

Joyce Alessandra Lima

Estabelecimento de modelo de co-cultura 3D entre linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células e linfócitos T CD8<sup>+</sup> tratados com anti-PD-1 e anti-PD-L1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de concentração:** Oncologia

**Nível:** Mestrado

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes

**Coorientador:** Dr. Renato José da Silva Oliveira

Barretos, SP

2025

Joyce Alessandra Lima

Estabelecimento de modelo de co-cultura 3D entre linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células e linfócitos T CD8<sup>+</sup> tratados com anti-PD-1 e anti-PD-L1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de concentração:** Oncologia

**Nível:** Mestrado

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes

**Coorientador:** Dr. Renato José da Silva Oliveira

Barretos, SP

2025

L732e Lima, Joyce Alessandra.

Estabelecimento de modelo de co-cultura 3D entre linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células e linfócitos T CD8+ tratados com anti-PD-1 e anti-PD-L1.. / Joyce Alessandra Lima. - Barretos, SP - 2024.

87 f. : il.

Orientador(a): Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes.

Coorientador(a): Dr. Renato José da Silva Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos - 2024.

1. Imunoterapia. 2. Co-cultura 3D. 3. Inibidores de checkpoint imunológico. I. Autor(a). II. Título.

CDD 616.98

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada por Nayara Bernardo de Mattos CRB 8/10172  
Biblioteca da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Joyce Alessandra Lima.

Título: “Estabelecimento de modelo de co-cultura 3D entre linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células e linfócitos T CD8+ tratados com anti-PD-1 e anti-PD-L1”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 29/08/2024

Banca Examinadora:

Dra. Fabiana Albani Zambuzi Roberto Instituição:

Hospital do Câncer de Barretos

Banca Examinadora:

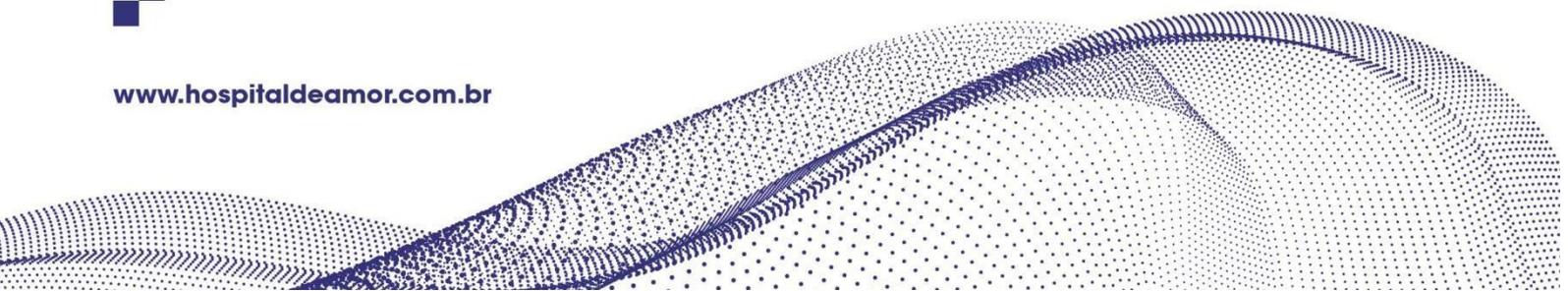
Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza

Instituição: Hemocentro de Ribeirão Preto (FMRP/USP).

Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes Orientadora

Dr. Renato José da Silva Oliveira Coorientador e

Presidente da Banca.



Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

*Dedico este trabalho a minha família, por serem  
minha fonte inesgotável de amor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pela dádiva da vida, por sua bondade e lealdade.

**A minha família**, por sempre acreditarem em mim e por todo sustento oferecido em cada etapa da minha vida.

A minha orientadora **Dra. Lidia Rebolho**, pela orientação, apoio, por sempre defender seus alunos, e por acreditar em nós.

Ao meu co-orientador **Dr. Renato Olivera**, que esteve comigo desde o meu primeiro dia em Barretos, minha sincera gratidão por ter sido uma peça tão fundamental nessa jornada.

A minha banca de acompanhamento **Dra. Leticia Ferro** e **Dr. Lucas Botelho**, por todas as considerações e auxílio ao longo da execução deste projeto. O encorajamento proporcionado por vocês foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa em Imuno-Oncologia, **Tauana Dias, Nathália Rodrigues, Katiane Tostes, Gabriela Rebolho, Bruna Sorroche, Renan Teixeira, Vinicius Gonçalves, Victor Paes, Isabela Tosi e Samuel Pratavieira**, agradeço imensamente por todo apoio oferecido durante a execução desse projeto.

Aos meus amigos de laboratório **Raquel Megid, Ingridy Izabela, Ideli Zanenco, Carol Shibuya, Giulia Stringhetta, Maria Clara Peixoto, Julia Dias, Patrik Vital, Igor Sampaio, Abu-Bakr Ariwoola, Pedro Resende, Thayane Santana, Leticia Ganem e Renan Zimaro**, por terem sido minha família durante o tempo que estive em Barretos, e por tornarem esse período mais leve.

As biólogas **Izabela Farias, Karina Mello e Marcela Rosa** por todo auxílio na bancada e além da bancada, por todo carinho e apoio.

Aos funcionários do **Hemonúcleo e da Patologia do Hospital de Amor** por terem me auxiliado durante o desenvolvimento deste trabalho e por toda paciência em me ensinar.

Ao **CPOM** (Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular) e a todos os **funcionários do Hospital de Amor**, que trabalham em conjunto para oferecer o melhor para todos os pacientes, familiares e funcionários.

Ao **Hospital de Amor e ao Ministério da Saúde** pelo apoio financeiro.

E por fim, a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram com o desenvolvimento deste projeto e com o meu crescimento pessoal e profissional.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana”

**Carl G. Jung**

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS.....	<b>12</b>
LISTA DE TABELAS.....	<b>17</b>
RESUMO.....	<b>20</b>
ABSTRACT.....	<b>21</b>
INTRODUÇÃO.....	<b>22</b>
1.1 Modelos pré-clínicos.....	22
1.2 Imunoterapia.....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 <i>Screening</i> das linhagens tumorais para expressão de PD-L1.....	30
4.2 Cultivo linhagens celulares.....	32
4.3 Formação de esferoide 3D.....	32
4.4 Isolamento de leucócitos.....	33
4.5 Isolamento de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> .....	35
4.6 Ativação de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> .....	36
4.7 Co-cultura (linhagem celular tumoral + linfócitos T CD8 <sup>+</sup> ).....	36
4.8 Cortes histológicos do modelo 3D.....	37
4.9 Infiltração dos linfócitos.....	38
4.10 Análise da área e perímetro do modelo 3D.....	38
4.11 Tratamento com inibidores do <i>checkpoint</i> imunológico.....	39
4.12 Análise dos resultados.....	40
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.1 Caracterização das linhagens celulares de CPNPC.....	40
5.2 Expressão de PD-L1 em linhagens celulares de CPNPC.....	41
5.3 Formação de esferoides.....	44
5.4 Estabelecimento do modelo de co-cultura esferoides e linfócitos T CD8 <sup>+</sup> ativados.....	46

