**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA**
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS**

**Veridiane Maria Pscheidt**

# Desenvolvimento de um ensaio para detecção de anticorpos de bloqueio dos receptores inibitórios imunes PD-1/PD-L1 por citometria de fluxo

**Porto Alegre**
**2025**

**Veridiane Maria Pscheidt**

# Desenvolvimento de um ensaio para detecção de anticorpos de bloqueio dos receptores inibitórios imunes PD-1/PD-L1 por citometria de fluxo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biociências

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino
Coorientador: Dr. Rodrigo Benedetti Gassen

**Porto Alegre**
**2025**

Catalogação na Publicação

Pscheidt, Veridiane Maria
Desenvolvimento de um ensaio para detecção de anticorpos de bloqueio dos receptores inibitórios imunes PD-1/PD-L1 por citometria de fluxo / Veridiane Maria Pscheidt. -- 2025.
74 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2025.

Orientador(a): Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino ; coorientador(a): Rodrigo Benedetti Gassen .

1. Citometria de Fluxo. 2. PD-1. 3. PD-L1. 4. Anticorpos Monoclonais. 5. Imunoterapia. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na UFCSPA sob financiamento proveniente dos seguintes projetos de pesquisa:

Projeto: Desenvolvimento de imunoterápicos oncológicos e testes preditivos para o Sistema Único de Saúde (SUS)
Financiamento: Pronon 2019, DECIT/Ministério da Saúde
Número único de Protocolo: 25000.172780/2019-38
Parceiro: Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Projeto: Desenvolvimento de Imunoterápicos no Rio Grande do Sul
Financiamento: FAPERGS RITES 2022
Número único de Protocolo: 22/2551-0000388-5
Parceiros: UNISC, PUCRS, UFRGS, UCSD, USP, UFRJ

Às mulheres que vieram antes de mim, que apesar de seus talentos, força e sonhos, não tiveram as mesmas oportunidades. Que suas histórias continuem a inspirar e que suas lutas nunca sejam esquecidas.

## PÁGINA DE AGRADECIMENTOS

A jornada do mestrado é uma travessia que, embora muitas vezes solitária, só se completa com o apoio, a orientação e o incentivo de muitas pessoas. A elas, expresso aqui minha mais profunda gratidão.

À minha orientadora, Cristina Bonorino. sou grata pela oportunidade e pela confiança depositada em mim desde o início. Sua orientação foi fundamental, não apenas pelo rigor científico, mas também pelo exemplo de dedicação e paixão pela imunologia.

Ao meu coorientador, Rodrigo Gassen, agradeço pela disponibilidade, pelas discussões produtivas e por trazer novas perspectivas. Suas ideias e seu bom humor foram um grande impulso para este trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunoterapia da UFCSPA, em especial ao José e a Claudia, pela parceria, pela ajuda nos experimentos e pelas conversas que tornaram o ambiente do laboratório um lugar de aprendizado e colaboração.

Agradeço aos membros da banca examinadora, por dedicarem seu tempo à leitura deste trabalho e por suas valiosas críticas e sugestões.

Aos meus pais, Vilmar e Cirlei, por serem a minha base, pelo amor incondicional e pelo incentivo aos estudos.

À minha querida irmã Laís, pelo apoio, sua torcida foi fundamental para que eu chegasse até aqui

Ao meu namorado, Arthur, por todo carinho, amor e suporte, principalmente nos momentos finais do mestrado.

Por fim, aos meus amigos Amanda, Fabiane, Ana e Lionel que mesmo distantes da rotina do laboratório, souberam oferecer as palavras de ânimo e momentos de leveza.

*"It's a matter of figuring out what the brakes are and taking them off."*
***— James P. Allison***

## RESUMO

A imunoterapia com anticorpos monoclonais que bloqueiam receptores inibitórios imunes como a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1) revolucionou o tratamento do câncer. O desenvolvimento de novas terapias e biossimilares exige metodologias analíticas validadas para caracterizar a capacidade de bloqueio funcional desses anticorpos. Embora a citometria de fluxo seja uma plataforma versátil, poucos ensaios são descritos para esta aplicação específica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um ensaio de citometria de fluxo para quantificar a capacidade de bloqueio da interação PD-1/PD-L1. Para isso, foi desenvolvido um ensaio onde a proteína recombinante PD-1 humana foi conjugada a beads de poliestireno. A capacidade de bloqueio foi medida pela inibição da ligação da proteína PD-L1 conjugada a um fluorocromo, às esferas com PD-1. O ensaio demonstrou inibição dose dependente na presença de um anticorpo monoclonal αPD-L1. A partir da curva de inibição, construída com concentrações no intervalo de 0,1 a 15 µg/mL, foi determinado um $IC_{50}$ médio de 3,122 µg/mL. A plataforma se mostrou precisa e robusta, sem diferença estatisticamente significativa entre três ensaios independentes (ANOVA de duas vias, $p = 0,2178$). Adicionalmente, a atividade de bloqueio foi validada em um ensaio funcional de co-cultura, no qual o anticorpo αPD-L1 restaurou significativamente a ativação de células T ($p = 0,0001$). Conclui-se que o ensaio desenvolvido é uma ferramenta precisa, reprodutível e rápida, adequada para a triagem funcional e o controle de qualidade de novos anticorpos monoclonais direcionados ao eixo PD-1/PD-L1.



Palavras-chave: Citometria de Fluxo; PD-1; PD-L1; Anticorpos Monoclonais; Imunoterapia.

## ABSTRACT

Immunotherapy with monoclonal antibodies that block inhibitory checkpoints such as PD-1/PD-L1 has revolutionized cancer treatment. The development of new therapies and biosimilars requires validated analytical methodologies to characterize the functional blocking capacity of these antibodies. Although flow cytometry is a versatile platform, few assays are described for this specific application. The objective of this work was to develop and validate a flow cytometry-based assay to quantify the blocking capacity of the PD-1/PD-L1 interaction. For this, an assay was developed where recombinant human PD-1 protein was conjugated to polystyrene microbeads. The blocking capacity was measured by the inhibition of binding of a fluorochrome-conjugated PD-L1 protein to the PD-1-coated beads. The assay demonstrated dose-dependent inhibition in the presence of an αPD-L1 monoclonal antibody. From the inhibition curve, constructed using concentrations ranging from 0.1 to 15 µg/mL, a mean $IC_{50}$ of 3.122 µg/mL was determined. The platform proved to be precise and robust, with no statistically significant difference between three independent experiments (two-way ANOVA, $p = 0.2178$). Additionally, the blocking activity was validated in a functional co-culture assay, in which the αPD-L1 antibody significantly restored T-cell activation ($p = 0.0001$). In conclusion, the developed assay is a precise, reproducible, and rapid tool suitable for the functional screening and quality control of new monoclonal antibodies targeting the PD-1/PD-L1 axis.



Key words: Flow Cytometry; PD-1; PD-L1; Monoclonal Antibodies; Immunotherapy.

## LISTA DE FIGURAS

Introdução – Figura 1. O Ciclo Câncer-Imunidade e a Ativação de Linfócitos T..... 24

## LISTA DE TABELAS

Introdução – Tabela 1. Resumo dos principais ensaios in vitro para a caracterização funcional de anticorpos monoclonais ..... 31

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

αPD-L1 – Anticorpo Monoclonal Anti-PD-L1

ABA – Ensaio de Ligação do Anticorpo (do inglês, *Antibody Binding Assay*)

ACA – Ensaio de Competição com Anticorpo (do inglês, *Antibody Competition Assay*)

ADCC – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos (do inglês, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*)

ADCP – Fagocitose Celular Dependente de Anticorpos (do inglês, *Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis*)

AF488 – Alexa Fluor 488

AIA – Ensaio de Apoptose Induzida por Anticorpos (do inglês, *Antibody-Induced Apoptosis*)

ANOVA – Análise de Variância (do inglês, *Analysis of Variance*)

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês, *Antigen-Presenting Cells*)

BLI – Interferometria de Biocamada (do inglês, *Bio-Layer Interferometry*)

Bregs – Células B Reguladoras

BSA – Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

BTLA – Linfócito B e Atenuador de Linfócitos T (do inglês, *B and T Lymphocyte Attenuator*)

CAFs – Fibroblastos Associados ao Câncer (do inglês, *Cancer-Associated Fibroblasts*)

CBA – Ensaio Citométrico em Esferas (do inglês, *Cytometric Bead Array*)

CD – Aglomerado de Diferenciação (do inglês, *Cluster of Differentiation*)

CDC – Citotoxicidade Dependente de Complemento (do inglês, *Complement-Dependent Cytotoxicity*)

cDNA – DNA Complementar

CDRs – Regiões Determinantes de Complementaridade (do inglês, *Complementarity-Determining Regions*)

CHO – Células de Ovário de Hamster Chinês (do inglês, *Chinese Hamster Ovary*)

CMTM6 – Proteína 6 da Família de Proteínas Transmembrana do Tipo Quimiocina (do inglês, *Chemokine-like Factor-like MARVEL Transmembrane Domain-containing 6*)

CTLs – Linfócitos T Citotóxicos (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocytes*)

CTLA-4 – Antígeno 4 de Linfócitos T Citotóxicos (do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*)

DCs – Células Dendríticas (do inglês, *Dendritic Cells*)

DECIT – Departamento de Ciência e Tecnologia

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*)

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Fab – Fragmento de Ligação ao Antígeno (do inglês, *Fragment, antigen-binding*)

FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FBS – Soro Fetal Bovino (do inglês, *Fetal Bovine Serum*)

Fc – Fragmento Cristalizável (do inglês, *Fragment, crystallizable*)

FcRn – Receptor Fc Neonatal

Fc-γR – Receptor para a Região Fc de IgG (Gama)

Foxp3 – Gene Forkhead box P3

Foxp3 – Fator de Transcrição Forkhead box P3

gMFI – Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência (do inglês, *Geometric Mean Fluorescence Intensity*)

GzmB – Granzima B

HAMA – Resposta de Anticorpo Humano Anti-camundongo (do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*)

HIP1R – Proteína 1 de Interação com a Huntingtina Relacionada (do inglês, *Huntingtin Interacting Protein 1 Related*)

$IC_{50}$ – Concentração Inibitória Média (do inglês, *Half-maximal Inhibitory Concentration*)

ICIs – Inibidores de Receptor inibitório Imune (do inglês, *Immune Receptor inibitório Inhibitors*)

ICOS – Coestimulador Induzível (do inglês, *Inducible T-cell COStimulator*)

IFN-γ – Interferon-gama

Ig – Imunoglobulina

IGC – Ensaio de Inibição de Crescimento Celular (do inglês, *Inhibition of Growth Assay*)

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional de Câncer

ITAMs – Motivos de Ativação Baseados em Tirosina de Imunorreceptores (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*)

ITIM – Motivo Inibitório Baseado em Tirosina de Imunorreceptor (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*)

ITSM – Motivo de Comutação Baseado em Tirosina de Imunorreceptor (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*)

$k_a$ – Constante de Associação

KD – Constante de Dissociação de Equilíbrio

$k_d$ – Constante de Dissociação

kDa – Quilodalton

LAG-3 – Gene 3 de Ativação de Linfócitos (do inglês, *Lymphocyte-Activation Gene 3*)

LAT – Transdutor de Ligação para Ativação de Células T (do inglês, *Linker for Activation of T cells*)

Lck – Quinase Específica de Linfócitos (do inglês, *Lymphocyte-specific kinase*)

mAbs – Anticorpos Monoclonais (do inglês, *Monoclonal Antibodies*)

MESF – Moléculas de Equivalente de Fluorocromo Solúvel (do inglês, *Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome*)

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)

MUC-1 Tn – Mucina 1, antígeno Tn

NCI – Instituto Nacional do Câncer (do inglês, *National Cancer Institute*)

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B

NK – Células Matadoras Naturais (do inglês, *Natural Killer*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBMCs – Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS – Tampão Salino Fosfato (do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PD-1 – Proteína de Morte Celular Programada 1 (do inglês, *Programmed Cell Death Protein 1*)

PD-L1 – Ligante da Proteína de Morte Celular Programada 1 (do inglês, *Programmed Death-Ligand 1*)

PD-L2 – Ligante da Proteína de Morte Celular Programada 2 (do inglês, *Programmed Death-Ligand 2*)

PE – Ficoeritrina

PFN – Perforina

PI3K/Akt – Via da Fosfoinositídeo 3-quinase/Akt

Pronon – Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

%RSD – Desvio Padrão Relativo Percentual (do inglês, *Percent Relative Standard Deviation*)

RNA – Ácido Ribonucleico

RPMI-1640 – Meio de Cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640

RUO – Para Uso Exclusivo em Pesquisa (do inglês, *Research Use Only*)

scRNA-seq – Sequenciamento de RNA de Célula Única (do inglês, *single-cell RNA sequencing*)

SHP-2 – Fosfatase de Tirosina contendo Domínio SH2 2 (do inglês, *SH2 domain-containing phosphatase 2*)

SPR – Ressonância Plasmônica de Superfície (do inglês, *Surface Plasmon Resonance*)

SUS – Sistema Único de Saúde

TCR – Receptor de Células T (do inglês, *T-Cell Receptor*)

TGF-β – Fator de Crescimento Transformador Beta (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*)

Tfh – Células T Foliculares Auxiliares

Th – Célula T Auxiliar (do inglês, *T helper*)

TIGIT – Receptor de Imunoglobulina de Célula T e Domínio ITIM (do inglês, *T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains*)

TIM-3 – Domínio de Mucin-3 contendo Imunoglobulina de Células T (do inglês, *T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3*)

TLSs – Estruturas Linfoides Terciárias (do inglês, *Tertiary Lymphoid Structures*)

TME – Microambiente Tumoral (do inglês, *Tumor Microenvironment*)

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*)

TOX – Proteína do Grupo de Alta Mobilidade TOX (do inglês, *Thymocyte selection-associated high mobility group box protein TOX*)

Tregs – Células T Reguladoras

TSLP – Linfopoietina Estromal Tímica (do inglês, *Thymic Stromal Lymphopoietin*)

UCSD – Universidade da Califórnia, San Diego

UFCSPA – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNISC – Universidade de Santa Cruz do Sul

USP – Universidade de São Paulo

VH – Domínio Variável da Cadeia Pesada (do inglês, *Variable domain of Heavy chain*)

VL – Domínio Variável da Cadeia Leve (do inglês, *Variable domain of Light chain*)

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

x g – aceleração da gravidade

Zap70 – Proteína Associada à Cadeia Zeta de 70 kDa (do inglês, *Zeta-chain-associated protein kinase 70*

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO** ..... 17
**2. REVISÃO DE LITERATURA** ..... 20
2.1. RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL E SEUS MECANISMOS DE REGULAÇÃO ..... 20
2.1.1. **A Sinapse Imunológica e a Ativação de Linfócitos T** ..... 21
2.1.2. **Receptores Inibidores da Ativação de Linfócitos T** ..... 24
2.2. BLOQUEADORES DE RECEPTORES INIBITÓRIOS IMUNES ..... 25
2.2.1. **O Eixo PD-1/PD-L1** ..... 26
2.2.2. **Anticorpos Monoclonais como Inibidores de Receptor Inibitório** ..... 28
2.3. METODOLOGIAS PARA A CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ANTICORPOS TERAPÊUTICOS ..... 31
2.3.1. **Visão Geral dos Ensaios de Função e Bloqueio** ..... 31
2.3.2. **O Papel da Citometria de Fluxo na Avaliação de Anticorpos** ..... 33
**3. OBJETIVOS** ..... 35
3.1. OBJETIVO GERAL ..... 35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: ..... 35
**4. ARTIGO CIENTÍFICO:** ..... 36
**5. DISCUSSÃO** ..... 37
**6. CONCLUSÕES** ..... 39
**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES À INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO** ..... 40
**8. ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA** ..... 50
**9. ANEXO B – CURRÍCULO LATTES** ..... 57

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento anormal e descontrolado de células que invadem os tecidos adjacentes e se disseminam para outros órgãos, processo conhecido como metástase. Esse fenômeno é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer (WHO, 2023). Segundo a OMS, a doença é a segunda causa de morte no mundo e em 2020 foi responsável por aproximadamente 10 milhões de mortes, sendo a causa de 1 a 6 mortes neste ano. Câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os tipos mais comuns em homens, enquanto câncer de mama, colorretal, pulmão, colo de útero e tireoide são os mais frequentes entre mulheres (WHO, 2023).

