein (M), and envelope protein (E). The capsid also harbors the most abundant structural nucleocapsid protein (N) that plays a critical role in genome packaging. The S protein is a surface glycoprotein that decorates the

9.6 Colaboração em artigo científico publicado em 2022.



Boosting antitumor response with PSMA-targeted immunomodulatory VLPs, harboring costimulatory TNFSF ligands and GM-CSF cytokine

Soledad Palameta,^{1,2} Andrea J. Manrique-Rincón,^{1,4} Jessica M. Toscaro,^{1,4} Isadora F. Semionatto,^{1,3} Matheus C. Fonseca,^{1,3} Rhubia S.M. Rosa,^{1,3} Luciana P. Ruas,¹ Paulo S.L. Oliveira,^{1,2} and Marcio C. Bajgelman^{1,3,4}

¹Brazilian Biosciences National Laboratory, Center for Research in Energy and Materials, Campinas, SP, Brazil; ²Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ⁴University of Campinas Medical School, Campinas, SP, Brazil

Therapeutic strategies based on immunomodulation have improved cancer therapy. Most approaches target co-stimulatory pathways or the inhibition of immunosuppressive mechanisms, to enhance immune response and overcome the immune tolerance of tumors. Here, we propose a novel platform to deliver targeted immunomodulatory signaling, enhancing antitumor response. The platform is based on virus-like particles derived from lentiviral capsids. These particles may be engineered to harbor multifunctional ligands on the surface that drive tropism to the tumor site and deliver immunomodulatory signaling, boosting the antitumor response. We generated virus-like particles harboring a PSMA-ligand, TNFSF co-stimulatory ligands 4-1BBL or OX40L, and a membrane-anchored GM-CSF cytokine. The virus-like particles are driven to PSMA-expressing tumors and deliver immunomodulatory signaling from the TNFSF surface ligands and the anchored GM-CSF, inducing T cell proliferation, inhibition of regulatory T cells, and potentiating elimination of tumor cells. The PSMA-targeted particles harboring immunomodulators enhanced antitumor activity in immunocompetent challenged mice and may be explored as a potential tool for cancer immunotherapy.

INTRODUCTION

The therapeutic strategies targeting antitumor immunity have shown remarkable clinical results. However, there are still numerous cases of resistant tumors and therefore the need to explore new antitumor approaches.^{1–3} Most of the immunomodulatory strategies that are currently being pursued in clinics target checkpoint inhibition,^{4–6} while other approaches may also aim at co-stimulating lymphocyte receptors, such as 4-1BB (CD137) and OX40 (CD134) expressed on the surface of T cells, inducing agonist phenotypic changes in addition to contributing to the inhibition of immunosuppressive mechanisms associated with tumor cell tolerance.^{7–9}

The co-stimulatory signaling driven to 4-1BB receptor promote survival, clonal expansion, and strengthening of T cell activation, inducing

the diminution of tumors in animals.^{10–12} The agonist anti-4-1BB monoclonal antibody exhibits co-stimulatory activity and has been used in clinical trials.¹³ Agonist antibodies driven to the OX40 receptor may also co-stimulate T cells, enhancing activation and inducing lymphocyte proliferation. The co-stimulation of OX40 may increase the longevity of T cells, and clinical data suggest that lymphocytic infiltrates that have high OX40 expression are correlated with a lower incidence of metastases and a better prognosis for patients.^{14,15} Literature data also demonstrate that agonist antibodies for the co-stimulation of OX40 expressed in regulatory T cells may inhibit the expression of FoxP3 transcription factor, which is associated with the maintenance of the immunosuppressive regulatory T cell (Treg) phenotype.^{16,17} The antitumor T cell activity may be enhanced by combining other additive stimuli as provided by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) cytokine, which plays an important role in dendritic cell (DC) maturation, increasing the presentation of tumor antigens to the immune system.^{18,19}

The generation of monoclonal antibodies requires a relatively complex approach, involving the immunization of animals and the selection of producer clones and establishment of lineages. In this sense, as an alternative to monoclonal antibodies, there are efforts being made to develop other molecules, for example, based on the use of soluble ligands or agonist aptamers.^{20–23} We have recently demonstrated that extracellular vesicles (EVs) produced by antitumor vaccines harboring tumor necrosis factor superfamily 4-1BBL and OX40L may exhibit immunomodulatory activity, stimulating antitumor effects *in vitro*.²⁴ These vesicles represent a heterogeneous population composed of microvesicles and exosomes. The microvesicles themselves are particles from 50 to 1,000 nm in diameter that are formed by the shedding of the plasma membrane.²⁵ Exosomes are formed by the fusion of the multivesicular endosome with the plasma membrane, generating particles of approximately 40–100 nm in

Received 23 September 2021; accepted 11 February 2022;
<https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.02.010>

Correspondence: Marcio Bajgelman, PhD, Brazilian Biosciences National Laboratory, Center for Research in Energy and Materials, Campinas, SP, Brazil.
E-mail: marcio.bajgelman@lnbm.cnpem.br