5.5 Área e perímetro dos esferoides .....	49
5.6 Histologia dos modelos 3D.....	52
5.7 Área e perímetro dos esferoides após co-cultura .....	52
5.8 Infiltração de linfócitos nos modelos de co-cultura .....	55
5.9 Tratamento com anti-PD-L1 e anti-PD1.....	57
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
Anexo A – Formação de esferoides utilizando micromoldes de precisão para formar géis de agarose com micropoços .....	<b>84</b>
Anexo B – Formação de esferoides utilizando placas revestidas com Agarose .....	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático de zonas típicas de proliferação celular e centro necrótico em um esferoide 3D, e gráfico de oxigenação, nutrição e remoção de CO <sub>2</sub> . Adaptado de Edmondson et al. 2014 <sup>5</sup> .....	25
<b>Figura 2. Delineamento do estudo.</b> Seleção de linhagens celulares com expressão positiva e negativa de PD-L1, isolamento de subpopulações específicas de leucócitos provenientes de doadores saudáveis e estabelecimento de modelos de co-culturas. Após modelos estabelecidos, seguimos com o tratamento destes modelos de co-cultura com inibidores do checkpoint imunológico (anti-PD-L1 e anti-PD-1). .....	30
<b>Figura 3.</b> Cálculo de TPS. Imagem esquemática da avaliação da marcação de PD-L1 em células tumorais. A pontuação de proporção tumoral (TPS) é definida como o número de células tumorais positivas para PD-L1 dividido pelo número total de células tumorais viáveis multiplicado por 100. Imagem adaptada de Ruitter, E.J. et al., 2020 <sup>37</sup> . .....	32
<b>Figura 4.</b> Esquema ilustrando as etapas do processamento dos filtros para isolamento de PBMCs. 1) Cortou-se a extremidade da mangueira no sentido contrário ao processamento da bolsa de sangue. 2) A primeira extremidade cortada foi colocada dentro de um tubo Falcon. <b>Fonte:</b> Autora, 2022 (Criado com BioRender.com).....	34
<b>Figura 5.</b> Ilustração das camadas formadas após centrifugação de sangue com Ficoll, para isolamento de PBMCs. <b>Fonte:</b> Autora, 2022 (Criado com BioRender.com).....	34
<b>Figura 6</b> Imagem esquemática da formação da co-cultura entre linhagens tumorais de câncer de pulmão de não pequenas células e linfócitos T CD8 <sup>+</sup> previamente ativados. No dia 0, foi realizado o plaqueamento de 20.000 células tumorais em placa de baixa fixação para a formação de esferoides, no 3º dia foi realizado o isolamento e ativação de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> e por fim no 5º dia o co-cultivo. <b>Fonte:</b> Autora, 2024 (Criado com BioRender.com). .....	37
<b>Figura 7.</b> Desenho da placa utilizada para plaqueamento da co-cultura 3D e esquema das doses do tratamento com os inibidores do checkpoint imunológico anti-PD-1 e anti-PD-L1. ..	39
<b>Figura 8.</b> Imagem esquemática do tempo de tratamento do modelo 3D de co-cultura entre linhagens tumorais de CPCNP e linfócitos T CD8 <sup>+</sup> . No 5º dia foi realizada a co-cultura, no 7º dia foi realizado o primeiro tratamento com inibidores do checkpoint imunológico, no 9º dia o segundo tratamento e no 11º dia foi realizado a coleta de sobrenadante. <b>Fonte:</b> Autora, 2024 (Criado com BioRender.com). .....	40
<b>Figura 9.</b> Avaliação da expressão de PD-L1 avaliados por análise de Western Blotting nas linhagens de CPNPC. ....	42
<b>Figura 10.</b> (A) Níveis de PD-L1 normalizado pelos valores de Beta-Actina em análise pelo GraphPad Prism. (B) Análise densitométrica das bandas (unidades arbitrárias). .....	42
<b>Figura 11.</b> (A) Avaliação da marcação de PD-L1 por imuno-histoquímica nas linhagens de CPCNP. (B) Coloração em HE (Hematoxilina e Eosina) das linhagens de CPCNP. ....	43
<b>Figura 12.</b> Porcentagem da expressão de PD-L1 nas linhagens de CPCNP através da marcação por imuno-histoquímica, sendo H292 0%, COR-L105 13%, SKMES 50%, HCC827 96%, H1975 58%, H358 35% e A549 0%. .....	43

<b>Figura 13.</b> Foram testadas as seguintes linhagens de CPCNP na concentração de 12.000 células por poço, em microplacas de baixa fixação de 96 poços. <b>a)</b> A549; <b>b)</b> COR-L105; <b>c)</b> H358; <b>d)</b> H1975; <b>e)</b> HCC827; <b>f)</b> SKMES1; <b>g)</b> H292.....	45
<b>Figura 14.</b> Foram testadas as seguintes linhagens de CPCNP na concentração de 18.000 células por poço, em microplacas de baixa fixação de 96 poços. <b>a)</b> A549; <b>b)</b> COR-L105; <b>c)</b> H358; <b>d)</b> H1975; <b>e)</b> HCC827; <b>f)</b> SKMES1; <b>g)</b> H292.....	46
<b>Figura 15.</b> Modelos de co-cultura com esferoides estabelecidos com a linhagem A549 e linfócitos T CD8+ ativados. Em cada poço da placa de 24 poços coberto por agarose foram adicionados 10 esferoides com concentrações distintas de linfócitos: <b>a)</b> 100.000 linfócitos T CD8+; <b>b)</b> 250.000 linfócitos T CD8+; <b>c)</b> 500.000 linfócitos T CD8+; <b>d)</b> 750.000 linfócitos T CD8+; <b>e)</b> Após 24 horas todos os esferoides foram destruídos pelos linfócitos. ....	47
<b>Figura 16.</b> Esferoides com 100.000 células foram formados em placa de baixa fixação e os modelos de co-cultura foram estabelecidos com diferentes concentrações de linfócitos:10.000, 20.000, 30.000 e 40.000 linfócitos T CD8+, a última coluna representa o controle, sem linfócitos. h; horas. ....	48
<b>Figura 17.</b> Esferoides com 200.000 células foram formados em placa de baixa fixação e os modelos de co-cultura foram estabelecidos com diferentes concentrações de linfócitos: 10.000, 20.000, 30.000, 40.000 e 500.000 linfócitos T CD8+.....	49
<b>Figura 18.</b> Esferoides formados com a linhagem H292 utilizando a placa de baixa fixação e acompanhados por 8 dias. ....	50
<b>Figura 19.</b> Área dos esferoides monitorados por 8 dias (n=4), (Shapiro-Wilk p>0,05, ANOVA ONE-way p<0,05 e Turkey pós-teste). Letras nas barras dos gráficos acompanhados por **** correspondem a p<0,0001 em relação ao grupo correspondente, segundo letras na abscissa do gráfico. Letras acompanhadas por * correspondem a p<0,05.....	51
<b>Figura 20.</b> Perímetro dos esferoides monitorados por 8 dias (n=4). (Shapiro-Wilk p>0,05, ANOVA ONE-way p<0,05 e Turkey pós-teste).....	51
<b>Figura 21.</b> Cortes realizados com criostato dos esferoides formados a partir das linhagens de CPCNP e corados em HE. ....	52
<b>Figura 22.</b> Co-cultura 3D entre esferoides H292 cultivados por 5 dias e 6.000 linfócitos T CD8+ monitorados durante o período de três dias após o co-cultivo. <b>A)</b> primeiro dia após a co-cultura, <b>B)</b> segundo dia de co-cultura e <b>C)</b> terceiro dia. As imagens (D-F) são os controles em que esferoides H292 foram cultivados isoladamente durante o <b>D)</b> 6º dia <b>E)</b> 7º dia e <b>F)</b> 8º dia.	53
<b>Figura 23.</b> <b>A)</b> Área dos esferoides no modelo de co-cultura 3D com 6.000 linfócitos T CD8+. <b>B)</b> Perímetro dos esferoides no modelo de co-cultura 3D acompanhado por três dias. (Shapiro-Wilk p>0,05, ANOVA ONE-way p<0,05 e Turkey pós-teste), barras no gráfico acompanhada por * representa p<0,05 e *** representa p<0,0005, (n=4). ....	53
<b>Figura 24.</b> Co-cultura 3D entre esferoides H292 cultivados por 5 dias e 4.000 linfócitos T CD8+ monitorados durante o período de três dias após o co-cultivo. <b>A)</b> primeiro dia após a co-cultura, <b>B)</b> segundo dia de co-cultura e <b>C)</b> terceiro dia. As imagens (D-F) são os controles em que esferoides H292 foram cultivados isoladamente durante o <b>D)</b> 6º dia <b>E)</b> 7º dia e <b>F)</b> 8º dia.	54