No Brasil, são previstos 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025 e as regiões Sul e Sudeste concentram cerca de 70% da incidência (INCA, 2023). Dados do INCA mostram que os custos diretos do governo federal com o tratamento do câncer aproximaram-se de 4 bilhões em 2018 (INCAa, 2021). O desenvolvimento de terapias de menor custo e de origem nacional se faz necessário tendo em vista a epidemiologia da doença.

Atualmente, o manejo oncológico compreende uma abordagem multimodal que integra intervenções como a ressecção cirúrgica, a radioterapia, a quimioterapia e, mais recentemente, a imunoterapia. A imunoterapia atua modulando componentes celulares e moleculares da resposta imunológica, restaurando a vigilância imune antitumoral (NCI, 2023).

Dentro da imunoterapia estão os bloqueadores de receptores inibitórios imunes, mais especificamente, moléculas e células que atuam no desbloqueio do sistema imunológico. Receptores inibitórios fazem parte da fisiologia do sistema imune e seu papel principal é prevenir uma resposta imune exacerbada e manter a homeostase. Os receptores inibitórios são ativados quando correceptores da superfície de células T ligam a correceptores de ativação de outras células, como células tumorais. Esses correceptores são chamados de proteínas de receptores inibitórios. A interação entre essas proteínas desencadeia um sinal inibitório da ativação das células T. No contexto tumoral, isso impede a resposta antitumoral mediada por células T citotóxicas e auxiliares (NCIa, 2023).

A imunoterapia baseada em inibidores de receptores inibitórios imunes consiste em bloquear a ligação entre o ligante e o receptor inibitório, evitando a inibição da ativação das células T, permitindo a resposta imune antitumoral (NCIa, 2023).

Anticorpos monoclonais (mAbs) são imunoglobulinas (Ig) que possuem regiões variáveis específicas para um único epítopo. Inicialmente, esses anticorpos eram obtidos a partir de um único clone de linfócito B (WEINER et al., 2010). Atualmente, por meio da engenharia genética é possível produzi-los a partir da combinação de genes de múltiplas fontes de linfócitos B, como de camundongos e humanos (CHAMES et al., 2009).

A terapia baseada em mAbs representa um dos segmentos que mais cresceram no mercado farmacêutico nas últimas décadas. Em 2023, o mercado global de anticorpos foi avaliado em 237,64 bilhões de dólares e a projeção é de uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 11% na próxima década, com expectativa de 679,03 bilhões de dólares para 2033 (ABOUL-ELLA, et al., 2024).

A avaliação da eficácia de mAbs em inibir a ligação entre proteínas de receptores inibitórios imunes é um passo essencial e crítico para o desenvolvimento de novas terapias. A acurácia e a reprodutibilidade dessa quantificação são primordiais, pois delineiam o potencial terapêutico desses mAbs, informando a seleção de candidatos para ensaios pré-clínicos e clínicos. Atualmente, a ressonância de plasmônica de superfície (SPR) é considerada o “padrão ouro” para avaliação quantitativa da afinidade e cinética de ligação entre biomoléculas (KHAN et al., 2012; MAYNARD et al., 2009), incluindo a taxa de inibição de interações proteicas. No entanto, é uma metodologia de custo elevado (TANG; ZENG; LIANG, 2010), o que restringe seu uso na triagem inicial de novos alvos. Nesse contexto, a citometria de fluxo emerge como uma ferramenta de fácil acesso e grande versatilidade, podendo auxiliar na triagem inicial e na caracterização da capacidade de bloqueio de novos mAbs. Por permitir a multiplexação, esta abordagem se torna ideal para a avaliação da interação de mAbs bi-específicos com diferentes alvos ou epítopos em um único experimento.

Neste projeto, desenvolvemos um ensaio de citometria de fluxo para avaliar anticorpos de bloqueio dos receptores inibitórios PD1/PD-L1. A citometria de fluxo é uma técnica sensível e acessível, com capacidade de multiplexação. Utilizando a proteína PD-L1 conjugada a uma molécula fluorescência e esferas de poliestireno recobertas com PD-1, quantificamos a capacidade de bloqueio da ligação PD-1/PD-L1 de um anticorpo anti-PD-

L1, validando o ensaio para triagem de novos mAbs contra PD-L1. Adicionalmente, nosso trabalho abre perspectivas para o uso desta plataforma na avaliação de múltiplos alvos.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1. RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL E SEUS MECANISMOS DE REGULAÇÃO

Tumores sólidos representam um ecossistema complexo e estruturado (DE VISSER; JOYCE, 2023). O microambiente tumoral (TME) é formado por uma rica diversidade de células imunes, fibroblastos associados ao câncer (CAFs), células endoteliais e pericitos, cuja composição e estado funcional variam entre pacientes e estágios do tumor. Essas células, longe de serem espectadoras passivas, desempenham papéis cruciais em todas as etapas da progressão da doença, desde a o estabelecimento da lesão primária, invasão de tecidos adjacentes e até a disseminação e o crescimento metastático (DE VISSER; JOYCE, 2023). No microambiente tumoral, a interação com o sistema imunológico é decisiva. Embora a imunidade adaptativa tenha o potencial de reconhecer e eliminar células tumorais, muitos tumores em desenvolvimento conseguem evadir esse ataque (ANDERSON; SIMON, 2020). O *framework* que descreve essa dinâmica de vigilância e evasão é conhecido como o "ciclo câncer-imunidade" (CHEN; MELLMAN, 2013).

O ciclo câncer-imunidade inicia-se com a disponibilidade de antígenos associados ao tumor e neoantígenos advindos de células tumorais em morte (BOON et al., 1994). Essas moléculas são capturadas e processadas por células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas (DCs), que migram para os órgãos linfoides secundários. Nesses locais, as DCs ativam os linfócitos T (CD8+ e CD4+) específicos para o tumor. Subsequentemente, essas células T ativadas, incluindo os linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTLs), migram e buscam infiltrar o TME para reconhecer e destruir as células tumorais, liberando mais antígenos e perpetuando o ciclo (CHEN; MELLMAN, 2013). No entanto, a progressão e a eficácia da fase efetora do ciclo são condicionadas pelo fenótipo imunológico do tumor. Este conceito se manifesta em três imunótipos principais, cada um refletindo onde ocorrem as etapas limitantes do ciclo (CHEN; MELLMAN, 2017; HEGDE; CHEN, 2020; HERBST et al., 2014). Em um cenário imuno inflamado, os tumores exibem um infiltrado imune abundante no parênquima. Nesses tumores, a presença de estruturas linfoides terciárias (TLSs) pode fornecer estimulação adicional, aumentando a capacidade funcional, a sobrevivência e a proliferação dos linfócitos infiltrantes, permitindo que o ciclo se perpetue (FRIDMAN et al., 2023; MELLMAN et al., 2023; SCHUMACHER; THOMMEN, 2022).

Em contraste, no imunótipo excluído, os linfócitos T CD8+ estão presentes, mas ficam espacialmente restritos ao estroma peritumoral, impedidos de contatar as células neoplásicas. Essa compartimentalização é frequentemente mediada por uma rede densa de fibras de matriz alinhadas, depositadas por CAFs, num processo influenciado pela sinalização de TGF-β (MARIATHASAN et al., 2018). Por fim, o fenótipo de deserto imunológico é caracterizado por ausência de infiltrado de células T no TME, uma condição que pode resultar da falta de quimiocinas atrativas ou de mecanismos de repulsão ativos (HERBST et al., 2014).

A resposta imune antitumoral é finamente regulada por diversos mecanismos, que podem tanto promovê-la quanto suprimi-la (ANDERSON; SIMON, 2020). As células tumorais frequentemente expressam moléculas de ponto de checagem imune, como PD-L1, que se ligam a receptores inibitórios como PD-1 nas células T, induzindo exaustão das células T e suprimindo a resposta antitumoral (BUTTE et al., 2007; CHEN; FLIES, 2013).

Além disso, células T reguladoras (Tregs), que expressam Foxp3, são cruciais para manter a auto tolerância, mas seu acúmulo no tecido tumoral pode suprimir a imunidade antitumoral (TAY; TANAKA; SAKAGUCHI, 2023). As células B reguladoras (Bregs) também podem secretar citocinas imunossupressoras como IL-10 e IL-35, ou expressar PD-L1, contribuindo para a supressão da resposta de células T (MICHAUD et al., 2020; MIRLEKAR et al., 2022). A complexidade desses mecanismos regulatórios ressalta a necessidade de múltiplas estratégias terapêuticas.

### 2.1.1. **A Sinapse Imunológica e a Ativação de Linfócitos T**

O sistema imune adaptativo compreende células e mecanismos especializados que detectam e respondem a antígenos específicos com memória. Ele é composto majoritariamente de linfócitos B e T que são regulados para proteger o hospedeiro de patógenos externos e manter a homeostase. Ambos reconhecem antígenos via receptores específicos, no entanto somente linfócitos T necessitam que o antígeno seja processado por APCs e apresentado em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Linfócitos T são classificados em linfócitos T auxiliares CD4+ e linfócitos T citotóxicos CD8+. Linfócitos T CD4+ apresentam funções efetoras mediadas por fatores solúveis e interação com outras células com reconhecimento da apresentação via MHC classe II, já linfócitos T CD8+ apresentam função de citotoxicidade de células específicas via

reconhecimento de MHC classe I. Linfócitos B efetores diferenciados secretam anticorpos para antígenos específicos e podem agir como células APCs para linfócitos T (BATISTA; HARWOOD, 2009; HARDING; UNANUE, 1990). Uma série de eventos precede a ativação e expansão de linfócitos, a fim de garantir a especificidade ao alvo e evitar danos ao hospedeiro (CHI; PEPPER; THOMAS, 2024).

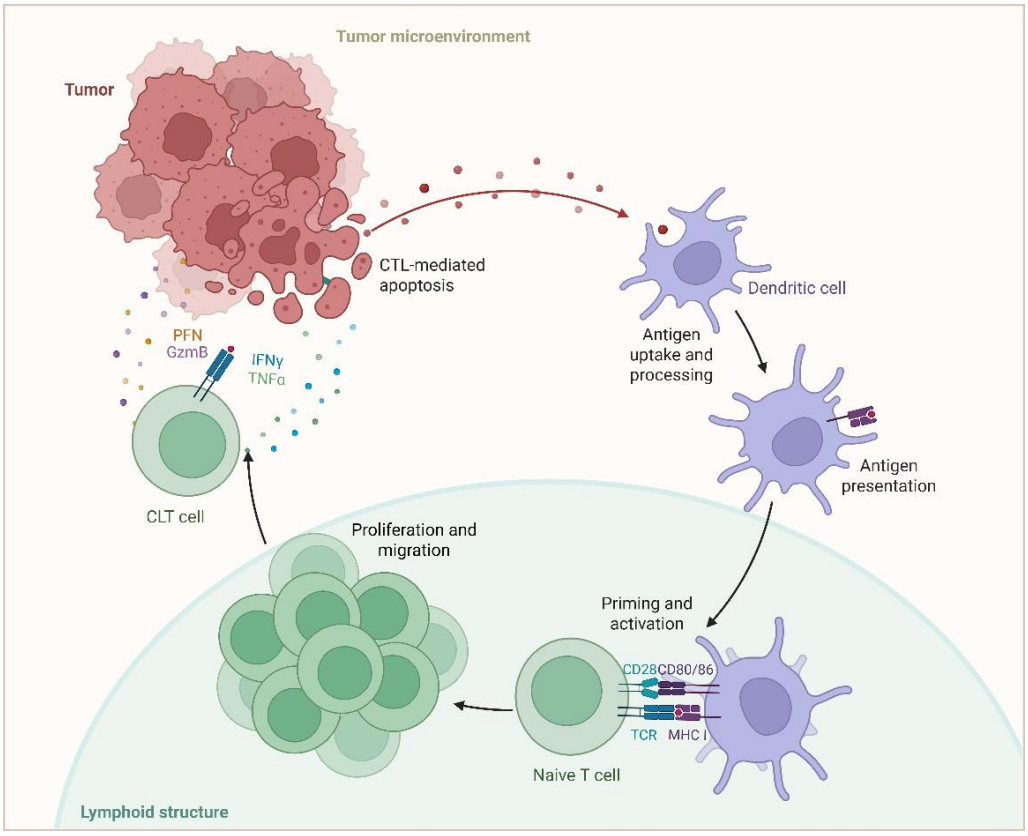
A exigência de apresentação mediada por MHC ocorre no que é conhecido como sinapse imunológica, uma interface altamente organizada e dinâmica formada entre um linfócito T e uma APC. O processo se inicia com o reconhecimento do complexo MHC-peptídeo pelo receptor de célula T (TCR). Este primeiro sinal, gerado pelo engajamento do TCR, é essencial (GRAKOUI, 1999; HUPPA; DAVIS, 2003; UNANUE, 1984), mas não suficiente para a ativação completa da célula T. A ligação do TCR ao MHC-peptídeo desencadeia uma série complexa de eventos de fosforilação, onde moléculas como CD4 e CD8 recrutam a cinase Lck, que fosforila os motivos de ativação por tirosina imunorreceptores (ITAMs) presentes nas caudas citoplasmáticas das proteínas CD3 e TCR ζ. A fosforilação dos ITAMs recruta e ativa a cinase Zap70, que por sua vez fosforila a proteína adaptadora LAT, recrutando moléculas de sinalização a jusante e propagando o sinal intracelular (DUSTIN, 2014; HUPPA; DAVIS, 2003; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009). Para evitar a anergia, um estado de hiporresponsividade, um segundo sinal coestimulatório é indispensável para a ativação completa do linfócito T (BRETSCHER; COHN, 1970; JUNE et al., 1987; MUELLER; JENKINS; SCHWARTZ, 1989). Este sinal é tipicamente fornecido pela ligação do CD28, expresso na maioria das células T CD4+ e CD8+ às moléculas da família B7, primariamente B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), presentes nas APCs (SHARPE; FREEMAN, 2002). O CD28 promove a sobrevivência, proliferação, metabolismo e produção de citocinas das células T através de vias de sinalização como a PI3K/Akt e NF-κβ. Outras moléculas coestimulatórias, como ICOS, 4-1BB e OX-40, também contribuem para a ativação das células T (CROFT, 2009). CTLA-4, por exemplo, compete com o CD28 pela ligação a CD80/86, atuando como um "freio" para a ativação de células T e induzindo hiporresponsividade ou anergia (QURESHI et al., 2011; TAYLOR et al., 2004). A sinapse imunológica não é apenas um ponto de contato, mas uma plataforma complexa de comunicação que dita o destino funcional do linfócito. Além da sinalização do TCR e da coestimulação, as integrinas são importantes para o tráfego de células T, mediando interações entre células e a matriz extracelular, o que

estabiliza as interações com as APCs e aprimora a transdução de sinais (SHIMIZU et al., 1990).