<b>Figura 25. A)</b> Área dos esferoides no modelo de co-cultura 3D com 4000 linfócitos T CD8 <sup>+</sup> . <b>B)</b> Perímetro dos esferoides no modelo de co-cultura 3D acompanhado por três dias. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste).....	55
<b>Figura 26.</b> Co-cultura 3D realizada com esferoide da linhagem H292 com 20.000 células e 6.000 linfócitos T CD8 <sup>+</sup> . <b>A)</b> Coloração HE da co-cultura (esferoide + linfócitos) <b>B)</b> Coloração HE do esferoide, somente (controle) <b>C)</b> Análise da expressão de CD3 por imuno-histoquímica no modelo de co-cultura <b>D)</b> Análise da expressão de CD8 por imuno-histoquímica no modelo de co-cultura.....	56
<b>Figura 27.</b> Co-cultura 3D realizada com esferoide da linhagem H292 com 20.000 células e 4.000 linfócitos T CD8 <sup>+</sup> . <b>A)</b> Coloração HE da co-cultura (esferoide + linfócitos) <b>B)</b> Coloração HE do esferoide, somente (controle) <b>C)</b> Análise da expressão de CD3 por imuno-histoquímica no modelo de co-cultura <b>D)</b> Análise da expressão de CD8 por imuno-histoquímica no modelo de co-cultura.....	56
<b>Figura 28.</b> Esquema do tratamento realizado 24 horas após o estabelecimento do modelo de co-cultura 3D. A co-cultura foi realizada no 5º dia após a formação do esferoide, o primeiro tratamento se deu no 6º dia, seguido pelo segundo tratamento no 8º dia e por fim a coleta do sobrenadante realizado no 10º dia. ....	57
<b>Figura 29.</b> Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H292, em que o tratamento se deu 24 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento. ....	58
<b>Figura 30.</b> Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 24 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). ....	59
<b>Figura 31.</b> Esquema do tratamento realizado 48 horas após o estabelecimento do modelo de co-cultura 3D. A co-cultura foi realizada no 5º dia após a formação do esferoide, o primeiro tratamento se deu no 7º dia, seguido pelo segundo tratamento no 9º dia e por fim a coleta do sobrenadante realizado no 11º dia. ....	60
<b>Figura 32.</b> Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H292, em que o tratamento se deu 48 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento. ....	60
<b>Figura 33.</b> Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 48 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). ....	61
<b>Figura 34.</b> Área do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 48 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). ....	61
<b>Figura 35.</b> Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H358, em que o tratamento se deu 48 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento. ....	62

<b>Figura 36.</b> Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H358, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 48 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). 62	
<b>Figura 37.</b> Área do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H358, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 48 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). ..... 63	
<b>Figura 38.</b> Esquema do tratamento realizado 72 horas após o estabelecimento do modelo de co-cultura 3D. A co-cultura foi realizada no 5º dia após a formação do esferoide, o primeiro tratamento se deu no 8º dia, seguido pelo segundo tratamento no 10º dia e por fim a coleta do sobrenadante no 12º dia. .... 63	
<b>Figura 39.</b> Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H292, em que o tratamento se deu 72 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento. .... 64	
<b>Figura 40.</b> Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 72 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). 65	
<b>Figura 41.</b> Área do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 72 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). ..... 65	
<b>Figura 42.</b> Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H358, em que o tratamento se deu 72 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento. .... 66	
<b>Figura 43.</b> Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H358, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 72 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). 66	
<b>Figura 44.</b> Área do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 72 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk $p>0,05$ , ANOVA ONE-way $p<0,05$ e Turkey pós-teste). ..... 67	
<b>Figura 45.</b> Co-cultura 3D entre esferoides H292 que foram cultivados por 5 dias e posteriormente co-cultivados com 4000 linfócitos TCD8 <sup>+</sup> em 100µL de meio T Cell Media monitorados durante o período de três dias após o co-cultivo. <b>A)</b> primeiro dia após a co-cultura, <b>B)</b> segundo dia de co-cultura e <b>C)</b> terceiro dia. .... 68	
<b>Figura 46.</b> Formação de um esferóide representado com a linhagem H292 cultivada por 3 dias. <b>(A)</b> 1º dia, formação de agregados celulares soltos via ligação integrina-MEC; <b>(B)</b> 2º dia, um período de atraso para expressão e acumulação de caderina; <b>(C)</b> 3º dia, formação de esferóides compactos através de interações entre caderinas <sup>72</sup> . Adaptado de BENIEN, P; SWAMI, A. (2024). ..... 73	
<b>Figura Suplementar 4.</b> Captura dos esferoides formados a partir da linhagem A549. <b>a)</b> e <b>b)</b> A549, utilizando-se uma pipeta P1000. .... 86	

**Figura Suplementar 5.** Em **a)** e **b)** captura dos esferoides da linhagem H292 com pipeta P100. **c)** e **d)** captura de esferoides da linhagem LCOR105 com pipeta P100. **e)** e **f)** esferoides H292 WT capturados com pipeta *pasteur*, e **g)** e **h)** linhagem LCOR105 capturadas com pipeta *pasteur*. .....86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais diferenças nas características e processos celulares em sistemas de cultura bidimensionais e tridimensionais. Adaptado de Edmondson et al. 2014 <sup>5</sup> . .....	23
<b>Tabela 2.</b> Linhagens celulares de CPNPC avaliadas: A549, H358, H1975, HCC827, SKMES1, COR-L105, NCI-H292. Histologia correspondente e status de mutação para os genes KRAS, NRAS, PIK3CA, EGFR, ERBB2, ALK, ROS1, BRAF, TP53, RET e MET. ....	41

## LISTA DE ABREVIATURA

AD	Adenocarcinoma
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase (Quinase de Linfoma Anaplásico)
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene (Proto-Oncogene B-Raf)
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CD3	Cluster of Differentiation 3
CD8	Cluster of Differentiation 8
cm	Centímetros
CPNPC	Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ERBB2	Receptor Tyrosine Kinase 2
g	grama
GZMB	Granzima B
h	Hora
HE	Hematoxilina e Eosina
ICI	Inibidores do Checkpoint Imunológico
IC50	Concentração Inibitória 50%
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
L	Litro
m	Metro
ME	Mucoepidermóide
MEC	Matriz Extracelular
MET	Mesenchymal Epithelial Transition Factor
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mAb	Anticorpo Monoclonal
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene
p	Nível de significância (p-valor).
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PD-1	Morte Programada 1
PD-L1	Ligante de Morte Programada 1
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PRF1	Perforina
RET	Rearranged During Transfection
ROS1	Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
s	Segundo
TP53	Tumor Protein p53
TPS	Tumor Proportion Score (Pontuação de Proporção Tumoral)

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
≤	Menor ou igual

## RESUMO

LIMA, JA. Estabelecimento de modelo de co-cultura 3D entre linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células e linfócitos T CD8<sup>+</sup> tratados com anti-PD-1 e anti-PD-L1. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Amor; 2024.

**INTRODUÇÃO:** A imunoterapia tem revolucionado o tratamento do câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), especialmente com o uso de inibidores do *checkpoint* imunológico anti-PD-1 e anti-PD-L1. No entanto, a eficácia desses tratamentos varia entre os pacientes, destacando a necessidade de modelos pré-clínicos que possam prever melhor a resposta ao tratamento, além de auxiliar na triagem de medicamentos. Sendo os modelos de co-cultura 3D mais preditivos do que os modelos 2D pois mimetizam melhor o microambiente tumoral, permitindo interações celulares mais realistas. Ao capturar a complexidade do estroma e das interações tumorais, esses modelos proporcionam resultados mais próximos ao observado in vivo, especialmente no que se refere à resposta aos inibidores de *checkpoint* imunológico.

**OBJETIVO:** Estabelecer modelos de co-cultura 3D entre linhagens celulares de CPNPC e linfócitos provenientes de sangue periférico de indivíduos saudáveis e avaliar sua interação quando tratados com inibidores de *checkpoint* imunológico.

**METODOLOGIA:** Realizamos um *screening* da expressão de PD-L1 nas diferentes linhagens de CPNPC por Western Blotting e Imuno-histoquímica. O modelo de co-cultura 3D foi estabelecido utilizando-se placas de baixa fixação, os leucócitos provenientes de doadores saudáveis foram isolados a partir de filtros de leucodepleção utilizados durante as doações de sangue (Hemonúcleo), e os linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram isolados por seleção negativa e ativados por *beads* magnéticas contendo CD3/CD28. As lâminas histológicas foram padronizadas através de criocortes, a fim de visualizar a infiltração por linfócitos nos esferoides. Após o tratamento do modelo 3D de co-cultura com anti-PD-1 e anti-PD-L1, as interações entre as células foram analisadas por meio de análise de imagens e quantificação do halo linfocitário, em microscópio.

**RESULTADOS:** Não observamos diferenças entre os tratamentos com anti-PD-1 e anti-PD-L1 nas linhagens H358 e H292, contudo, ambos os tratamentos induziram o aumento do halo linfocitário em comparação ao controle sem tratamento. Notavelmente, as linhagens H358 e H292, com expressão positiva e negativa de PD-L1, respectivamente, apresentaram tamanhos distintos do halo linfocitário ao tratamento com Durvalumab nas concentrações de 150pM e 100pM, sugerindo uma possível influência da expressão de PD-L1 na eficácia terapêutica.

**CONCLUSÃO:** Estabelecemos um modelo de co-cultura 3D, entre linhagens tumorais e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, caracterizado por sua simplicidade e reprodutibilidade. Os resultados obtidos evidenciam a capacidade do modelo em promover uma resposta imunológica frente ao tratamento com inibidores de *checkpoint* imunológico. Desta forma, este modelo tem potencial para auxiliar no desenvolvimento de novas terapias, e na otimização de estratégias terapêuticas combinadas.

**Palavras chaves:** imunoterapia; co-cultura 3D; inibidores de *checkpoint* imunológico.

## ABSTRACT

LIMA, JA. Establishment of a 3D co-culture model between non-small cell lung cancer cell lines and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes treated with anti-PD-1 and anti-PD-L1. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2024.

**INTRODUCTION:** Immunotherapy has revolutionized the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC), especially with the use of immune checkpoint inhibitors targeting PD-1 and PD-L1. However, the effectiveness of these treatments varies among patients, highlighting the need for preclinical models that can better predict treatment response. **OBJECTIVE:** To establish 3D co-culture models between NSCLC cell lines and lymphocytes derived from peripheral blood of healthy individuals and to evaluate their interaction when treated with immune checkpoint inhibitors. **METHODOLOGY:** We performed a screening of PD-L1 expression in different NSCLC cell lines (Western Blotting and Immunohistochemistry). The 3D co-culture model was established using low-binding plates, and leukocytes from healthy donors were isolated from leukodepletion filters, with CD8<sup>+</sup> T lymphocytes isolated and activated by magnetic beads. Histological slides were standardized by cryosectioning. After treatment of the 3D co-culture model with anti-PD-1 and anti-PD-L1, cell interactions were analyzed by image analysis and quantification of the lymphocytic halo. **RESULTS:** No differences were observed between treatments with anti-PD-1 and anti-PD-L1; however, both treatments induced an increase in the lymphocytic halo compared to the untreated control group. Notably, the H358 and H292 cell lines, with positive and negative PD-L1 expression, respectively, showed distinct responses to the treatments, suggesting a possible influence of PD-L1 expression on therapeutic efficacy. **CONCLUSION:** We established a 3D co-culture model between tumor cell lines and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, characterized by its simplicity and reproducibility. The results obtained demonstrate the model's ability to promote an immune response to treatment with immune checkpoint inhibitors. Thus, this model has the potential to assist in the development of new therapies and optimization of combined therapeutic strategies.

**Keywords:** immunotherapy, 3D co-culture, immune checkpoint inhibitors.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Modelos pré-clínicos

O desenvolvimento de novos medicamentos para o câncer envolve um custo significativo, variando de US\$ 0,5 bilhão a US\$ 2 bilhões, e um extenso período de cerca de 12 anos, desde a seleção inicial de um composto promissor até a aprovação para uso clínico. Este processo inclui ensaios pré-clínicos seguidos por ensaios clínicos em humanos, buscando validar e obter a aprovação para o tratamento de doenças<sup>1,2</sup>.

Os modelos pré-clínicos são fundamentais nos estágios iniciais do desenvolvimento de novas drogas para o tratamento dos tumores, uma vez que constituem a etapa de avaliação da eficácia e segurança de novos compostos antes que avancem para ensaios clínicos em humanos. Entretanto, a grande maioria dos medicamentos com resultados pré-clínicos favoráveis falham subsequentemente em ensaios clínicos em humanos, sendo a taxa de aprovação final pela FDA (*Food and Drug Administration*), de 5 a 7%<sup>1,2</sup>.

Em parte, o fracasso das terapias em alcançar eficácia nos ensaios clínicos pode ser explicado devido a variabilidade de fatores presentes nos pacientes em relação a simplicidade dos modelos pré-clínicos, que incluem os ensaios de cultura celular e os testes em modelos animais. Entre as variabilidades estão anomalias genéticas, microambiente tumoral, potencial metastático *in vivo*, metabolismo do medicamento e respostas imunológicas do hospedeiro. Além disso, os horários e métodos de administração, a dosagem e as interações entre terapias combinadas, variam significativamente em humanos em comparação com as linhagens celulares e os modelos animais<sup>3</sup>.

Assim, a escolha correta de modelos pré-clínicos em cada estágio é vital para o sucesso do empreendimento de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, resultando em um maior benefício para o paciente e medicamentos mais rentáveis. Para isso, é necessário primeiro o desenvolvimento de novos modelos pré-clínicos, mais representativos da biologia tumoral humana, os quais possam atuar como melhores preditores de sucesso em ensaios clínicos<sup>4</sup>.

Entre os modelos pré-clínicos, destacam-se os modelos *in vitro*, que incluem linhagens celulares derivadas de tumores humanos, propagadas em cultura bidimensional (2D) e modelos

tridimensionais (3D). Os ensaios utilizando cultura de células representam uma etapa crucial no processo de descoberta de medicamentos, proporcionando uma alternativa mais ágil e econômica em comparação aos testes em animais em larga escala e com alto custo<sup>5,6</sup>.