Além dos dois primeiros sinais, um terceiro sinal, composto por citocinas, é crucial para a completa polarização e diferenciação dos linfócitos T em seus diversos subtipos efetores (CURTSINGER et al., 1999). Essas citocinas, liberadas no microambiente pela APC e outras células, direcionam as células T CD4+ virgens para se diferenciarem em subtipos especializados (HSIEH et al., 1993; MOSMANN et al., 1986), como Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e T foliculares auxiliares (Tfh), cada um com um perfil de expressão de fatores de transcrição, como T-bet para Th1 e GATA3 para Th2, e um repertório de citocinas específico para combater diferentes tipos de patógenos ou células alteradas (SZABO et al., 2000; ZHENG; FLAVELL, 1997). Por exemplo, IL-12 e IFN-γ promovem a diferenciação Th1, enquanto IL-4, IL-25, IL-33 e TSLP favorecem a diferenciação Th2. Similarmente, IL-6, IL-21, IL-23 e IL-1β induzem a diferenciação Th17 (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010; ZHU, 2017). Este terceiro sinal não apenas influencia a diferenciação das células T auxiliares, mas também é fundamental para a funcionalidade e expansão de CTLs, que são os principais responsáveis pela função de *killing* de células específicas. Citocinas como IL-2 são cruciais para a proliferação e manutenção das células T ativadas. O conjunto desses três sinais, reconhecimento do antígeno, coestimulação e ambiente de citocinas, define a amplitude, a qualidade e a duração da resposta imune adaptativa (MELLMAN et al., 2023; MESCHER et al., 2006). Contudo, para garantir a homeostase e prevenir danos teciduais ou autoimunidade decorrentes de uma resposta exacerbada, esse elaborado sistema de ativação é rigorosamente contrabalanceado por uma série de vias inibitórias.

Figura 1 - O Ciclo Câncer-Imunidade e a Ativação de Linfócitos T.

O ciclo de resposta imune começa com a liberação de antígenos tumorais, consequência da morte celular induzida por CTLs. DCs capturam e processam esses antígenos, migrando para estruturas linfoides para apresentá-los a linfócitos T virgens (*naive)* via MHC de classe I. A ativação, dependente da coestimulação por CD28/CD80/86, leva à proliferação e diferenciação de novos CTLs. Estes, por sua vez, migram para o tumor e matam outras células tumorais, perpetuando a resposta imune.




Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Criado com Biorender.

### 2.1.2. **Receptores Inibidores da Ativação de Linfócitos T**

Para manter a homeostase do sistema imune e prevenir a autoimunidade, a ativação dos linfócitos T é rigorosamente controlada por uma série de receptores inibitórios. Essas moléculas, frequentemente referidas como receptores inibitórios imunológicos, modulam a resposta imune, sendo cruciais para a manutenção da tolerância periférica (BINNEWIES, et al., 2018; THORSSON et al., 2018). A supressão de sinalização e a supressão metabólica são duas das principais causas de inibição imunológica. A supressão de sinalização é evidenciada pelas formas como as células tumorais reduzem a atividade dos imunorreceptores estimuladores e aumentam a atividade dos imunorreceptores inibidores (HE; XU, 2020).

Um número de imunorreceptores inibitórios foram identificados e estudados com o evoluir do tempo, alguns deles, são PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, TIGIT, GITR e BTLA (WYKES; LEWIN, 2018). Esses receptores geralmente utilizam motivos de sinalização monotirosina, como o motivo inibitório baseado em tirosina de imunorreceptor (ITIM) e o

motivo de comutação baseado em tirosina de imunorreceptor (ITSM), para transmitir sinais inibitórios (HE; XU, 2020). O primeiro e mais bem caracterizado desses receptores é o CTLA-4. Expresso em células T ativadas e de forma constitutiva em células Tregs, o CTLA-4 possui uma afinidade muito maior pelas moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) do que o receptor coestimulatório CD28. Ao competir com o CD28 por esses ligantes nas APCs, o CTLA-4 efetivamente interrompe o segundo sinal de ativação, limitando a proliferação e a função efetora das células T (SHARPE; FREEMAN, 2002). O Gene de Ativação de Linfócitos 3 (LAG-3) é expresso em células T ativadas e se liga a moléculas de MHC de classe II com alta afinidade, contribuindo para a regulação negativa da função de células T CD4+ e CD8+ (ANDERSON; JOLLER; KUCHROO, 2016; WORKMAN; VIGNALI, 2003). Da mesma forma, o TIGIT (Receptor de Imunoglobulina de Célula T e Domínio ITIM) compete com o receptor coestimulatório CD226 pela ligação ao ligante CD155, transmitindo sinais inibitórios que limitam as respostas de células T e NK (YU et al., 2008; YU et al., 2008). Outro receptor inibitório fundamental é o da interação entre os receptores Proteína de Morte Celular Programada 1 (PD-1) e o seu ligante PD-L1. Induzido em células T, B e NK cronicamente ativadas, o PD-1 interage com seus ligantes, PD-L1 e PD-L2 (FREEMAN et al., 2000). A interação entre essas duas proteínas leva à exaustão das células T, um estado de disfunção caracterizado pela redução ou ausência da função efetora de células T (BLANK et al., 2019; PHILIP et al., 2017). Essa interação é usada fisiologicamente para limitar a extensão da resposta inflamatória autoimune, manter a tolerância fetal durante a gravidez e prevenir rejeição de transplante de órgãos, mas também é explorada por células tumorais para manter a tolerância imune ao tumor (JOHNSON et al., 2022). Por serem moléculas de superfície, assim como outras moléculas de receptor inibitório imune, sua interação pode ser facilmente inibida pelo bloqueio com anticorpos mAbs (HE; XU, 2020).

## 2.2. BLOQUEADORES DE RECEPTORES INIBITÓRIOS IMUNES

A exploração da acessibilidade de superfície desses receptores inibitórios possibilitou o desenvolvimento de mAbs que atuam como bloqueadores de receptores inibitórios, reativando a resposta imune antitumoral (SHARMA et al., 2023) ao bloquear as interações inibitórias mediadas por esses receptores. Por exemplo, anticorpos anti-PD-1 (como nivolumabe e pembrolizumabe) e anti-PD-L1 (como atezolizumabe e durvalumabe) impedem a ligação entre PD-1 e PD-L1, o que reverte a inibição da sinalização do TCR nas

células T exaustas ou previne sua exaustão, restaurando sua capacidade citotóxica e de produção de citocinas. Esta abordagem tem demonstrado eficácia, na ativação das células T CD8+ (MELLMAN et al., 2023; SHARMA et al., 2023). De forma análoga, anticorpos anti-CTLA-4 (como ipilimumabe) promovem a ativação das células T tanto por bloquear a inibição direta do CTLA-4 sobre as células T efetoras quanto por mediar a depleção de T regs, que são grandes supressoras da imunidade antitumoral no TME, através de mecanismos dependentes de Fc-γR, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e a fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) (SIMPSON et al., 2013; SELBY et al., 2013). Em suma, a exploração desses receptores de superfície levou ao desenvolvimento de mAbs como inibidores de receptores inibitórios, uma estratégia terapêutica delineada para reativar a imunidade antitumoral. Considerando sua proeminência clínica, a biologia do eixo PD-1/PD-L1 será o foco da próxima seção, que será seguida por uma discussão sobre a implementação desses anticorpos monoclonais como terapia.

### 2.2.1. **O Eixo PD-1/PD-L1**

O PD-1 consiste em um único domínio IgV (imunoglobulina variável), uma haste, uma região transmembrana e uma cauda intracelular com dois motivos de sinalização baseados em tirosina: ITIM e ITSM (ISHIDA et al.,1992). A ligação do PD-1 ao seus ligantes (PD-L1 ou PD-L2) desencadeia a fosforilação de ITIM e ITSM, que recruta e ativa a fosfatase de tirosina 2 contendo domínio SH2 (SHP-2). A SHP-2 ativada desfosforila uma série de moléculas de sinalização a jusante do TCR e CD28, suprimindo assim a ativação e função das células T (CALLAHAN; POSTOW; WOLCHOK, 2016; BAUMEISTER, 2016). Moléculas de PD-1 internalizadas podem ser ubiquitinadas pela FBXO38 para degradação proteassomal ou recicladas de volta para a superfície com a ajuda de TOX (BORDON, 2019). Já o PD-L1 de superfície passa por constante internalização, seguida por reciclagem ou degradação. Uma proteína chaperona, a CMTM6, regula a reciclagem do PD-L1, associando-se ao PD L1 tanto na membrana plasmática quanto nos endossomos para facilitar a reciclagem e inibir a ubiquitinação e degradação pelo lisossomo (BURR et al., 2017). Diversas proteínas foram identificadas como reguladoras da degradação lisossomal do PD-L1, como HIP1R, que direciona o PD-L1 ao lisossomo (WANG, et al., 2019). A glicosilação e outras modificações regulam a estabilidade e degradação do PD-L1, influenciando a detecção e função do PD-L1 em células tumorais (HE; XU, 2020). Já PD-L1 ou PD-L2,

expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos ou células tumorais, interagem em *trans* com PD-1 na superfície das células T para induzir sinalização inibitória (CURIEL et al., 2003). Células tumorais também podem secretar vesículas extracelulares, principalmente na forma de exossomos, contendo PD-L1 para ativar a via do PD-1, suprimindo a atividade das células T no linfonodo de drenagem (ZHAOa et al., 2018). Além do PD-1, PD-L1 pode interagir em *cis* com CD80, o que pode interromper as interações PD-L1/PD-1 e CD80-CTLA-4, mas preservar a capacidade do CD80 de ativar a sinalização do CD28 (ZHAOb et al., 2019). Logo, a interação cis PD-L1-CD80 desempenha papéis positivos na imunidade antitumoral ao inibir as funções de PD-1 e CTLA-4 (HE; XU, 2020). Após a interação com o ligante, o PD-1 é fosforilado para exercer sua função inibitória. Seu domínio citoplasmático contém um ITIM e um ITSM. O ITSM fosforilado recruta principalmente a SHP2 para desfosforilar moléculas de sinalização chave (CD3 e CD28) e reduzir o nível de ativação (HUI, et al., 2017). O PD-1 inibe tanto a sinalização antigênica quanto a coestimulatória, translocando-se para a sinapse imunológica em células T ativadas, ficando próximo ao TCR e ao CD28. A SHP2 prefere significativamente o CD28 ao CD3, inibindo a via PI3K-AKT do CD28 de maneira dependente do ITSM e independente do ITIM, mas também pode inibir a fosforilação do CD3 e moléculas de sinalização *downstream* como ZAP70. Além de seus papéis inibitórios na sinalização das células T, a SHP2 também pode ativar a sinalização do TCR revertendo a fosforilação inibitória do CD3 pela LCK mediada. O sequestro de SHP2 pelo PD-1 fosforilado impede que a SHP2 estimule a atividade da LCK, contribuindo para a supressão da sinalização das células T (CALLAHAN; POSTOW; WOLCHOK, 2016; BAUMEISTER, 2016).

A investigação da interação imunossupressora de moléculas de receptor inibitório entre APCs e células T levou ao desenvolvimento de novas terapias, algumas já licenciadas para o tratamento do câncer, que aumentam a resposta imune através do uso de mAbs que bloqueiam moléculas de receptor inibitório imune (WYKES; LEWIN, 2018). Anticorpos contra PD-1 (pembrolizumab e nivolumab), CTLA-4 (ipilimumab) e PDL-1 (B7-H1) (atezolizumab, avelumab e durvalumab) são exemplos licenciados para uso como monoterapia ou em combinação para vários tipos de câncer (WYKES; LEWIN, 2018).

### 2.2.2. **Anticorpos Monoclonais como Inibidores de Receptor Inibitório**

Os mAbs representam uma classe de agentes terapêuticos que transformaram o tratamento do câncer. A natureza monoclonal desses anticorpos, que define uma população homogênea de imunoglobulinas provenientes de um único clone de linfócito B, confere-lhes especificidade para um único epítopo (CARTER, 2006; SCOTT; WOLCHOK; OLD, 2012). Isso os distingue fundamentalmente das preparações policlonais, permite um direcionamento preciso ao alvo e minimiza o potencial de reatividade cruzada. No sistema imune humano, as imunoglobulinas são classificadas em cinco isotipos principais, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, com base na estrutura de sua cadeia pesada, o que define suas propriedades estruturais e funcionais distintas. A maioria dos mAbs terapêuticos aprovados é de IgGs, o que se deve a uma combinação de propriedades biológicas e farmacocinéticas favoráveis (WEINER; SURANA; WANG, 2010). As IgGs, com exceção da IgG3, possuem a maior meia-vida sérica entre todos os isotipos, de aproximadamente 21 dias, um atributo diretamente ligado à sua capacidade de interagir com o receptor Fc neonatal (FcRn), que a resgata da via de degradação catabólica. Adicionalmente, a estrutura monomérica simples facilita a produção em larga escala e a distribuição tecidual, em oposição às estruturas poliméricas mais complexas como IgA, dimérica, e IgM, pentamérica (CARTER, 2006).

Os mAbs da classe IgG apresentam estrutura canônica de heterotetrâmero com aproximadamente 150 kDa e são compostos por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves idênticas, unidas por pontes de dissulfeto para formar uma molécula simétrica em "Y". Essa arquitetura é funcionalmente bipartida: os dois braços idênticos formam os fragmentos de ligação ao antígeno (Fab), que contêm os domínios variáveis das cadeias pesada (VH) e leve (VL) e atuam como domínio de reconhecimento do antígeno. A especificidade é conferida por seis alças hipervariáveis e as regiões determinantes de complementaridade (CDRs), que formam o sítio de ligação ao antígeno. A base do mAb compreende o fragmento cristalizável (Fc), responsável por engajar o sistema imune do hospedeiro e mediar as funções efetoras (CARTER, 2006; CHAN; CARTER, 2010; SCOTT; WOLCHOK; OLD, 2012; WEINER, 2015).

A tecnologia de hibridoma, desenvolvida por Köhler e Milstein em 1975, representou um marco fundamental que possibilitou, pela primeira vez, a produção de mAbs (KÖHLER;

MILSTEIN, 1975). Contudo, os mAbs de primeira geração eram de origem murina, o que resultava em uma significativa imunogenicidade em pacientes, manifestada como uma resposta imune do tipo HAMA (*Human Anti-Mouse Antibody*). Essa resposta não apenas acelerava a depuração do anticorpo, reduzindo sua eficácia, como também apresentava riscos de segurança (KIMBALL et al., 1995). Para superar essa limitação, foram desenvolvidas sucessivas gerações de anticorpos através de engenharia genética. Inicialmente, surgiram os anticorpos quiméricos (sufixo -ximab), nos quais os domínios variáveis murinos eram fusionados a domínios constantes humanos (MORRISON et al., 1984). Subsequentemente, os anticorpos humanizados (sufixo -zumab) foram criados por meio do enxerto de CDRs (*CDR grafting*), uma técnica que transplanta apenas as regiões determinantes de complementaridade murinas para um esqueleto de imunoglobulina humana (JONES et al., 1986). A geração mais avançada consiste nos anticorpos totalmente humanos (sufixo -umab), produzidos por tecnologias como *phage display* (HOOGENBOOM, 2005) ou a partir de camundongos transgênicos que expressam locos de imunoglobulinas humanas (LONBERG, 2005). Mais recentemente, um avanço tecnológico emergiu com a capacidade de prospectar diretamente o repertório imune humano. Essa abordagem combina o isolamento de células B únicas com o sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq), o que permite a recuperação direta das sequências pareadas das cadeias pesada e leve de anticorpos de interesse (DEKOSKY et al., 2013). A grande vantagem desta metodologia é a capacidade de isolar anticorpos que já foram selecionados e otimizados pelo sistema imune do próprio paciente, como em resposta a infecções ou vacinas, representando uma nova fronteira na descoberta de mAbs terapêuticos.