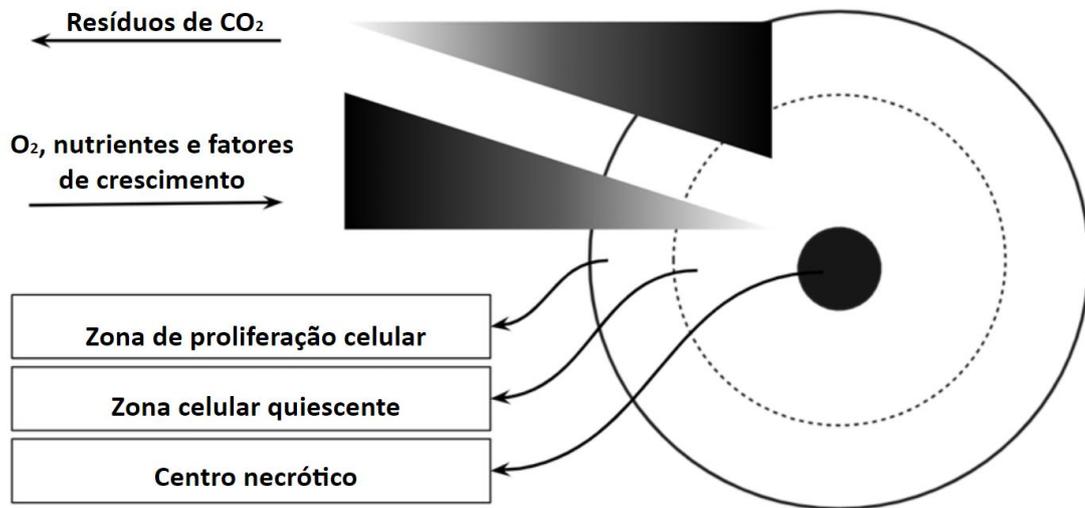
Embora a cultura 2D forneça informações importantes sobre potenciais agentes antitumorais nos estágios iniciais do desenvolvimento de drogas, este modelo carece de características essenciais para recapitular a fisiologia tridimensional *in vivo*, ou seja, interações espaciais célula-célula, contato com a matriz extracelular (MEC), demanda metabólica, gradientes de nutrientes, penetração de drogas que ocorrem *in vivo*, aumento da hipóxia devido ao crescimento da massa tumoral e efeitos do microambiente tumoral<sup>6,7,8</sup>. Como resultado, os testes de cultura de células 2D às vezes fornecem dados enganosos e não preditivos para respostas *in vivo*<sup>5</sup> (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Principais diferenças nas características e processos celulares em sistemas de cultura bidimensionais e tridimensionais. Adaptado de Edmondson et al. 2014<sup>5</sup>.

Características celulares	2D	3D
<b>Morfologia</b>	Células planas e esticadas em monocamada	Forma natural em estruturas esferóides/agregadas
<b>Proliferação</b>	Muitas vezes proliferam a uma taxa mais rápida do que <i>in vivo</i>	Pode proliferar a uma taxa mais rápida/lenta em comparação com células cultivadas em 2D, dependendo do tipo de célula e/ou tipo de sistema de modelo 3D
<b>Exposição a meios/drogas</b>	As células em monocamada são igualmente expostas a nutrientes/fatores de crescimento/drogas que são distribuídas no meio de crescimento	Nutrientes e fatores de crescimento ou medicamentos podem não conseguir penetrar totalmente no esferóide, atingindo células próximas ao núcleo
<b>Estágio do ciclo celular</b>	É provável que mais células estejam no mesmo estágio do ciclo celular devido a	Os esferóides contêm células em proliferação, quiescentes, hipóxicas e necróticas

	serem igualmente expostas ao meio	
<b>Expressão genética/proteica</b>	Muitas vezes exibem níveis diferenciais de expressão de genes e proteínas em comparação com modelos <i>in vivo</i>	As células frequentemente exibem perfis de expressão gênica/proteica mais semelhantes aos das origens teciduais <i>in vivo</i>
<b>Sensibilidade a medicamentos</b>	As células muitas vezes cedem ao tratamento e os medicamentos parecem ser muito eficazes	As células são frequentemente mais resistentes ao tratamento em comparação as de cultura 2D, pois os medicamentos podem não conseguir penetrar o centro dos esferoides, sendo muitas vezes melhores preditores de respostas a medicamentos <i>in vivo</i>

Desta forma, os modelos 3D denominados esferoides, mimetizam as condições fisiopatológicas semelhantes ao modelo *in vivo*, tornando-o uma excelente ferramenta para testar a eficácia de medicamentos e avaliar novos compostos antitumorais<sup>9</sup>. Quando cultivadas em sistemas de cultura 3D, as células formam agregados ou esferoides dentro de uma matriz ou num meio de suspensão. Nos esferoides celulares, as interações célula-célula e as interações célula-MEC mimetizam de maneira fidedigna a fisiologia do *in vivo*, conferindo à morfologia celular uma semelhança notável com sua forma natural no organismo. Além disso, os esferoides 3D são compostos por células em vários estágios, geralmente incluindo células em proliferação, quiescentes, apoptóticas, hipóxicas e necróticas. As camadas externas de um esferoide, que estão altamente expostas ao meio, são compostas principalmente por células viáveis e em proliferação. As células centrais recebem menos oxigênio, fatores de crescimento e nutrientes do meio e tendem a ficar em estado quiescente ou hipóxico. Essa heterogeneidade celular é muito semelhante ao tecido *in vivo*<sup>5</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1.** Diagrama esquemático de zonas típicas de proliferação celular e centro necrótico em um esferoide 3D, e gráfico de oxigenação, nutrição e remoção de CO<sub>2</sub>. Adaptado de Edmondson et al. 2014<sup>5</sup>.

A heterogeneidade tumoral refere-se à diversidade de células dentro de um tumor, que pode variar em termos de características genéticas, morfológicas e funcionais. Isso dificulta o desenvolvimento de modelos pré-clínicos eficazes, pois muitas vezes os modelos não conseguem capturar essa diversidade. As culturas celulares tumorais bidimensionais (2D), embora amplamente usadas, não conseguem reproduzir essa complexidade estrutural e interações celulares. Como resultado, essas culturas apresentam limitações, especialmente em triagens de medicamentos, pois não refletem com precisão como o tumor responde ao tratamento no contexto de sua arquitetura e microambiente tridimensional<sup>10</sup>.

Os tumores são heterogêneos e compreendem células malignas, células imunológicas e microambiente dinâmico contendo quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. Este cenário heterogêneo representa um desafio em constante crescimento no desenvolvimento de modelos que possam capturar com precisão a diversidade do ecossistema tumoral e, portanto, prever de forma confiável como os tumores respondem ou desenvolvem resistência ao tratamento<sup>11</sup>.

Nesse contexto, os modelos de co-cultura se destacam entre os ensaios *in vitro* pois permitem estudar a interação entre múltiplas populações de células em uma condição mais semelhante à fisiológica, quando comparada a monoculturas<sup>8, 12, 13</sup>. O desenvolvimento de modelos de co-cultura no contexto de pesquisa na área oncológica torna-se interessante, por exemplo, entre linhagens tumorais e linfócitos. Modelos *in vitro* que refletem a complexidade da interação entre o sistema imunológico e os tumores são limitados e difíceis de estabelecer. Entretanto, tais métodos têm o potencial para se tornar ferramenta de triagem no uso de imunoterapias<sup>14-16</sup>.

## 1.2 Imunoterapia

A imunoterapia é um tratamento inovador que consiste na modulação do sistema imunológico, fortalecendo-o e permitindo que ele possa reconhecer e destruir as células tumorais, e/ou atingir estas células de modo a parar ou desacelerar seu crescimento, impedindo que se disseminem para outras partes do corpo, evitando assim a formação de metástases<sup>17, 18</sup>.