A eficácia clínica dos mAbs no câncer deriva de múltiplos mecanismos, que podem incluir o bloqueio de ligantes e vias de sinalização de receptores de fatores de crescimento, como os da família EGFR. Ou ainda, os anticorpos podem induzir apoptose, normalizar taxas de crescimento tumoral ou sensibilizar as células tumorais a agentes quimioterápicos (SCOTT; WOLCHOK; OLD, 2012; WEINER, 2015). Outros mecanismos importantes de ação incluem a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), onde células NK, macrófagos e neutrófilos, entre outras células efetoras, reconhecem células tumorais revestidas por anticorpos via receptores Fc-γR, como FcγRIIIA, também conhecido como CD16A, resultando na liberação de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas, que induzem a apoptose da célula alvo. A citotoxicidade dependente do complemento (CDC)

é outro mecanismo, que resulta na lise das células tumorais pela ativação da cascata do complemento e formação do complexo de ataque à membrana (CARTER, 2006; CHAN; CARTER, 2010; SCOTT; WOLCHOK; OLD, 2012; WEINER, 2015).

A principal aplicação e avanço recente dos mAbs na imunoterapia do câncer reside na estratégia de bloqueio de receptores inibitórios imunes. Essa estratégia se baseia no bloqueio de receptores ou ligantes que suprimiriam a resposta antitumoral mediada pelas células T. Os mAbs inibidores de receptores inibitórios atuam desativando as vias de regulação negativa do sistema imunológico, permitindo que as células T recuperem ou mantenham sua atividade citotóxica contra as células tumorais (CHEN; FLIES, 2013; CHEN; MELLMAN, 2017; SCOTT; WOLCHOK; OLD, 2012).

Atualmente, diversos mAbs inibidores de receptores inibitórios imunes são amplamente empregados na prática clínica. Os anticorpos anti-PD-1, como nivolumab e pembrolizumab, bloqueiam o receptor PD-1 nas células T. Ao impedir a ligação de PD-1 aos seus ligantes (PD-L1 e PD-L2), esses mAbs restauram a sinalização do TCR e combatem a exaustão das células T (BRAHMER et al., 2010). Os anticorpos anti-PD-L1, como avelumab, atezolizumab e durvalumab, atuam ligando-se diretamente ao ligante PD-L1, que é frequentemente expresso em células tumorais e APCs. Ao neutralizar o PD-L1, esses mAbs impedem sua interação tanto com PD-1 quanto com B7-1, o que restaura a atividade efetora das células T (BRAHMER et al., 2012). Os anticorpos anti-CTLA-4, como ipilimumab e tremelimumab, bloqueiam a CTLA-4. Esta molécula compete com o coestimulador CD28 pelos ligantes B7-1/B7-2 nas APCs, atenuando a ativação das células T. O bloqueio da CTLA-4 pelos mAbs anti-CTLA-4 não só reduz essa competição, mas também pode levar à depleção de células Tregs no microambiente tumoral, amplificando a resposta imune antitumoral (LEACH; KRUMMEL; ALLISON, 1996; SIMPSON et al., 2013). Mais recentemente, foram aprovados os anticorpos anti-LAG-3, como relatlimabe, que visam outro receptor inibitório que interage com MHC de classe II, oferecendo uma nova via para o bloqueio de *receptor inibitório* (TAWBI et al., 2022). mAbs que têm como alvo o receptor co-inibitório TIGIT, como tiragolumabe (CHO et al., 2022), estão em fases avançadas de estudo clínico. Na mesma linha, o receptor TIM-3, outro marcador associado à exaustão de células T (SAKUISHI et al., 2010), e o BTLA (WATANABE et al., 2003) são alvos de anticorpos de bloqueio em investigação, com o potencial de expandir ainda mais as estratégias de bloqueio de receptor inibitório para otimizar a função de células T e NK.

## 2.3. METODOLOGIAS PARA A CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ANTICORPOS TERAPÊUTICOS

### 2.3.1. **Visão Geral dos Ensaios de Função e Bloqueio**

A avaliação da capacidade de bloqueio de mAbs inibidores de receptores inibitórios imunes é essencial para determinar sua eficácia inibitória e consequentemente sua eficácia clínica. Na literatura, são descritos ensaios para avaliar a capacidade de bloqueio de mAbs. A Tabela 1 descreve o resumo dos principais ensaios *in vitro* para avaliar a capacidade funcional de mAbs e as respectivas metodologias empregadas em cada um.

Tabela 1 - Resumo dos principais ensaios *in vitro* para a caracterização funcional de anticorpos monoclonais. Para cada ensaio, são apresentados o objetivo principal, o princípio metodológico, as técnicas de leitura mais comuns para a aquisição de dados e a referência correspondente.

| Nome do Ensaio (Acrônimo) | Objetivo Principal | Princípio do Método | Técnica de Leitura | Referências |
|---|---|---|---|---|
| Ensaio de Citotoxicidade Dependente de Anticorpos (ADCC) | Avaliar a capacidade do mAb de recrutar células imunes (ex: NK) para lisar células-alvo. | Células-alvo são opsonizadas com o mAb e co-cultivadas com células efetoras. | Fluorimetria, luminometria. | CHEN et al., 2021 LALLEMAND et al., 2017 |
| Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC) | Avaliar a capacidade do mAb de ativar a via clássica do complemento para lisar células-alvo. | Células-alvo são opsonizadas com o mAb na presença de uma fonte de complemento (ex: soro humano). | Espectrofotometria, fluorimetria, luminometria. | REFF et al., 1994 |
| Ensaio de Apoptose Induzida por Anticorpos (AIA) | Avaliar a capacidade do mAb de induzir diretamente apoptose na célula-alvo. | Células-alvo são tratadas com o mAb e marcadores de diferentes estágios da apoptose são avaliados. | Microscopia de fluorescência, Western Blot. | MATTES et al., 2009 VERMES et al., 1995 |
| Ensaio de Inibição de Crescimento Celular (IGC) | Avaliar a capacidade do mAb de inibir a proliferação de células-alvo. | Células-alvo são cultivadas com diferentes concentrações do mAb e crescimento celular é medido ao longo do tempo. | Espectrofotometria, luminometria, fluorimetria. | LEE; GE, 2010 |

Continua

| Nome do Ensaio (Acrônimo) | Objetivo Principal | Princípio do Método | Técnica de Leitura | Referências |
|---|---|---|---|---|
| Ensaio de Ligação do Anticorpo (ABA) | Avaliar a capacidade do anticorpo de se ligar a um antígeno específico na superfície celular. | Células que expressam o antígeno, cortes de tecido ou o antígeno purificado são incubados com o mAb. | Fluorimetria, espectrofotometria, microscopia, microscopia de fluorescência. | POSH, 2021 TAN et al., 2020 |
| Ensaio de Competição com Anticorpo (ACA) | Avaliar a capacidade do anticorpo de competir com outros ligantes (ex: outra proteína ou anticorpo) pelo mesmo sítio de ligação. | Células/proteínas são incubadas mAb teste e um ligante competidor marcado. | Fluorimetria, espectrofotometria. | WEIS-GARCIA; CARNAHAN, 2017 |
| Ensaio de Afinidade | Avaliar a especificidade, cinética ($k_a$, $k_ə$) e afinidade ($K_D$) da ligação do mAb ao seu antígeno. | O antígeno é imobilizado na superfície de um sensor. O fluxo contínuo do mAb sobre essa superfície gera um sinal em tempo real, proporcional à ligação e dissociação. | Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), Interferometria de bio-camada (BLI). | CHO et al., 2003 ABDICHE et al., 2008 |

Conclusão

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Metodologias baseadas em SPR tornaram-se uma ferramenta padrão na pesquisa e desenvolvimento de mAbs terapêuticos. A partir da metodologia é possível caracterizar a cinética antígeno-anticorpo, o perfil do epítopo e realizar uma triagem para imunogenicidade (FOREST- NAULT et al., 2021; LU et al., 2020). Os biossensores SPR têm sido amplamente utilizados na indústria como uma ferramenta para quantificar atributos críticos de qualidade e otimizar o processo de produção de mAbs. Eles são integrados ao fluxo de bioprocesso e no controle de qualidade, representando uma alternativa robusta e versátil em relação às técnicas padrão, como o ELISA (LU et al., 2020). No entanto, o alto investimento necessário para a utilização do equipamento deve ser considerado, uma vez que a tecnologia requer consumíveis específicos (TANG; ZENG; LIANG, 2010). A escolha da metodologia adequada depende do objetivo do estudo, dos recursos disponíveis e do tipo de anticorpo em avaliação. Cada ensaio apresenta vantagens e desvantagens, mas todos têm como objetivo principal fornecer informações importantes sobre o mecanismo de ação de mAbs em inibir os receptores inibitórios imunológico e potencializar a resposta imune antitumoral.

### 2.3.2. O Papel da Citometria de Fluxo na Avaliação de Anticorpos

A citometria de fluxo é uma técnica de alta sensibilidade e permite a análise de múltiplos parâmetros ao mesmo tempo, o que a torna uma ferramenta valiosa na avaliação da capacidade de bloqueio de mAbs anti-PD-1 e PD-L1. Na literatura são encontrados poucos estudos utilizando citometria de fluxo para avaliar a capacidade de bloqueio de mAbs contra receptores inibitórios imunes de forma direta. Os achados se referem majoritariamente a ensaios para avaliação da ocupação do receptor por anticorpos ou para detectar outros marcadores de tumor (BD BIOSCIENCES, 2018; JUNKER et al., 2021; VAN ELSSEN et al., 2011).

Um ensaio de citometria de fluxo foi descrito por colaboradores da BD Biosciences para avaliar a ocupação do receptor PD-1 *in vitro* por anticorpos monoclonais como o pembrolizumab e o nivolumab. Para isso, PBMCs foram estimuladas com um anticorpo anti-CD3 para induzir a expressão de PD-1. Subsequentemente, as células foram cultivadas por três dias com os anticorpos terapêuticos ou com um controle de isotipo, mantendo-se a estimulação com anti-CD3 e IL-2. A quantificação da ocupação foi realizada pela marcação das células com um segundo anticorpo anti-PD-1 conjugado a um fluorocromo que compete pelo mesmo sítio de ligação dos anticorpos terapêuticos. Observou-se que a intensidade de fluorescência foi significativamente menor nos grupos tratados com pembrolizumabe e nivolumabe quando comparada ao controle. Essa redução de sinal demonstrou que os anticorpos terapêuticos ocuparam os receptores PD-1, bloqueando a ligação do anticorpo de detecção e, assim, permitindo quantificar a ocupação do alvo terapêutico (BD BIOSCIENCES, 2018).

Junker e colaboradores descreveram um ensaio para avaliação da ocupação do receptor PD-1 de maneira semelhante, avaliando a taxa de ocupação do receptor para um anticorpo bi-específico anti-PD-1 e anti-TIM 3 humano em sangue periférico de pacientes com câncer considerados virgenspara imunoterapia com inibidores de receptores inibitórios e pacientes com câncer que já haviam recebido tratamento com imunoterapia com bloqueadores de receptores inibitórios em um estudo clínico de fase 1. O ensaio utilizando citometria de fluxo foi validado, avaliando-se a precisão intra e inter-insaio e se mostrou eficaz em avaliar a taxa de ocupação do receptor PD-1 (JUNKER et al., 2021).

Van Elsen e colaboradores reportaram um ensaio baseado em citometria de fluxo para detectar anticorpos contra MUC-1 Tn, uma proteína transmembrana mucina tipo 1 Tn,

que no tumor, se desprende de células epiteliais e é liberada no soro. Para detectar esses anticorpos, foi utilizado um modelo de células de ovário de Hamster Chinês (CHO) expressando MUC1, que foram incubadas com amostras de soro de pacientes oncológicos e após, um anticorpo secundário anti-IgG marcado com ficoeritrina (PE) foi usado para revelar a ligação de anticorpos contra a proteína MUC1 (VAN ELSSEN et al., 2011).

Meng e colaboradores desenvolveram e validaram dois ensaios de ligação baseados em beads magnéticas, que utilizam a citometria de fluxo para a quantificação da atividade de bloqueio de ICIs. Foram criadas duas configurações de ensaio. A primeira, denominada ensaio de ligação sL/bR (ligante solúvel/receptor imobilizado na esfera), consistiu na imobilização do receptor do receptor inibitório (como TIGIT ou PD-1) nas esferas, avaliando-se então a capacidade de um ICI em bloquear a ligação de seu ligante cognato solúvel, a segunda, denominada ensaio de ligação sR/bL (receptor solúvel/ligante imobilizado na esfera), inverteu essa orientação, imobilizando o ligante nas esferas e medindo o bloqueio da ligação do receptor solúvel pelo ICI. Em ambos os formatos, a interação entre receptor e ligante foi identificada através de um anticorpo secundário fluorescente e quantificada por citometria, o que permitiu o cálculo da $IC_{50}$ para determinar a atividade do inibidor.

Considerando a escassez de ensaios descritos na literatura que utilizem a citometria de fluxo para detectar anticorpos neutralizantes contra as proteínas de receptor inibitório PD-1 e PDL-1, desenvolvemos e validamos um ensaio baseado em citometria de fluxo para medir a capacidade de bloqueio de mAbs anti-PDL-1 usando um anti-PD-L1 similar ao Atezolizumab, microesferas revestidas com PD-1 e uma o ligante PD-L1 conjugado a uma fluorescência.

# 3. OBJETIVOS:

## 3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um ensaio baseado em citometria de fluxo para mensurar a capacidade de inibição da ligação PD-1-PD-L1 de mAbs anti-PD-L1.

## 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Padronizar as condições do ensaio de bloqueio e determinar sua precisão intra e inter-ensaio, bem como sua faixa de trabalho e o $IC_{50}$ para um anticorpo anti-PD-L1 padrão.
- Desenvolver uma linhagem celular que superexpressa a proteína PD-L1 para uso em ensaios funcionais.
- Validar funcionalmente a atividade de bloqueio do anticorpo anti-PD-L1 em um ensaio de co-cultura com células T, utilizando a concentração de $IC_{50}$ determinada pelo ensaio com esferas.

## 4. ARTIGO CIENTÍFICO:

Artigo científico intitulado**:** "*A bead-based screening platform for identifying monoclonal antibodies that disrupt PD-1/PD-L1 interactions"*

Revista que será submetido: *Journal of Immunology Research*

*https://onlinelibrary.wiley.com/journal/1607*

## DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas imunoterapias, incluindo mAbs e biossimilares, depende criticamente da disponibilidade de metodologias analíticas robustas e escaláveis para a caracterização funcional de candidatos terapêuticos (BERKOWITZ et al., 2012; WAGH et al., 2018). Atualmente, ensaios funcionais baseados em células são indispensáveis para confirmar a atividade biológica, porém são frequentemente complexos, demorados e de baixa capacidade de processamento (FU; TAO; ZHANG, 2021), o que representa um gargalo na triagem inicial de muitos candidatos. Embora a citometria de fluxo seja uma plataforma analítica versátil e amplamente acessível, sua aplicação para a quantificação direta da inibição da interação PD-1/PD-L1 permanece subutilizada. Para suprir essa lacuna, este trabalho descreve o desenvolvimento e a validação de um ensaio rápido, preciso e livre de células, baseado em citometria de fluxo, para quantificar a atividade de bloqueio de anticorpos direcionados ao eixo PD-1/PD-L1.