No microambiente tumoral o sistema imunológico age reconhecendo e eliminando as células malignas, com destaque para os linfócitos T que exercem papel fundamental devido sua capacidade de infiltrar tumores sólidos, sendo amplamente aceito que a infiltração de células imunes pode impactar o tumor e atuar como indicador prognóstico<sup>19-21</sup>. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, em especial, possuem mecanismo de ação antitumoral e exercem função citotóxica antígeno-específico, eles reconhecem as células tumorais e secretam granzima B (GZMB) e perforina (PRF1) promovendo a apoptose e morte celular<sup>22</sup>.

Entre as imunoterapias disponíveis, estão os inibidores do *checkpoint* imunológico (ICIs), sendo o pioneiro desenvolvido em 2011, o ipilimumabe que é um anticorpo monoclonal (mAb) que tem como alvo o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4). Nos últimos anos, novos mAbs inibidores de *checkpoint* que visam a morte celular programada 1 (PD-1) ou seu ligante, ligante PD-1 (PD-L1) foram desenvolvidas e aprovadas para o uso clínico<sup>23</sup>.

Em especial os ICIs anti-PD-1/PD-L1 revolucionaram a forma com que pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) são tratados, isso se torna evidente pelo fato de que os inibidores de *checkpoint* atualmente fazem parte do conjunto de medidas de

tratamento de CPNPC em estadiamento avançado, como nos estadios III e IV<sup>24</sup>. Os ICIs têm a função de restaurar as respostas antitumorais das células T, bloqueando a inibição da ativação dos linfócitos T<sup>24</sup>. Exemplos de inibidores do *checkpoint* aprovados para o tratamento do câncer de pulmão de não pequenas células são: anti-PD-1 nivolumabe (IgG humana), pembrolizumabe (IgG4 humanizado) e cemiplimabe (IgG4 humano), anti-PD-L1 atezolizumabe (IgG1 humano), durvalumabe (IgG1 humana projetada) e anti-CTLA-4 ipilimumabe (IgG1 humana)<sup>25-27</sup>.

Fisiologicamente, as moléculas do *checkpoint* têm função de manter a auto tolerância do sistema imune, ou seja, inibindo a ativação excessiva das células T após o reconhecimento de antígenos próprios, evitando assim o ataque imunológico a células saudáveis<sup>23</sup>. Para isso, as proteínas do *checkpoint* iniciam vias de sinalização que inibem a ativação dos linfócitos T. Entre tais proteínas está o PD-1 que é um receptor de superfície celular co-inibitório expresso em vários tipos de células imunes, como os linfócitos T, B e células NK, e se liga aos ligantes PD-L1 e PD-L2, essa interação torna o linfócito T anérgico. A interação PD-1/PD-L1 ativa um sinal que inibe a ativação e proliferação de linfócitos T mediados pelo complexo proteico do receptor de células T (em inglês T-cell receptor, sigla TCR), que suprime a secreção de citocinas, como IFN- $\gamma$  e IL-2, e promove apoptose dos linfócitos T citotóxicos e a diferenciação em linfócitos T reguladores<sup>28</sup>. O PD-L1 é expresso em vários tipos de tecidos, incluindo células tumorais, enquanto PD-L2 é expresso principalmente em células hematopoiéticas<sup>29-31</sup>.

Com o desenvolvimento do câncer as células tumorais evoluem para escapar da destruição imunológica através de mecanismos que mimetizam a tolerância imune periférica<sup>32</sup>. Um exemplo deste mecanismo é o aumento da expressão de PD-L1 na superfície das células tumorais, que, ao se ligar com PD-1 nas células T, inibe a sua função efetora, impedindo-as de destruir o tumor, mesmo após o reconhecimento como uma célula estranha. Sendo assim, bloquear as interações PD-1/PD-L1 com anticorpos monoclonais e promover a ativação de linfócitos T é uma estratégia promissora para a destruição das células tumorais<sup>23</sup>.

Os resultados dos tratamentos com inibidores de *checkpoint* imunológico nos últimos anos têm demonstrado aumento da sobrevivência de pacientes com CPNPC, contudo, as taxas de resposta ao tratamento são de cerca de 20%, o benefício, portanto, tem sido observado em apenas um subconjunto de pacientes, e a resistência secundária é comum entre aqueles que

responderam inicialmente sendo assim, ainda existem desafios consideráveis para compreender por que certos pacientes não respondem ao tratamento<sup>30,33</sup>.

A resistência primária define o grupo de pacientes que não se beneficiam da imunoterapia devido à ausência de resposta inicial ao tratamento. Enquanto a resistência secundária se trata de pacientes que responderam inicialmente ao tratamento contudo, recidivaram após um período de resposta. Os mecanismos extrínsecos conhecidos de resistência à imunoterapia incluem CTLA-4, PD-1 e outras moléculas do *checkpoint* imunológico, exaustão de linfócitos T, presença de populações de células imunossupressoras (Tregs, macrófagos do tipo II) e liberação de citocinas e metabólitos no microambiente tumoral<sup>34</sup>. Destacando a necessidade de identificar mecanismos de imunossupressão, incluindo aqueles presentes no microambiente tumoral, que tem a capacidade de afetar a eficácia da imunoterapia<sup>6,35</sup>.

As interações entre célula-célula e célula-matriz, envolvendo células tumorais, estromais e imunes, exercem papel fundamental durante todo o desenvolvimento do câncer. Além disso, tais interações estão diretamente relacionadas com o prognóstico do paciente e na resposta terapêutica. Há, portanto, a necessidade de entender os efeitos da imunoterapia dentro do microambiente tumoral, levando a abordagens mais eficazes e aproveitando todo o potencial do microambiente tumoral como alvo terapêutico. Sendo interessante portanto, o desenvolvimento de métodos que permitam estudar a interação entre sistema imunológico e tumor<sup>6,14</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os protocolos atuais de co-cultura entre células tumorais e imunes apresentam inúmeras etapas de preparo, e podem variar de acordo com o tipo e maneira que as células imunes foram obtidas. Outro fato conflitante entre os protocolos atuais disponíveis pode ser atribuído a razão célula/célula usadas nas construções destes modelos mais complexos. De fato, as vantagens sobre o uso de modelos que mimetizam o microambiente tumoral se sobressaem sobre modelos em monocamada, por permitirem a uma análise mais profunda das interações entre estas células e vêm sendo amplamente usadas em fases iniciais no desenvolvimento de

novas imunoterapias, como terapia com células CAR-T, vacinas contra o câncer e terapia com inibidores de *checkpoint*.

Desta forma, este trabalho justifica-se devido a necessidade de modelos pré-clínicos que permitam a análise da interação entre tumor e sistema imunológico, fornecendo uma ferramenta de triagem no uso de imunoterapias e no desenvolvimento de novos medicamentos e que facilita a avaliação da resposta imune ao câncer em etapas pré-clínicas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