A nossa abordagem, que utiliza microesferas de poliestireno conjugadas a um receptor recombinante para medir a inibição de ligação por citometria de fluxo, alinha-se a metodologias bem estabelecidas em outros campos, como na sorologia viral e no diagnóstico (FENWICK et al., 2021; LEIRE EGIA-MENDIKUTE et al., 2022; LOPEZ et al., 2021). Plataformas similares têm sido empregadas com sucesso para avaliar a capacidade neutralizante de anticorpos contra variantes do SARS-CoV-2, demonstrando a robustez e a capacidade de multiplexação de ensaios baseados em microesferas (TAN et al., 2020; YAO et al., 2022). O princípio fundamental de medir o bloqueio de uma interação proteína-proteína para inferir atividade funcional é a base dos ensaios de neutralização substitutos, que são considerados alternativas valiosas aos testes que dependem de vírus vivos ou de linhagens celulares complexas (STREIF; BAEUMNER, 2025; TAN et al., 2020; YAO et al., 2022). Nosso trabalho estendeu este princípio ao campo da imunoterapia, aplicando-o à avaliação de ICIs.

Um estudo relevante de Meng e colaboradores (2021) também desenvolveu um ensaio em microesferas para ICIs, utilizando, no entanto, beads magnéticas. Um achado chave desse trabalho foi que a sensibilidade do ensaio para o eixo PD-1/PD-L1 foi significativamente maior quando o ligante (PD-L1) era imobilizado na esfera e o receptor (PD-1) era o analito solúvel (formato sR/bL). Nosso ensaio foi desenvolvido na orientação inversa, com o receptor PD-1 imobilizado na esfera (formato sL/bR). É importante notar

que, enquanto o ensaio mais sensível de Meng e colaboradores (2021). utilizava um anticorpo anti-PD-1 que mirava a proteína solúvel, nosso ensaio utiliza um anticorpo anti-PD-L1, que também atua sobre o componente solúvel (PD-L1-AF488) do nosso sistema. Essa convergência sugere que a sensibilidade do ensaio pode ser otimizada quando o anticorpo tem acesso irrestrito ao seu alvo em solução, evitando potencial impedimento estérico ou alterações conformacionais que poderiam ocorrer com a imobilização na superfície da esfera.

Um dos pontos fortes deste estudo é a validação funcional dos resultados obtidos no ensaio com esferas em um modelo celular relevante. Demonstramos que o αPD-L1, em uma concentração que aproxima o $IC_{50}$ médio determinado em nosso ensaio (~3 μg/mL), foi capaz de reverter significativamente a supressão de células T, restaurando a expressão do marcador de ativação CD69. Esta etapa é crucial, pois estabelece uma ponte entre um ensaio de ligação simplificado e um sistema biológico complexo, confirmando que a atividade de bloqueio medida se traduz em uma consequência funcional tangível. Essa estratégia de validação, que correlaciona resultados de ensaios em *beads* com desfechos em ensaios de infecção ou neutralização celular, é uma prática padrão e essencial no desenvolvimento de outros ensaios substitutos.

Embora nossa validação celular em um único ponto ($IC_{50}$) sirva como um importante prova de conceito, reconhecemos a limitação de não termos gerado uma curva de dose-resposta completa no modelo funcional. Como perspectiva futura, a realização dessa curva permitiria uma análise de correlação direta entre a porcentagem de inibição no ensaio com *beads* e a restauração da ativação de células T em múltiplas concentrações, fortalecendo ainda mais a validação do método. Adicionalmente, a investigação da orientação inversa do ensaio (com PD-L1 imobilizado) seria uma abordagem valiosa para avaliar se a sensibilidade para nosso anticorpo αPD-L1 específico poderia ser otimizada. Finalmente, a plataforma atual abre perspectivas para o desenvolvimento de ensaios multiplex, permitindo a avaliação simultânea de múltiplos alvos, o que seria particularmente útil na triagem de anticorpos biespecíficos.

# 5. CONCLUSÕES

Em conclusão, desenvolvemos e validamos um ensaio de citometria de fluxo preciso, reprodutível e livre de células para a caracterização funcional de anticorpos bloqueadores da interação PD-1/PD-L1. A plataforma se mostrou robusta e confiável, e seus resultados foram funcionalmente relevantes, como confirmado por um ensaio de ativação de células T. Esta ferramenta representa uma contribuição valiosa para o repertório analítico necessário ao desenvolvimento e controle de qualidade de novas imunoterapias, endereçando a necessidade de métodos de triagem eficientes e escaláveis neste campo em rápida expansão.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES À INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO

A High-Throughput Flow Cytometry Assay to Assess PD-1 Receptor Occupancy: BD BIOSCINCES Drug-Discovery Applications for the BD FACSCelestatm Flow Cytometer withthe High Throughput Sampler (Hts), 2018. Disponível em: https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD-FACSCelesta-Assess-PD1-Receptor-Occupancy.pdf Acesso em 20 de junho de 2024.

ABDICHE, Y. et al. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet. **Analytical Biochemistry**, v. 377, n. 2, p. 209–217, jun. 2008.

ABOUL-ELLA, H. et al. Monoclonal antibodies: From magic bullet to precision weapon. **Molecular Biomedicine**, v. 5, n. 1, 11 out. 2024.

ANDERSON, ANA C.; JOLLER, N.; KUCHROO, VIJAY K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. **Immunity**, v. 44, n. 5, p. 989–1004, maio 2016.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The Tumor Microenvironment. **Current Biology**, v. 30, n. 16, p. R921–R925, ago. 2020.

BATISTA, F. D.; HARWOOD, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 15–27, jan. 2009.

BAUMEISTER, S. H. et al. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 539–573, 20 maio 2016.

BERKOWITZ, S. A. et al. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 7, p. 527–540, 29 jun. 2012.

BINNEWIES, M. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. **Nature medicine**, v. 24, n. 5, p. 541–550, 1 maio 2018.

BLANK, C. U. et al. Defining “T cell exhaustion”. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 11, p. 665–674, 1 nov. 2019.

BOON, T. et al. Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes. Annual Review of Immunology, v. 12, n. 1, p. 337–365, abr. 1994.

BORDON, Y. TOX for tired T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 8, p. 476–476, 26 jun. 2019.

BRAHMER, J. R. et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 19, p. 3167–3175, 1 jul. 2010.

BRAHMER, J. R. et al. Safety and Activity of Anti–PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2455–2465, 28 jun. 2012.

BRETSCHER, P.; COHN, M. A Theory of Self-Nonself Discrimination: Paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively. **Science**, v. 169, n. 3950, p. 1042–1049, 11 set. 1970.

BURR, M. L. et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. **Nature**, v. 549, n. 7670, p. 101–105, 1 set. 2017.

BUTTE, M. J. et al. Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 111–122, jul. 2007.

CALLAHAN, MARGARET K.; POSTOW, MICHAEL A.; WOLCHOK, JEDD D. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. Immunity, v. 44, n. 5, p. 1069–1078, maio 2016.

CARTER, P. J. Potent antibody therapeutics by design. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 5, p. 343–357, 7 abr. 2006.

CHAMES, P. et al. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 220–233, 28 abr. 2009.

CHAN, A. C.; CARTER, P. J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 301–316, maio 2010.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. **Nature**, v. 541, n. 7637, p. 321–330, 2017.

CHEN, DANIEL S.; MELLMAN, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. Immunity, v. 39, n. 1, p. 1–10, jul. 2013.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 4, p. 227–242, 8 mar. 2013.

CHEN, X. et al. Development and optimization of a Zika virus antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) assay. **Journal of immunological methods**, v. 488, p. 112900–112900, 1 jan. 2021.

CHI, H.; PEPPER, M.; THOMAS, P. G. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. **Cell**, v. 187, n. 9, p. 2052–2078, 1 abr. 2024.

CHO, B. C. et al. Tiragolumab plus atezolizumab versus placebo plus atezolizumab as a first-line treatment for PD-L1-selected non-small-cell lung cancer (CITYSCAPE): primary and follow-up analyses of a randomised, double-blind, phase 2 study. **The Lancet Oncology**, v. 23, n. 6, p. 781–792, jun. 2022.

CHO, H.-S. et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 756–760, 1 fev. 2003.

CROFT, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 271–285, abr. 2009.

CURIEL, T. J. et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell–mediated antitumor immunity. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 562–567, 1 maio 2003.

CURTSINGER, J. M. et al. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 162, n. 6, p. 3256–3262, 15 mar. 1999.

DE VISSER, K. E.; JOYCE, J. A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. Cancer Cell, v. 41, n. 3, p. 374–403, mar. 2023.

DEKOSKY, B. J. et al. High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 166–169, 20 jan. 2013.

DUSTIN, M. L. The Immunological Synapse. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 11, p. 1023–1033, 1 nov. 2014.

FENWICK, C. et al. A high-throughput cell- and virus-free assay shows reduced neutralization of SARS-CoV-2 variants by COVID-19 convalescent plasma. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 605, 4 ago. 2021.

FOREST-NAULT, C. et al. On the Use of Surface Plasmon Resonance Biosensing to Understand IgG-FcγR Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6616, 21 jun. 2021.

FREEMAN, G. J. et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1027–1034, 2 out. 2000.

FRIDMAN, W. H. et al. Tertiary lymphoid structures and B cells: An intratumoral immunity cycle. **Immunity**, v. 56, n. 10, p. 2254–2269, out. 2023.

FU, X.; TAO, L.; ZHANG, X. Comprehensive and systemic optimization for improving the yield of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus. **Molecular Therapy. Methods & Clinical Development**, v. 20, 3 mar. 2021.

GOODMAN, A.; PATEL, S. P.; KURZROCK, R. PD-1–PD-L1 immune-receptor inibitório blockade in B-cell lymphomas. Nature Reviews Clinical Oncology, v. 14, n. 4, p. 203– 220, 2 nov. 2016.

GRAKOUI, A. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. **Science**, v. 285, n. 5425, p. 221–227, 9 jul. 1999.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. THE B7 FAMILY REVISITED. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 515–548, abr. 2005.

HARDING, C. V.; UNANUE, E. R. Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and II major histocompatibility complex molecules. **Cell Regulation**, v. 1, n. 7, p. 499–509, jun. 1990.

HEGDE, P. S.; CHEN, D. S. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. **Immunity**, v. 52, n. 1, p. 17–35, jan. 2020.

HERBST, R. S. et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature, v. 515, n. 7528, p. 563–567, nov. 2014.

HOOGENBOOM, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1105–1116, set. 2005.

HSIEH, C. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 547–549, 23 abr. 1993.

HUPPA, J. B.; DAVIS, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 973–983, dez. 2003.

INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no- brasil Acesso em: 04 de abril de 2023.

INCAa. INCA divulga estudo sobre gastos com os cânceres relacionados à obesidade no Brasil. Disponível em: https://www.inca.gov.br/imprensa/inca-divulga-estudo-sobre-gastos-com-os-canceres-relacionados-obesidade-no brasil#:~:text=Dos%20R%24%203%2C5%20bilh%C3%B5es, associados%20ao%20excesso%20de%20peso. Acesso em: 04 de abril de 2023.

ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 11, p. 3887–3895, nov. 1992.

JOHNSON, D. B. et al. Immune-receptor inibitório inhibitors: long-term implications of toxicity. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, p. 1–14, 26 jan. 2022.

JONES, P. T. et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. **Nature**, v. 321, n. 6069, p. 522–525, maio 1986.

JUNE, C. H. et al. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 12, p. 4472–4481, dez. 1987.

JUNKER, F. et al. A human receptor occupancy assay to measure anti-PD-1 binding in patients with prior anti-PD-1. **Cytometry**, v. 99, n. 8, p. 832–843, 1 ago. 2021.

KHAN, S. H. et al. A versatile method to measure the binding to basic proteins by surface plasmon resonance. Analytical biochemistry, v. 421, n. 2, p. 385–90, Autumn 2012.

KIMBALL, J. et al. The OKT3 antibody response study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ tranplantation. **Transplant Immunology**, v. 3, n. 3, p. 212–221, set. 1995.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, ago. 1975.

LALLEMAND, C. et al. A Novel System for the Quantification of the ADCC Activity of Therapeutic Antibodies. **Journal of immunology research**, v. 2017, p. 1–19, 1 jan. 2017.

LEACH, D. R.; KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. **Science**, v. 271, n. 5256, p. 1734–1736, 22 mar. 1996.

LEE, G.; GE, B. Inhibition of in vitro tumor cell growth by RP215 monoclonal antibody and antibodies raised against its anti-idiotype antibodies. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, vol. 59, nº 9, p. 1347–1356, set. 2010. https://doi.org/10.1007/s00262-

LEIRE EGIA-MENDIKUTE et al. A flow cytometry-based neutralization assay for simultaneous evaluation of blocking antibodies against SARS-CoV-2 variants. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 24 nov. 2022.

LONBERG, N. Human antibodies from transgenic animals. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1117–1125, set. 2005.

LOPEZ, E. et al. Simultaneous evaluation of antibodies that inhibit SARS-CoV-2 variants via multiplex assay. **JCI Insight**, v. 6, n. 16, 23 ago. 2021.

LU, R.-M. et al. Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases. Journal of Biomedical Science, v. 27, n. 1, p. 1–30, 2 jan. 2020.

MARIATHASAN, S. et al. TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. **Nature**, v. 554, n. 7693, p. 544–548, fev. 2018.

MATTES, M. J. et al. Induction of Apoptosis by Cross-Linking Antibodies Bound to Human B-Lymphoma Cells: Expression of Annexin V Binding Sites on the Antibody Cap. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 24, n. 2, p. 185–193, 2 maio 2009.

MAYNARD, J. A. et al. Surface plasmon resonance for high-throughput ligand screening of membrane-bound proteins. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 11, p. 1542–1558, nov. 2009.

MELLMAN, I. et al. The cancer-immunity cycle: Indication, genotype, and immunotype. **Immunity**, v. 56, n. 10, p. 2188–2205, 10 out. 2023.

MENG, Q. et al. Rapid, sensitive and cost-effective determination of immunecheckpoints inhibitor activity using a magnetic bead-based binding assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 498, p. 113134, nov. 2021.

MESCHER, M. F. et al. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. **Immunological Reviews**, v. 211, n. 1, p. 81–92, jun. 2006.

MICHAUD, D. et al. Regulatory B cells in cancer. **Immunological Reviews**, v. 299, n. 1, p. 74–92, 23 dez. 2020.

MIRLEKAR, B. et al. Balance between immunoregulatory B cells and plasma cells drives pancreatic tumor immunity. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 9, p. 100744, set. 2022.

MORRISON, S. L. et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 21, p. 6851–6855, 1 nov. 1984.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, 1 abr. 1986.

MUELLER, D. L.; JENKINS, M. K.; SCHWARTZ, R. H. Clonal Expansion Versus Functional Clonal Inactivation: A Costimulatory Signalling Pathway Determines the Outcome of T Cell Antigen Receptor Occupancy. **Annual Review of Immunology**, v. 7, n. 1, p. 445–480, abr. 1989.

**Nature Communications**, v. 8, n. 1, 6 fev. 2017.

NCI. National Cancer Institute. Types of Cancer Treatment. Disponível em: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types. Acesso em: 04 de abril de 2023.

NCIa. National Cancer Institute. Immunec h e c k p o i n t s Inhibitors. Disponível em: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/*receptor inibitório*- inhibitors. Acesso em 04 de abril de 2023.

PHILIP, M. et al. Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 452–456, 1 maio 2017.

PSCHEIDT, V. M. et al. A flow cytometry-based assay to measure neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 virus. **Cytometry Part A**, v. 105, n. 6, p. 446–457, 16 abr. 2024.

QURESHI, O. S. et al. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 600–603, 7 abr. 2011.

REFF, M. et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. **Blood**, v. 83, n. 2, p. 435–445, 15 jan. 1994.

SAKUISHI, K. et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 10, p. 2187–2194, 27 set. 2010.

SCHUMACHER, T. N.; THOMMEN, D. S. Tertiary lymphoid structures in cancer. **Science**, v. 375, n. 6576, 7 jan. 2022.

SCOTT, A. M.; WOLCHOK, J. D.; OLD, L. J. Antibody therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 278–287, 22 mar. 2012.

SELBY, M. J. et al. Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. **Cancer Immunology Research**, v. 1, n. 1, p. 32–42, 7 abr. 2013.

SHARMA, P. et al. Immunecheckpoints therapy—current perspectives and future directions. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1652–1669, abr. 2023.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7–CD28 superfamily. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 2, p. 116–126, fev. 2002.

SHIMIZU, Y. et al. Roles of Adhesion Molecules in T-Cell Recognition: Fundamental Similarities between Four Integrins on Resting Human T Cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in Expression, Binding, and Costimulation. **Immunological Reviews**, v. 114, n. 1, p. 109–143, abr. 1990.

SIMPSON, T. R. et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti–CTLA-4 therapy against melanoma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 9, p. 1695–1710, 29 jul. 2013.

SMITH-GARVIN, J. E.; KORETZKY, G. A.; JORDAN, M. S. T Cell Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 591–619, abr. 2009.

STANIETSKY, N. et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17858–17863, 7 out. 2009.

STREIF, S.; BAEUMNER, A. J. Advances in Surrogate Neutralization Tests for High-Throughput Screening and the Point-of-Care. **Analytical Chemistry**, v. 97, n. 10, p. 5407–5423, 4 mar. 2025.

SZABO, S. J. et al. A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655–669, mar. 2000.

TAN, C. W. et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1073–1078, 1 set. 2020.

TAN, W. C. C. et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. **Cancer Communications**, v. 40, n. 4, p. 135–153, abr. 2020.

TANG, Y.; ZENG, X.; LIANG, J. Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique. **Journal of Chemical Education**, v. 87, n. 7, p. 742–746, jul. 2010.

TANG, Y.; ZENG, X.; LIANG, J. Surface plasmon resonance: An introduction to a surface spectroscopy technique. **Journal of Chemical Education**, vol. 87, nº 7, p. 742–746, 2010. https://doi.org/10.1021/ed100186y.

TAWBI, H. A. et al. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 1, p. 24–34, 6 jan. 2022.

TAY, C.; TANAKA, A.; SAKAGUCHI, S. Tumor-infiltrating regulatory T cells as targets of cancer immunotherapy. **Cancer Cell**, v. 41, n. 3, p. 450–465, 1 mar. 2023.

TAYLOR, P. A. et al. B7 Expression on T Cells Down-Regulates Immune Responses through CTLA-4 Ligation via R-T Interactions. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 34–39, 1 jan. 2004.

THORSSON, V. et al. The Immune Landscape of Cancer. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 812-830.e14, abr. 2018.

UNANUE, E. R. Antigen-presenting function of the macrophage. **Annual Review of Immunology**, v. 2, p. 395–428, 1984.

VAN ELSSEN, C. H. M. J. et al. Flow cytometry-based assay to evaluate human serum MUC1-Tn antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 365, n. 1-2, p. 87–94, fev. 2011.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, jul. 1995.

WAGH, A. et al. Challenges and new frontiers in analytical characterization of antibody-drug conjugates. **mAbs**, v. 10, n. 2, p. 222–243, 5 jan. 2018.

WALSH, G.; WALSH, E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. **Nature Biotechnology**, vol. 40, nº 12, p. 1722–1760, 1 dez. 2022. https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x

WANG, H. et al. HIP1R targets PD-L1 to lysosomal degradation to alter T cell–mediated cytotoxicity. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 42–50, 5 nov. 2019.

WATANABE, N. et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. **Nature Immunology**, v. 4, n. 7, p. 670–679, 8 jun. 2003.

WEINER, G. J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 6, p. 361–370, 22 maio 2015.

WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 317–327, maio 2010.

WEINER, Louis M.; SURANA, Rishi; WANG, Shangzi. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 317-327, maio 2010.

WEIS-GARCIA, F.; CARNAHAN, R. H. Characterizing Antibodies. **Cold Spring Harbor protocols**, vol. 2017, nº 11, 1 nov. 2017. https://doi.org/10.1101/pdb.top093823.

WHO. Cancer. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 Acesso em: 04 de abril de 2023.

WORKMAN, CREG J.; VIGNALI, DARIO A. A. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 4, p. 970–979, abr. 2003.

WYKES, M. N.; LEWIN, S. R. Immunecheckpoints blockade in infectious diseases. **Nature Reviews Immunology**, vol. 18, nº 2, p. 91–104, 1 fev. 2018. https://doi.org/10.1038/nri.2017.112.

YAO, X. et al. A highly sensitive bead-based flow cytometric competitive binding assay to detect SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 30 nov. 2022.

YU, X. et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 10, n. 1, p. 48–57, 16 nov. 2008.

ZHAO, Y. et al. Antigen-Presenting Cell-Intrinsic PD-1 Neutralizes PD-L1 in cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells. **Cell Reports**, v. 24, n. 2, p. 379-390.e6, jul. 2018.

ZHAO, Y. et al. PD-L1:CD80 Cis-Heterodimer Triggers the Co-stimulatory Receptor CD28 While Repressing the Inhibitory PD-1 and CTLA-4 Pathways. **Immunity**, v. 51, n. 6, p. 1059-1073.e9, dez. 2019.

ZHENG, W.; FLAVELL, R. A. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 587–596, maio 1997.

ZHU, J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 10, p. a030338, 28 ago. 2017.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, mar. 2010.

# 7. ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

Plataforma Brasil

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de imunoterápicos oncológicos seus testes preditivos de resposta para o SUS

**Pesquisador:** ANTONIO NOCCHI KALIL

**Área Temática:** Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

**Versão:** 5

**CAAE:** 52266121.0.0000.5335

**Instituição Proponente:** ISCMPA

**Patrocinador Principal:** Ministério da Saúde

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 6.192.383

**Apresentação do Projeto:**

O câncer constitui a segunda principal causa de mortalidade e morbidade no Brasil. Enquanto os custos diretos com tratamento oncológico aproximam-se de 4 bilhões de reais anuais (segundo o INCA, 2018), custos indiretos podem alcançar quatro vezes esse valor. São urgentemente necessárias alternativas inovadoras que levem, principalmente, à diminuição da incidência de câncer, e a um aumento da qualidade de vida dos pacientes já afetados. Atualmente, a terapia oncológica passa por uma revolução: o uso de anticorpos monoclonais desbloqueadores da resposta imune tem respostas inéditas e históricas que vão em média de 20 a 40%, podendo alcançar mais de 50% quando drogas imunoterápicas são conjugadas, em pacientes de diversos tipos de tumor, incluindo cânceres metastáticos. Esses medicamentos, que deram o Prêmio Nobel em 2018 para Jim Allison e Tetsuo Honjo, não estão hoje disponíveis pelo SUS, devido principalmente ao seu alto custo. O presente projeto pretende desenvolver para o SUS essa forma de tratamento oncológico, produzindo alternativas nacionais para esses anticorpos monoclonais, bem como os testes de precisão necessários para a otimização de seu uso.O tratamento do câncer atualmente vem sofrendo uma revolução, o qual novas tecnologias estão sendo utilizadas para gerar anticorpos capazes de ativar o sistema imunológico.

**Endereço:** Avenida Osvaldo Aranha, nº 80, sala 17, Centro Administrativo da Santa Casa, 2º andar.
**Bairro:** Cidade Baixa **CEP:** 90.035-190
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE
**Telefone:** (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

É comum hoje ainda que o tratamento do câncer
inclua cirurgia, radioterapia, e intervenções medicamentosas. No entanto, mais recentemente, uma abordagem inovadora, baseada na ativação do sistema imune para controlar o câncer chegou ao mercado com o nome abrangente de imunoterapia. Assim, drogas ou processos tecnológicos são empregados para ativar ou modular células imunológicas e fazer com que elas reconheçam as diferenças que o tecido tumoral apresenta comparado às células normais do corpo. Dentro dessas terapias, estão moléculas e células que atuam no desbloqueio do sistema imunológico. Desbloqueadores imunológicos agem nas moléculas co-estimulatórias ou co-inibidoras e/ou em seus receptores localizados nas membranas de
células do sistema imune envolvidas na resposta ao tumor, restabelecendo a atividade de células imunológicas efetoras que vão eliminar os tumores.Os desbloqueadores imunológicos o qual estamos reportando, são denominados de anticorpos monoclonais. O anticorpo monoclonal anti-CTLA4 - ipilumumab (Yervoy®) desenvolvido e comercializado pela Bristol-Myers Squibb, foi o primeiro exemplo de terapia aprovada clinicamente com modo de ação de modular o sistema imune para tratar câncer. O anticorpo Ipilumumab foi aprovado pelo FDA em 2011 para tratamento de pacientes com melanoma metastático. Hoje, há uma série de anticorpos monoclonais (mAbs) utilizados na modulação da tolerância imune para o
tratamento do câncer e esta área de desenvolvimento tecnológico mostra-se extremamente ativa. A lógica de tratar o sistema imune para que este, por sua vez, reconheça o células tumorais e desencadeie respostas adaptativas de eliminação, transcendeu a terapia medicamentosa moderna e tem potencial pan-oncológico, ou seja, pode ser aplicado a todos os tipos de câncer, possivelmente como um potencializador de outras terapias e para prevenção do câncer. Após o surgimento do ipilimumab, surgiram novos anticorpos monoclonais como o anti-PD-1 (Nivolumab da Bristol-Myers Squibb, Pembrolizumab da Merck); e o anti-PD-L1 (BMS-936559 da Bristol-Myers Squibb). Atualmente há diferentes anticorpos (fármacos, ou moléculas) produzidas por diferentes empresas farmacêuticas para bloquear a mesma interação, e há aproximadamente dois mil estudos clínicos em andamento, em diferentes tipos de câncer. Esta é uma modificação de paradigma irreversível no tratamento oncológico e este projeto de pesquisa visa incluir o SUS nessa virada de jogo mundial da terapia oncológica. Investigaremos a população de pacientes oncológicos do Rio Grande do Sul atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, o mais antigo hospital do estado, e que atende o maior número de pacientes de câncer Rio Grande do Sul (e um dos maiores do Brasil). Desenvolveremos anticorpos monoclonais humanos, para imunoterapia

oncológica, em estágio pré-clínico, com prova de conceito robusta. Desenvolveremos ainda alternativas nacionais para os testes de biomarcadores preditivos (já validados internacionalmente) de resposta. Em uma parceria entre o corpo clínico da Santa Casa de Porto Alegre e pesquisadores da UFCSPA reconhecidos internacionalmente, criaremos uma estrutura de P&D especializada em fornecer alternativas nacionais de produtos para
imunoterapia oncológica, que sejam competitivas para seguir o fluxo regulatório, até alcançar o mercado.

Hipótese:
A hipótese deste estudo é a de que os tumores de pacientes do SUS têm características genéticas e imunológicas que hoje não são detectadas. Ao serem detectadas, candidatam o paciente a um tratamento otimizado, na fronteira do conhecimento e da tecnologia terapêutica atual, que podem ser desenvolvidos no Brasil.

**Objetivo da Pesquisa:**
Objetivo Primário:
Desenvolver anticorpos monoclonais anti-CTLA4-4, anti-PD-1 e anti-PD-L1, bem como seus testes preditivos, para o SUS, criando uma base de dados de caracterização imunológica e molecular dos tumores dos pacientes do Rio Grande do Sul.

Objetivo Secundário:
1. Proporcionar ao SUS opções de acesso a tratamentos oncológicos com alta qualidade tecnológica e de favorável custo-benefício.
2. Obter, ao nível pré-clínico, anticorpos humanos ou humanizados anti-PD-1, anti-PD-L1 e anti-CTLA-4, para seguir desenvolvimento no Brasil.
3. Reunir e organizar um grupo de cientistas e pesquisadores clínicos para desenvolver novas moléculas imunoterápicas, alinhadas a estratégias de diagnóstico inovadoras para o estudo e tratamento do câncer.
4. Organizar um banco de dados caracterizando o perfil molecular e imunológico de tumores de pacientes do Rio Grande do Sul atendidos pelo SUS.
5. Proporcionar ao setor produtivo nacional opções para desenvolver moléculas e tecnologias de origem biológica em parceria com o SUS.
6. Formar recursos humanos e interações entre acadêmicos, médicos, pesquisadores empreendedores, entidades com capacidade produtiva e investidores público e/ou privado

pesquisadores interessados em oferecer qualidade de vida e soluções a pacientes sem opções terapêuticas.

7. Engajar e mostrar à comunidade não-científica a importância da pesquisa sobre o câncer e o que pode ser desenvolvido no Brasil.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos de participar nesta pesquisa estão relacionados aos seus procedimentos. Durante ou após a coleta de sangue, pode haver desconforto, dor, sangramento local, ou hematoma (mancha roxa) no local da picada que pode persistir por no máximo 15 dias até que a mancha desapareça completamente. No caso da coleta dos fragmentos de tumor, esta será realizada durante a cirurgia, não gerando incômodos adicionais. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais treinados e habilitados. Para realização de qualquer procedimento você e os pesquisadores que terão contato direto com você, utilizarão todos dos equipamentos de proteção individual necessários conforme protocolos de atendimento e de realização dos testes.

Benefícios:

Os benefícios da sua participação na pesquisa serão de contribuir na criação de uma base de informação biológica caracterizando os tumores da população do RS, constituindo assim a possibilidade de desenvolver novos e mais eficazes tratamentos contra o câncer. Além do desenvolvimento de alternativas nacionais de produtos para o tratamento do câncer, reduzindo os custos dos tratamentos para nosso país.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

EMENDA 4

1. Alteração: Inclusão dos novos integrantes na equipe do projeto.

Justificativa: Essa inclusão é necessária para que esses novos integrantes consigam a ter acesso ao Tasy – sistema de dados interno da Santa Casa Misericórdia de Porto Alegre - para a integração dos bancos de dados dos pacientes participantes do estudo.

- Lista dos nomes dos NOVOS INTEGRANTES da pesquisa:

Bernardo do Nascimento Pittan

Deise do Nascimento de Freitas

Fabrício Silveira da Costa
José Eduardo Sacconi Nunes
Laura Bampi
Luís Eduardo Nunes Caldeira
Pedro Henrique Engster
Pedro Henrique Filipin Von Muhlen
Thainah de Carvalho Moraes

- Lista dos nomes de TODOS OS INTEGRANTES da pesquisa:
Antonio Nocchi Kalil
Anne Wichine Acosta Garcia
Bernardo do Nascimento Pitthan
Carlos Eugênio Santiago Escovar
Claudia Paiva Nunes
Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino
Deise do Nascimento de Freitas
Dinara Jaqueline Moura
Fabrício Silveira da Costa
Fernanda Tereza Bovi Frozza
Jenifer Saffi
José Eduardo Sacconi Nunes
Júlia Crispim da Fontoura
Karina Rodrigues Lima
Laura Bampi
Luís Eduardo Nunes Caldeira
Luiz Carlos Rodrigues Junior
Pedro Henrique Engster
Pedro Henrique Filipin Von Muhlen
Priscila Oliveira de Souza
Tanira Alessandra Silveira Aguirre
Thainah de Carvalho Moraes
Tiago Fazolo

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA



Documentos anexados nesta submissão:

- carta_de_emenda_julho_pronon_jul_23_versao_02_assinado.pdf
- 02_Declaracao_de_conficialidade_versao_02.
- 03_Declaracao_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados_de_material biológico_versao_02.
- 04_Declaracao_de_utilizacao_de_dados_de_prontuarios_e_uso_de_publicacao_versao_02.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram observados óbices éticos nos documentos da emenda.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta para o projeto de pesquisa.