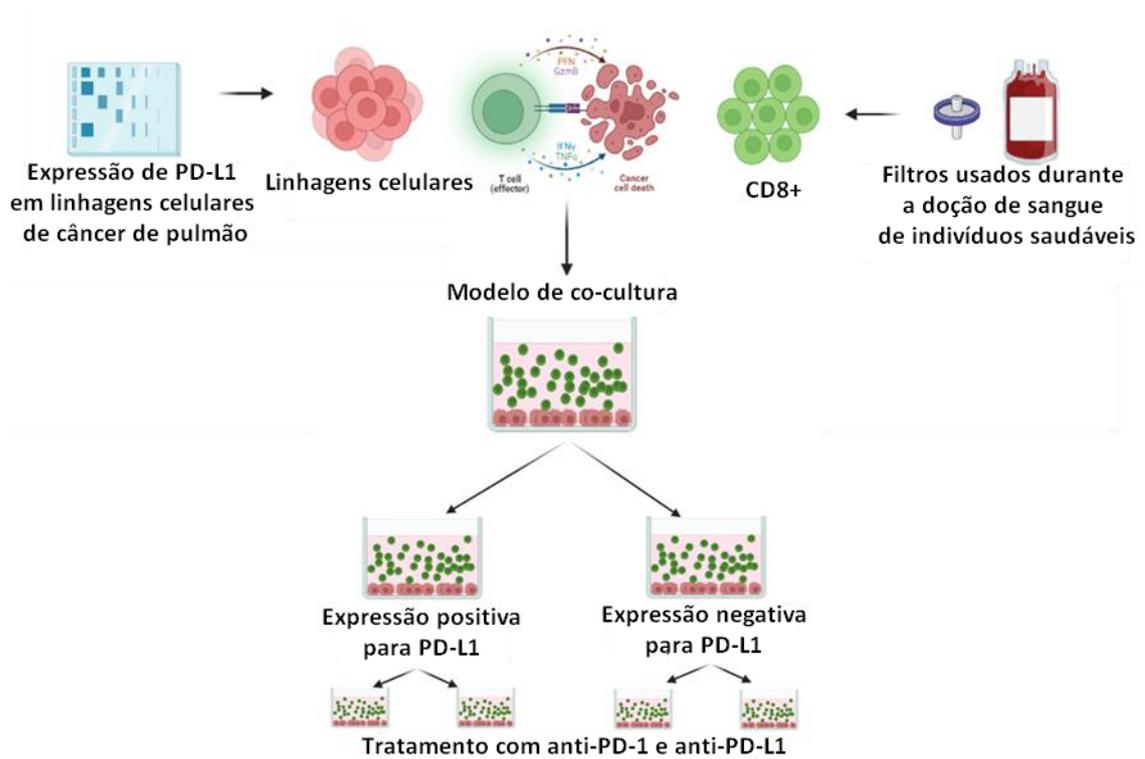
Estabelecer modelos de co-cultura 3D entre linhagens celulares de CPNPC e linfócitos provenientes de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a expressão de PD-L1 nas linhagens celulares de CPNPC;
- ✓ Estabelecer modelos de co-cultura 3D entre linhagens celulares de CPNPC e linfócitos provenientes de sangue periférico de indivíduos saudáveis;
- ✓ Tratar as co-culturas com os imunoterápicos anti-PD-1/PD-L1.

### 4. MÉTODOS

O estudo foi aceito pelo CEP sob número CEP-HCB 2270/2021. O desenho do presente estudo está representado na **Figura 1**.



**Figura 2. Delineamento do estudo.** Seleção de linhagens celulares com expressão positiva e negativa de PD-L1, isolamento de subpopulações específicas de leucócitos provenientes de doadores saudáveis e estabelecimento de modelos de co-culturas. Após modelos estabelecidos, seguimos com o tratamento destes modelos de co-cultura com inibidores do *checkpoint* imunológico (anti-PD-L1 e anti-PD-1).

#### 4.1 *Screening* das linhagens tumorais para expressão de PD-L1

Foi realizado um *screening* avaliando a expressão de PD-L1 nas diferentes linhagens de CPNPC, disponíveis no banco de células do Hospital de Amor, através da técnica de Western Blotting e Imunocitoquímica para seleção das linhagens que sejam positivas e negativas para este marcador.

Após obtenção do *pellet* celular das linhagens de interesse, foi realizado a extração das proteínas e a quantificação total usando o método de Bradford. Resumidamente, para a técnica de Western Blotting, os lisados celulares (20  $\mu$ g de proteína) foram visualizados em 10% SDS-PAGE e transferido para membranas de nitrocelulose em TransBlot Turbo transfer (BioRad) e incubadas em leite em pó desnatado a 5% em TBS-T por 1 h à temperatura ambiente antes da incubação overnight com anticorpos primários anti-PD-L1 (Abcam #ab205921) com diluição de 1:1000, e  $\beta$ -actina (Cell Signaling) com diluição de 1:1000 para controle, a 4°C diluídos em BSA.

O anticorpo secundário foi incubado por 1h em leite desnatado em temperatura ambiente na diluição de 1:1000, e a detecção feita com ECL Western Blot Reagents no ImageQuant mini automático LAS4000 (GE Healthcare).

A quantificação por densitometria dos resultados obtidos através da técnica de western blotting foi realizada pelo software ImageJ através dos plugins analyze – gels – select first line e novamente analyze – gels – plot lanes – a ferramenta “Straight” foi utilizada para delimitar os picos do gráfico, a fim de individualizar as bandas, seguido pelo uso da ferramenta “Wand”. Por fim, a quantificação de PD-L1 foi normalizada pela quantificação da  $\beta$ -actina.

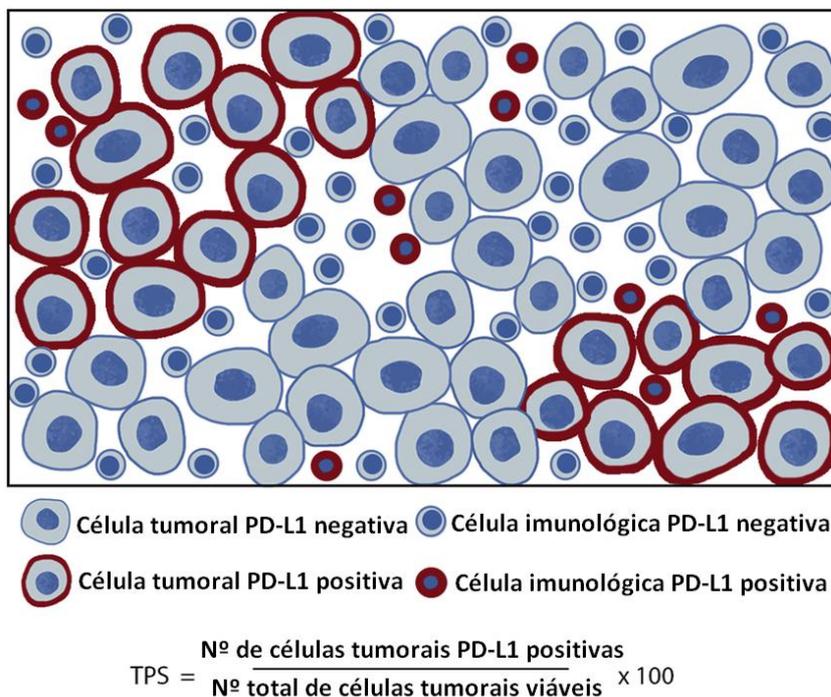
Na realização da imuno-histoquímica, empregou-se a técnica de *Cell Block* para as linhagens CPCNP. Inicialmente, os pellets das linhagens celulares foram incorporados em gel de agarose, e posteriormente, esse conjunto de agarose e pellet celular foi incluído em parafina, seguido pelo processo de corte em micrótomo. Na etapa específica da imuno-histoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas, procedimento seguido pela recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, realizou-se o bloqueio proteico e a incubação de 50  $\mu$ L do anticorpo primário PD-L1 (Dako) *overnight* a 4°C. Na fase de detecção, empregou-se 50  $\mu$ L do reagente *visualization HR*, com incubação por 30 minutos. Este processo foi sucedido pela incubação adicional de 2 minutos com DAB, seguida pela contra-coloração com hematoxilina. Como controle da reação foi utilizado tecido de linfonodo, positivos para a marcação de PD-L1.

Foi realizada a contagem de 100 células tumorais em cada lâmina das linhagens de CPCNP e dessas células foi considerada as positivas para marcação de PD-L1 em membrana como exemplificado na **Figura 3**, utilizando a técnica de pontuação de proporção tumoral (TPS do inglês Tumor Proportion Score), o resultado expressa a porcentagem de marcação de membrana em células tumorais, sendo classificado em:

TPS <1%: Ausência de expressão.