**O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu inicio autorizado após a aprovação pela mesma.**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|---|---|---|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2175729_E4.pdf | 19/07/2023 18:38:10 | | Aceito |
| Outros | carta_de_emenda_julho_pronon_jul_23_versao_02_assinado.pdf | 19/07/2023 18:37:21 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |
| Outros | 04_Declaracao_de_utilizacao_de_dados_de_prontuarios_e_uso_de_publicao_versao_02.pdf | 19/07/2023 00:30:38 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |
| Outros | 03_Declaracao_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados_de_material_versao_02.pdf | 19/07/2023 00:30:03 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |
| Outros | 02_Declaracao_de_conficialidade_versao_02.pdf | 19/07/2023 00:27:59 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |
| Outros | Dispensa_TCLE.pdf | 05/05/2023 16:18:25 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Projeto_PRONON_Santa_Casa_emenda.pdf | 22/03/2023 15:17:22 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura | Projeto_PRONON_Santa_Casa_com_Emenda.pdf | 20/03/2023 10:04:31 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |

**Endereço:** Avenida Osvaldo Aranha, nº 80, sala 17, Centro Administrativo da Santa Casa, 2º andar.
**Bairro:** Cidade Baixa **CEP:** 90.035-190
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE
**Telefone:** (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

Continuação do Parecer: 6.192.383

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Investigador | Projeto_PRONON_Santa_Casa_com_Emenda.pdf | 20/03/2023 10:04:31 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto.pdf | 01/10/2021 15:13:55 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |
| Outros | Formulario_inscricao.pdf | 01/10/2021 15:12:53 | ANTONIO NOCCHI KALIL | Aceito |

**Situação do Parecer:**
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**
Sim

PORTO ALEGRE, 20 de Julho de 2023

**Assinado por:**
**RENATA NETO PIRES**
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida Osvaldo Aranha, nº 80, sala 17, Centro Administrativo da Santa Casa, 2º andar.
**Bairro:** Cidade Baixa **CEP:** 90.035-190
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE
**Telefone:** (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

# 8. ANEXO B – CURRÍCULO LATTES

## Veridiane Maria Pscheidt

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/3167698234580075
ID Lattes: **3167698234580075**
Última atualização do currículo em 30/04/2025

Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA. Atualmente é aluna de mestrado em Biociências no Laboratório de Imunoterapia da mesma instituição. Tem experiência em imunologia viral, epidemiologia de vírus respiratórios, biologia molecular, citometria de fluxo e pesquisa e desenvolvimento farmacotécnico. **(Texto informado pelo autor)**

### Identificação

**Nome**

Veridiane Maria Pscheidt

**Nome em citações bibliográficas**

PSCHEIDT, V. M.;PSCHEIDT, VERIDIANE MARIA;PSCHEIDT, VERIDIANE M.;PSCHEIDT, VM

**Lattes iD**

http://lattes.cnpq.br/3167698234580075

**País de Nacionalidade**

Brasil

### Formação acadêmica/titulação

**2023**

Mestrado em andamento em BIOCIENCIAS.
FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIENCIAS DA SAUDE DE PORTO ALEGRE, UFCSPA, Brasil.
Orientador: Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino.
Coorientador: Rodrigo Benedetti Gassen.

**2023**

Especialização em andamento em Biotecnologia. (Carga Horária: 360h).
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, UERGS, Brasil.

**2017 - 2022**

Graduação em Farmácia.
FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIENCIAS DA SAUDE DE PORTO ALEGRE, UFCSPA, Brasil.
Título: Desenvolvimento de dois testes para mensurar anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-2 em plasma.
Orientador: Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

## Formação Complementar

**2024 - 2024**

7th Advanced Course on Immunity & Cancer Immunotherapy. (Carga horária: 30h).
Universidad de San Sebastián, UNISEBA, Chile.

**2023 - 2023**

Curso de verão: Princípios em Vacinologia. (Carga horária: 30h).
Instituto Butantan, IBU, Brasil.

**2023 - 2023**

Yale-Proxima Mentorship Program. (Carga horária: 26h).
Yale-Proxima, YP, Estados Unidos.

**2022 - 2022**

XIII Curso de Verão de Pesquisa em Oncologia,. (Carga horária: 27h).
Instituto Nacional de Câncer, INCA, Brasil.

**2021 - 2021**

Extensão universitária em Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 25h).
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FMRP-USP, Brasil.

**2021 - 2021**

XIII curso de inverno em imunologia. (Carga horária: 35h).
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FMRP-USP, Brasil.

**2021 - 2021**

Minicurso Bioinformática Aplicada ao Desenvolvimento de Vacinas. (Carga horária: 22h).
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FMRP-USP, Brasil.

**2021 - 2021**

Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

**2020 - 2020**

Imunologia de transplantes. (Carga horária: 15h).
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

**2020 - 2020**

How to write a Review paper. (Carga horária: 2h).
FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIENCIAS DA SAUDE DE PORTO ALEGRE, UFCSPA, Brasil.

**2020 - 2020**

R para não programadores: analisando dados do TCGA. (Carga horária: 2h).
FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIENCIAS DA SAUDE DE PORTO ALEGRE, UFCSPA, Brasil.

**2020 - 2020**

Biossegurança. (Carga horária: 2h).
FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIENCIAS DA SAUDE DE PORTO ALEGRE, UFCSPA, Brasil.

## Atuação Profissional

FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIENCIAS DA SAUDE DE PORTO ALEGRE, UFCSPA, Brasil.

**Vínculo institucional**

**2021 - 2022**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20

**Outras informações**

Montagem de imunoensaio celular para a triagem e avaliação de anticorpos neutralizantes anti-S no soro de indivíduos pós-infecção por SARS-CoV-2 ou vacinação.

Vínculo institucional

**2020 - 2020**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

**Outras informações**

Análise da expansão de linfócitos T CD8 na aplicação da interleucina-21/Ig como imunoterapico em camundongos imunossuprimidos e infectados com Herpes Simplex Vírus-1.

Vínculo institucional

**2019 - 2019**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

**Outras informações**

Vírus influenza no Rio Grande do Sul - relações filogenéticas, análise de mutações e detecção de coinfecções.

Centro Estadual de Vigilância em Saúde, CEVS, Brasil.

Vínculo institucional

**2017 - 2019**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30

**Outras informações**

Setor de sangue, células, tecidos e outros órgãos.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

Vínculo institucional

**2019 - 2020**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20

**Outras informações**

Unidade de Diagnóstico Laboratorial Especializado - Citometria de Fluxo.

Kley Hertz S/A Indústria e Comércio, KLE HERTZ, Brasil.

**Vínculo institucional**

**2022 - 2024**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de Pesquisa e Desenvolvimento, Carga horária: 40

**Outras informações**

Pesquisa e Desenvolvimento Farmacotécnico

**Vínculo institucional**

**2021 - 2022**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estágio, Carga horária: 30

**Outras informações**

P&D Farmacotécnico

Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento, QUATRO G, Brasil.

**Vínculo institucional**

**2022 - 2022**

Vínculo: Estágio curricular, Enquadramento Funcional: Estágio curricular, Carga horária: 20

## Projetos de pesquisa

**2021 - 2022**

Montagem de imunoensaio celular para a triagem e avaliação de anticorpos neutralizantes anti-S no soro de indivíduos pós- infecção por SARS-CoV-2 ou vacinação

Descrição: O SARS-CoV-2 é o vírus respiratório causador de síndrome respiratória aguda grave. Em março de 2020 esse vírus já havia se espalhado pelo mundo e a doença causada por ele, a COVID-19 foi considerada pela Organização Mundial da Saúde como pandêmica. Com a continuidade da pandemia, e a ausência de tratamentos específicos, os anticorpos neutralizantes tornam-se um importante alternativa para o combate desse vírus. A busca por conhecimento sobre a formação de anticorpos contra SARS-CoV-2, incluindo suas especificidades, tempo de formação e capacidade neutralizante tem sido intensa durante toda a pandemia. Assim, esse estudo tem como objetivo a montagem de um sistema para análise de anticorpos neutralizantes anti-S no soro de pacientes previamente infectados ou que receberam vacina contra SARSCoV-2. Nesse trabalho, a proteína S será utilizada na a montagem de um enzimaimunoensaio in house para a detecção e quantificação de anticorpo contra o SARS-CoV-2 no soro de indivíduos que tiveram COVID-19 ou vacinados. Também, a linhagem celular HEK293 será transfectada com o plasmídeo hACE2 (receptor da proteína do vírus via proteína S). A proteína S será marcada com horseradish peroxidase e incubada com os anticorpos dos pacientes, essa combinação será adicionada à cultura de HEK293/ACE2. Quanto mais anticorpos com atividade neutralizantes existirem no soro, menos ligação no ACE2, detectado pela horseradish peroxidase. Esse projeto está inserido em um estudo maior do edital CAPES - Desenvolvimento de terapias de base imunológica para tratamento da COVID-19 , cujo um dos objetivos é a investigação de anticorpos neutralizantes.. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Veridiane Maria Pscheidt - Integrante / Tiago Fazolo - Integrante / Priscila Oliveira de Souza - Integrante / Luiz Rodrigues Júnior - Coordenador.

**2020 - 2022**

Avaliação da forma recombinante IL-21/Ig no resgate de células T CD8+ em modelo de imunossupressão induzida em modelo de infecção viral

Descrição: A imunossupressão é um processo no qual o sistema imunológico apresenta uma reduzida capacidade

protetora contra agentes estranhos. Ela pode ocorrer ser induzida, como nos transplantes, congênitas, ou adquiridas, como o HIV. Portadores de HIV normalmente apresentam esse estado de imunossupressão relacionado a redução das células T CD4+. A interleucina-21, produzida quase exclusivamente pelos linfócitos t CD4 tem o potencial de aumentar a capacidade proliferativa e efetora de linfócitos T, B e células NK. Assim, esse estudo tem o objetivo de criar um modelo murino de depleção parcial de células T CD4+ através da administração intravenosa de anticorpos anti-CD4 , na fase de imunossupressão os animais serão infectados com Herpes Simplex virus-1. O resgate dos linfócitos será realizado por meio da administração intravenosa de quimera IL-21/Ig purificada, caracterizada e quantificada. A hipótese é de que a IL-21, com maior biodisponibilidade intravenosa, recupere o potencial de CD4-help e consequentemente a resposta de células T CD8+ antigeno especifica conta o vírus HSV..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (5) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Veridiane Maria Pscheidt - Integrante / Gustavo Hagen - Integrante / Luiz Carlos Rodrigues Junior - Coordenador / Rodrigo Bnedetti Gassen - Integrante / Glaucia Hezer - Integrante / Gabriel Tardim Hilário - Integrante / Douglas Matheus Mulher - Integrante.

Número de produções C, T & A: 1

**2020 - 2022**

Desenvolvimento de um painel imunofenotípico para avaliação da regulação de monócitos como preditor de severidade em pacientes com COVID-19

Descrição: Os fatores que levam ao agravamento dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 ainda não foram completamente esclarecidos. Especula-se que uma resposta inflamatória excessiva seja a principal causa de agravamento da doença e de morte em pacientes com COVID-19, visto que este perfil de resposta imune está associado ao aumento de níveis de citocinas circulantes, a presença de linfopenia profunda e a infiltração tecidual considerável de células mononucleares, principalmente no epitélio pulmonar. Estudos recentes reforçam essa hipótese evidenciando que pacientes graves com COVID-19 apresentaram uma resposta imune hiper-inflamatória caracterizada por um quadro conhecido como tempestade de citocinas, mediada por componentes da imunidade inata que levam a produção e liberação exacerbada de citocinas, como IL-6, IL-7 e fator de necrose tumoral (TNF), e quimiocinas, como CCL2, CCL3 e

CXCL10, na corrente sanguínea. Os monócitos, células sanguíneas associadas a imunidade inata, desempenham um papel importante na regulação da resposta imune e na defesa do hospedeiro contra organismos estranhos. Essas células são responsáveis pela apresentação de antígeno para linfócitos, levando à iniciação da resposta imune humoral e celular. Além disso, apresentam funções como fagocitose e produção de citocinas e/ou fatores quimiotáticos, que são mediadas através da expressão de moléculas na superfície celular. Essas moléculas constituem o imunofenótipo dos monócitos e podem ser avaliadas por citometria de fluxo, técnica que consiste em um dispositivo de detecção óptico-eletrônico que permite analisar as propriedades físicas e químicas de partículas microscópicas suspensas em um meio líquido. Os principais marcadores fenotípicos da linhagem monocítica são as moléculas CD45, CD64, CD33, CD14, CD36, CD300, CD16 e HLA-DR expressas na superfície da membrana celular. Possivelmente, vários mecanismos contribuem para a hiperativação de macrófagos derivados de monócitos observados em pacientes com quadro severo de COVID-19. A produção tardia de IFN tipo I leva a um aumento do efeito citopático, promovendo um aumento da liberação de quimioatraentes de monócitos pelas células epiteliais alveolares que promovem o recrutamento de monócitos do sangue periférico para os pulmões. Estudos mostraram que o número de monócitos clássicos em pacientes com COVID-19 diminuiu em comparação aos pacientes saudáveis, e a quantidade de monócitos do tipo intermediário e não-clássico aumentou. Na análise por citometria de fluxo, monócitos CD14+CD16+ apresentaram o parâmetro FSC (forward-scatter), relacionado ao diâmetro celular, aumentado e o fenótipo foi compatível ao de monócitos inflamatórios. Morfologicamente esses monócitos apresentaram forma atípica e vacuolada, características usualmente não encontradas em controles saudáveis. Em resposta à invasão de microorganismos e à liberação citocinas inflamatórias na corrente sanguínea, os monócitos são estimulados a expressar em sua membrana o fator de coagulação III (CD142), molécula responsável pela ativação da cascata extrínseca da coagulação. Em situações de ausência de lesão tecidual, a indução da coagulação é dependente do recrutamento de monócitos inflamatórios CD142+ por células endoteliais. Na COVID-19, é observada uma disformidade da coagulação, supostamente mediada por monócitos, que está diretamente relacionada a um prognóstico desfavorável, à presença de lesão tecidual na sepse, falência de órgãos e morte..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (2) /

Doutorado: (1) .

Integrantes: Veridiane Maria Pscheidt - Integrante / MARIELA GRANERO FARIAS - Integrante / Amanda Dalbosco Machado - Integrante / Ana Paula Alegretti - Integrante / Ricardo Machado Xavier - Coordenador / Mariana Pires Garcia - Integrante.

**2020 - 2021**

Epidemiologia Molecular do Coronavírus SARS-CoV-2 no Rio Grande do Sul ? Relações filogenômicas, análise de mutações e detecção de coinfecções

Descrição: No final de 2019, um novo coronavírus, SARS-CoV-2, emergiu na população humana e rapidamente se espalhou por diversos países, causando uma infecção respiratória denominada COVID-19,1 a qual foi declarada pandemia pela Organização Mundial da Saúde em 11 de março de 2020.2 Até então, seis tipos de coronavírus capazes de causar infecção respiratória em humanos eram conhecidos: os alphacoronavirus 229E e NL63 e os betacoronavirus HKU1 e OC43, responsáveis por 15?30% das infecções respiratórias anuais; e os altamente patogênicos SARS-CoV e MERS-CoV, que causaram importantes epidemias em 2002?2003 e em 2012, respectivamente, com altas taxas de mortalidade.3 No Brasil, o primeiro caso de infecção por SARS-CoV-2 foi confirmado no dia 26 de fevereiro de 20204 e, no Rio Grande do Sul (RS), em 10 de março de 2020.5 Em ambos os casos, os indivíduos haviam viajado ao exterior e retornaram já infectados. Em 20 de março de 2020, a COVID-19 passou a ser considerada doença de transmissão comunitária em todo o território brasileiro,6 sendo que, no RS, 720 casos já foram confirmados, com 18 óbitos (até 14 de abril de 2020).7 Indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas que variam de leves e moderados (com tosse, febre, dor de cabeça e aumento da frequência respiratória), até sintomas graves e quadro crítico com pneumonia e necessidade de ventilação mecânica.8,9 O agravamento dos sintomas está associado à alta produção de citocinas e a uma resposta inflamatória exacerbada do indivíduo.9 Até o momento, não há vacina nem tratamento específicos para a COVID-19 e pouco se sabe sobre a doença, e a maioria dos estudos epidemiológicos e moleculares publicados são baseados em casos ocorridos em países como China e Itália, sendo necessário estudos com populações de outros países.10 No Rio Grande do Sul, ainda não há estudos epidemiológicos nem genômicos envolvendo SARS-CoV-2. Nesse contexto, conhecer os perfis

circulantes desse vírus no estado poderá contribuir para o entendimento da epidemiologia do SARS-CoV-2. Além disso, o estudo do viroma e do microbioma do trato respiratório superior dos pacientes fornecerá informações importantes acerca dos organismos patogênicos associados aos casos de síndrome respiratória aguda grave durante a pandemia da COVID-19.. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Veridiane Maria Pscheidt - Integrante / Tatiana Schäffer Gregianini - Integrante / Leticia Garay Martins - Integrante / Ana Beatriz Gorini da Veiga - Coordenador / Ana Paula Muterle Varela - Integrante / Adriana Seixas - Integrante / Fernanda Carpeggiani - Integrante / Fabiana Quoos Mayer - Integrante.

Número de produções C, T & A: 1

**2020 - 2021**

Avaliação da expressão de HLADR em monócitos como preditor do processo inflamatório infeccioso

Descrição: A sepse afeta anualmente milhões de pacientes em todo o mundo. Na sua fase inicial ocorre uma liberação sistêmica de citocinas pró inflamatórias necessárias para uma resposta efetiva contra a infecção. O excesso de produção destas citocinas está associado com a injuria celular, que leva a morte pela disfunção de múltiplos órgãos. Os monócitos têm um papel crucial na regulação imune e na defesa do hospedeiro contra organismos estranhos através da expressão na superfície de moléculas do CMH de classe II (HLADR), que são responsáveis pela apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4 e inicialização da cascata inflamatória durante a infecção. A expressão de HLADR de superfície em monócitos reflete o estado de ativação destas células, dando início à resposta imune celular e humoral. Monócitos com diminuição ou falta da expressão de HLADR estão fortemente inibidos na sua função de célula apresentadora de antígeno e perdem a habilidade para produzir mediadores inflamatórios na resposta para o respectivo estímulo. Assim, a expressão diminuída de HLADR em monócitos correlaciona-se com um risco de complicações infecciosas. Recentemente a expressão de HLADR em monócitos pode ser utilizada também para a estratificação e administração de GM-CSF em ensaios clínicos. Este biomarcador guia a terapia e parece eficaz e efetivo na restauração da imunocompetencia monocítica e redução da duração da ventilação mecânica e UCI/hospitalares.Como a imunossupressão não apresenta sinais

clínicos, há a necessidade urgente de um biomarcador que seja rápido, sensível e específico para a robustez do status imune dos pacientes. Assim, a diminuição da expressão do HLADR em monócitos circulantes, medidas por citometria de fluxo, é consensualmente aceita como um confiável indicador da imunossupressão em pacientes críticos e para a monitorização da terapia de imunomodulação. Estudos recentes mostram que a sepse é uma entidade bimodal: a primeira fase é caracterizada pela liberação sistêmica de citocinas proinflamatórias, tais como Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-a), IL-1, IL-8, IL-12, INF-gama e IL-6. O TNF-alfa é um mediador central da regulação do sistema imune e a IL-1 atua sinergicamente com o TNF-alfa, estimulando a liberação de mediadores tais como a IL-6, que participa na resposta inflamatória do hospedeiro e patogênese da sepse. Citocinas pro inflamatórias são necessárias para inicializar um efetivo processo inflamatório contra a infecção, enquanto o excesso de produção está associada com a disfunção de múltiplos órgãos e mortalidade. Na segunda fase, mediadores anti-inflamatórios tais como TGF-beta, IL-10, IL-13, IL-4 e prostaglandina E2 podem ser liberados em um esforço continuo para impedir a inflamação. Em pacientes com sepse severa e choque séptico, a superprodução de IL-6, produzida pelos monócitos, está correlacionada com o pior prognóstico. Baixos níveis de IL-6 no plasma combinados com a baixa expressão de HLADR e capacidade fagocítica, são talvez uma transição de hiperatividade a supressão do sistema imune. Altos níveis de IL-6 têm sido demonstrados como o melhor preditor de mortalidade em pacientes com sepse Assim, a IL6 um marcador de prognóstico de grande utilidade em pacientes com sepse e sugere que o teste de quantificação de IL-6, que é um método fácil e rápido, pode ser útil no screening e monitoramento de pacientes com sepse..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Integrantes: Veridiane Maria Pscheidt - Integrante / MARIELA GRANERO FARIAS - Coordenador / IURI VICENTE CAMARGO MORKIS - Integrante / FABIANE SPAGNOL PEDRAZZANI - Integrante / VICTORIA CARVALHO ROSA - Integrante.

## Projetos de extensão

**2017 - 2018**

Programa de Extensão Cuidando da Farmácia Caseira

Descrição: O Programa de Extensão Cuidando da Farmácia Caseira tem por objetivo promover o uso racional, guarda e descarte adequado de medicamentos, e o uso correto e seguro de plantas medicinais entre os usuários e equipes de Unidades de Saúde (USs) da zona norte de Porto Alegre e comunidade interna da UFCSPA. Através do programa são realizadas ações educativas para os usuários, e ações de formação continuada para as equipes das USs sobre os temas abordados pelo programa. Nas USs também são realizadas, para os usuários, campanhas de recolhimento de medicamentos vencidos, além de orientações sobre a guarda de descarte correto de medicamentos. Também estão previstas ações educativas, para os alunos de graduação da UFCSPA, que contribuam com a formação de profissionais de saúde quanto ao manejo da farmácia caseira e uso correto e seguro de plantas medicinais..
Situação: Concluído; Natureza: Extensão.
Alunos envolvidos: Graduação: (8) .

Integrantes: Veridiane Maria Pscheidt - Integrante / Aline L. Camargo - Coordenador / Kellen C. B. de Souza - Integrante / Lahanna da Silva Ribeiro - Integrante / Julia Maria Aïbar Correia - Integrante / Marina Ody Rodrigues - Integrante.

## Áreas de atuação

**1.**

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia / Subárea: Imunologia Celular.

**2.**

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia / Subárea: Citometria de Fluxo.

**3.**

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Virologia.

## Idiomas

**Inglês**

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

## Prêmios e títulos

**2023**

Melhor Apresentação Oral - Categoria Iniciação Científica, XIV Simpósio Sul de Imunologia.

## Produções

Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1.

FRÖHLICH, GUILHERME C. ; GREGIANINI, TATIANA S. ; PINHEIRO, FELIPE G. ; NASCIMENTO, RODRIGO ; CEZAR, THIAGO M. ; **PSCHEIDT, VERIDIANE M.** ; SELAYARAN, TAINA ; MARTINS, LETICIA G. ; GOMES, MARCELO FERREIRA DA COSTA ; SALVATO, RICHARD S. ; PEREIRA, ELISA C. ; GUIMARÃES RIBEIRO, VICTOR ; SCALIONI, LETICIA DE PAULA ; SIQUEIRA, MARILDA M. ; RESENDE, PAOLA C. ; VEIGA, ANA B. G. . Resurgence of human respiratory syncytial virus during COVID-19 pandemic in Southern Brazil. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, v. 96, p. e29551, 2024. **Citações:** WEB OF SCIENCE 4 | SCOPUS 3

2.

**PSCHEIDT, VERIDIANE M.**; DE SOUZA, PRISCILA OLIVEIRA ; FAZOLO, TIAGO ; MODENA, JOSÉ LUIZ PROENÇA ; SIMEONI, CAMILA ; TEIXEIRA, DANIEL ; SILVA, NATÁLIA BRUNETTI ; DOS SANTOS, KARINA BISPO ; JUNIOR, LUIZ RODRIGUES ; BONORINO, CRISTINA . A flow cytometry-based assay to measure neutralizing antibodies against SARS-CoV -2 virus. CYTOMETRY PART A, v. Epub a, p. 1-12, 2024.

3.

FAZOLO, TIAGO ; LIMA, KARINA ; FONTOURA, JULIA C. ; DE SOUZA, PRISCILA OLIVEIRA ; HILARIO, GABRIEL ; ZORZETTO, RENATA ; JUNIOR, LUIZ RODRIGUES ; **PSCHEIDT, VERIDIANE MARIA** ; DE CASTILHOS FERREIRA NETO, JAYME ; HAUBERT, ALISSON F. ; GAMBIN, IZZA ; OLIVEIRA, ALINE C. ; MELLO, RAISSA S. ; DE BASTOS BALBE E GUTIERRES, MATHEUS ; GASSEN, RODRIGO BENEDETTI ; COIMBRA, LAIS DURÇO ; BORIN, ALEXANDRE ; MARQUES, RAFAEL ELIAS ; SARTOR, IVAINE TAIS SAUTHIER ; ZAVAGLIA, GABRIELA OLIVEIRA ; et.al . Pediatric COVID-19 patients in South Brazil show abundant viral mRNA and strong specific anti-viral responses. Nature Communications, v. 12, p. x, 2021. **Citações:** WEB OF SCIENCE 25 | SCOPUS 25

4.

GARCIA, MP ; FARIAS, MG ; MACHADO, AD ; **PSCHEIDT, VM** ; BARBIERI, MP ; ALEGRETTI, AP ; XAVIER, RM . PERFIL LINFOCITÁRIO EM PACIENTES INTERNADOS COM COVID-19 DE GRAU SEVERO E NÃO SEVERO. Hematology, Transfusion and Cell Therapy JCR, v. 43, p. S513, 2021.

5.

☆ **PSCHEIDT, VERIDIANE MARIA**; GREGIANINI, TATIANA SCHAFFER ; MARTINS, LETICIA GARAY ; VEIGA, ANA BEATRIZ GORINI DA . Epidemiology of human adenovirus associated with respiratory infection in southern Brazil. REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY JCR, v. 2020, p. e2189, 2020. **Citações:** WEB OF SCIENCE ® 37 | SCOPUS 34

**Resumos publicados em anais de congressos**

1.

**PSCHEIDT, V. M.**; GREGIANINI, T. S. ; MARTINS, L. G. ; VEIGA, A. B. G. . Análise epidemiológica do adenovírus humano associado à infecção respiratória no Rio Grande do Sul. In: Congresso UFCSPA: Conectando saúde e sociedade, 2019, Porto Alegre. Análise epidemiológica do adenovírus humano associado à infecção respiratória no Rio Grande do Sul, 2019.

**Apresentações de Trabalho**

1.

**PSCHEIDT, V. M.**; SOUZA, P. O. ; FAZOLO, T. ; BONORINO, C. . A FLOW CYTOMETRY-BASED ASSAY TO MEASURE NEUTRALIZING ANTIBODIES AGAINST SARS-COV-2 VIRUS. 2023. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

2.

**PSCHEIDT, V. M.**; SOUZA, P. O. ; FAZOLO, T. ; BONORINO, C. . Avaliação de anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 utilizando citometria de fluxo. 2023. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

3.

**PSCHEIDT, V. M.**; HILARIO, G. T. M. ; FAZOLO, T. ; RODRIGUES JUNIOR, L. C. . Imunoterapia e resposta imune contra vírus: interleucina-21. 2020. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

4.

**PSCHEIDT, V. M.**; GREGIANINI, T. S. ; MARTINS, L. G. ; VEIGA, A. B. G. . Análise epidemiológica do adenovirus humano associado à infecção respiratória no Rio Grande do Sul. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5.

**PSCHEIDT, V. M.**; GONCALVES, G. D. . Hemovigilância do Receptor de Transfusão. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).

**Outras produções bibliográficas**

1.

FAZOLO, T. ; LIMA, K. ; FONTOURA, J. C. ; SOUZA, P. O. ; HILARIO, G. T. M. ; ZORZETTO, R. ; RODRIGUES JUNIOR, L. ; **PSCHEIDT, V. M.** ; FERREIRA NETO, J. C. ; HAUBERT, A. F. ; GAMBIN, I. ; OLIVEIRA, A. C. ; MELLO, R. S. ; GUTIERRES, M. B. B. E. ; GASSEN, R. B. ; SARTOR, I. T. S. ; ZAVAGLIA, G. O. ; FERNANDES, I. R. ; VARELA, F. H. ; POLESE-BONATTO, M. ; et.al . Strong anti-viral responses in pediatric COVID-19 patients in South Brazil 2021 (Prepint).

## Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

I Simpósio Nacional de Imunoterapia ? UFCSPA.A FLOW CYTOMETRY-BASED ASSAY TO MEASURE BLOCKING CAPACITY OF ANTIBODIES AGAINST PD-1AND PDL-1. 2024. (Simpósio).

2.

7th International Symposium on Immunobiologicals.A FLOW CYTOMETRY-BASED ASSAY TO MEASURE NEUTRALIZING ANTIBODIES AGAINST SARS-COV-2 VIRUS. 2023. (Simpósio).

3.

PROXIMA SYMPOSIUM 2023. 2023. (Simpósio).

4.

XIV Simpósio Sul de Imunologia.Avaliação de anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 utilizando citometria de

fluxo. 2023. (Simpósio).

**5.**

XLVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology. 2023. (Congresso).

**6.**

6th European Congress of Immunology. Evaluation of expression of HLA-DR in monocytes by flow cytometry as an indicator of inflammatory and infectious disease. 2021. (Congresso).

**7.**

Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular 2021. Perfil linfocitário em pacientes internados com COVID-19 de grau severo e não severo. 2021. (Congresso).

**8.**

II Congresso UFCSPA: conectando experiências em saúde global. Epidemiologia do Adenovírus Humano associado à infecção respiratória no Rio Grande do Sul. 2021. (Congresso).

**9.**

V International Symposium on Immunobiologicals. 2021. (Simpósio).

**10.**

XIII Curso de Inverno em Imunologia.Análise da expansão de linfócitos T CD8 na aplicação da interleucina-21/Ig como imunoterápico em camundongos imunossuprimidos e infectados com o vírus Herpes Simples Tipo 1. 2021. (Outra).

**11.**

XVII Congress of the Iberian Society of Cytometry - Virtual Edition. Evaluation of expression of HLA-DR in monocytes by flow cytometry as an indicator of inflammatory disease. 2021. (Congresso).

**12.**

Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul. Epidemiology of human adenovirus associated with respiratory infection in southern Brazil. 2020. (Congresso).

13.

V Biosciences Meeting ? Crossing Borders.Imunoterapia e resposta imune contra vírus: interleucina-21. 2020. (Encontro).

14.

Escola Gaúcha de Bioinformática. 2019. (Outra).

15.

Reunião do GT do Sangue RS. 2018. (Encontro).

16.

Curso de Boas Práticas no Ciclo do Sangue. 2017. (Encontro).

17.

II Jornada Acadêmica da Farmácia. 2017. (Outra).

18.

II Jornada da Liga do Sangue. 2017. (Outra).

19.

Treinamento de Hemovigilância. 2017. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1.

RIGO, G. ; **PSCHEIDT, V. M.** ; CAMPOS, M. C. ; GARCIA, N. ; MARMITT, C. ; HALL, E. ; OLIVEIRA, I. . III Jornada Acadêmica Farmácia UFCSPA. 2018. (Outro).

## Inovação

Projetos de pesquisa