TPS 1- 49%: Baixa expressão.

TPS >50%: Alta expressão<sup>36</sup>.



**Figura 3.** Cálculo de TPS. Imagem esquemática da avaliação da marcação de PD-L1 em células tumorais. A pontuação de proporção tumoral (TPS) é definida como o número de células tumorais positivas para PD-L1 dividido pelo número total de células tumorais viáveis multiplicado por 100. Imagem adaptada de Ruiter, E.J. et al., 2020<sup>37</sup>.

#### 4.2 Cultivo linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens tumorais de câncer de pulmão de não pequenas células depositadas no Banco de Células do Hospital de Amor. De maneira geral, as células foram cultivadas em meio DMEM ou RPMI, suplementados com 10% de SFB (soro fetal bovino- Gibco) e 1% de P/S (Penicilina/Streptomicina) em frascos de cultura e incubadas à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade, até atingirem confluência. As linhagens foram autenticadas quanto ao perfil de short tandem repeat (STR) e testadas quinzenalmente para a presença de micoplasma, seguindo as normas de boas práticas laboratoriais do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Amor.

#### 4.3 Formação de esferoide 3D

Quando as células atingiram 100% de confluência, elas foram desagregadas com tripsina, seguido por centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado

e o pellet celular ressuspenso em meio de cultura. As células foram então contadas com auxílio do contador automático Countess (Thermo Scientific™) e para cada linhagem celular foi semeada 20.000 células por poço em 100 µl de meio RPMI completo (10% SFB e 1% P/S) para a formação de esferoides usando microplacas de baixa fixação de 96 poços Nunclon™ Sphera™ de fundo ultrabaixo (Thermo Scientific™).

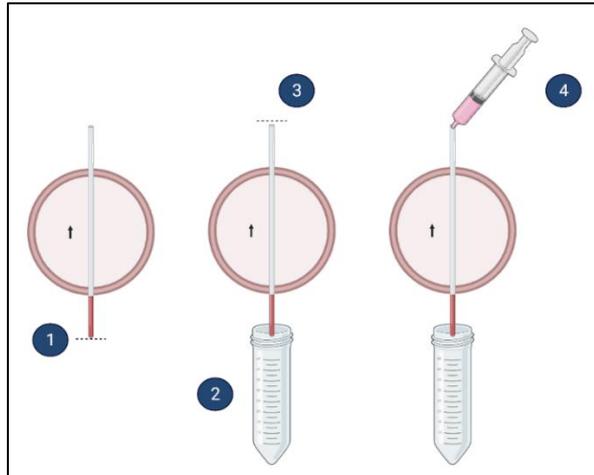
#### 4.4 Isolamento de leucócitos

O isolamento dos leucócitos seguiu o protocolo previamente padronizado pelo grupo<sup>38</sup>. O protocolo foi otimizado adaptando-o às necessidades específicas do modelo de co-cultura.

Sendo assim, os leucócitos foram isolados a partir de filtros de leucodepleção que são normalmente descartados durante a rotina do hemonúcleo do Hospital de Amor. Os filtros de leucodepleção são utilizados durante a doação de sangue total e doação de hemácias por aférese de indivíduos saudáveis, a fim de remover e ou reduzir a quantidade de leucócitos nos componentes sanguíneos.

Inicialmente cada mangueira do filtro de leucodepleção foi posicionada dentro de um tubo Falcon de 50 mL no sentido contrário ao processamento da bolsa de sangue. Posteriormente, cortou-se as extremidades das mangueiras, sendo que a primeira porção da mangueira a ser cortada foi a que estava dentro do Falcon e, em seguida, a porção que estava para cima (**Figura 4**, etapas 1 a 3).

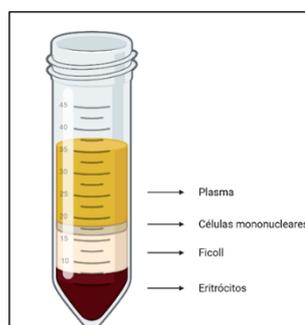
Utilizando-se uma seringa de 20 mL, adicionou-se 13 mL de meio RPMI-1640 (*Invitrogen*), com o objetivo de “lavar” o filtro para a retirada de todas as células que estavam em seu interior (**Figura 4**, etapa 4). Em seguida foi injetado ar pela mangueira com a mesma seringa, a fim de que todo sangue que ainda estava dentro do filtro saísse, sendo necessário cessar a transferência de ar para o filtro a partir da formação de espuma.



**Figura 4.** Esquema ilustrando as etapas do processamento dos filtros para isolamento de PBMCs. 1) Cortou-se a extremidade da mangueira no sentido contrário ao processamento da bolsa de sangue. 2) A primeira extremidade cortada foi colocada dentro de um tubo Falcon. **Fonte:** Autora, 2022 (Criado com BioRender.com).

Em seguida, o volume total foi dividido em dois tubos Falcons de 50 mL, e adicionou-se 13 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bioscience). em cada tubo, removendo cuidadosamente a pipeta sorológica do pipetador, evitando que os líquidos se misturem, para isso deve-se levantar a pipeta cuidadosamente e tampar a parte superior da pipeta com o dedo.

A mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 20 minutos com desaceleração 3. Após rotação os tubos foram colocados de volta ao gabinete de segurança, cuidadosamente, a fim de evitar que as camadas se misturem. O sangue total foi separado em 4 camadas (**Figura 5**):



**Figura 5.** Ilustração das camadas formadas após centrifugação de sangue com Ficoll, para isolamento de

PBMCs. **Fonte:** Autora, 2022  
(Criado com BioRender.com).

Em seguida, aspirou-se metade do plasma restante de cada tubo usando uma pipeta Pasteur de vidro acoplado a uma bomba a vácuo. Com uma pipeta P1000, foi coletado a camada composta pelas células mononucleares e transferido para um Falcon 50 mL. Adicionou-se meio RPMI (1% P/S) no Falcon até completar 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos (desaceleração 9). Nessa etapa algumas amostras precisaram realizar a lise de hemácias, aquelas que não tiveram necessidade, deu-se continuidade do protocolo.

#### Caso precise de Lise:

Removeu-se o sobrenadante e em seguida preparou-se 5 mL de solução de *lysing buffer* (BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer) 1:10, em água mili-Q autoclavada, para cada tubo. Ressuspendeu-se o pellet com 5 mL da solução e foi realizado a incubação por 3 minutos. A inativação da reação foi realizada com meio RPMI completo, até o volume de 50 mL, seguido por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos.

#### Caso não precise de Lise:

Por fim, foi descartado o sobrenadante, e realizado a suspensão do pellet de células mononucleares em 5 mL (podendo ser utilizado até 20 mL dependendo do tamanho do pellet) de RPMI completo com pipeta sorológica homogeneizando bem o tubo. Em seguida utilizando uma pipeta P10, transferiu-se 10 µL de células para um tubo de 0,6 mL, adicionou-se 10 µL de Azul de Tripán ao tubo de 0,6 mL, e por fim, foi realizada a homogeneização e a transferência de 10 µL da mistura para câmara de Neubauer, para contagem de leucócitos totais (LT) no microscópio foi utilizado o cálculo abaixo:

$$LT = \frac{x \text{ total}}{\text{quadrantes}} * 2 \text{ (fator diluição)} * 10.000 * \text{volume ressuspensão (mL)}$$

#### **4.5 Isolamento de linfócitos T CD8<sup>+</sup>**

Logo após o isolamento das células mononucleares, os linfócitos citotóxicos foram isolados com o kit de enriquecimento de linfócitos T CD8 humanos BD IMag™ que é utilizado para a seleção negativa de linfócitos T CD8 do sangue periférico. Para isso uma concentração

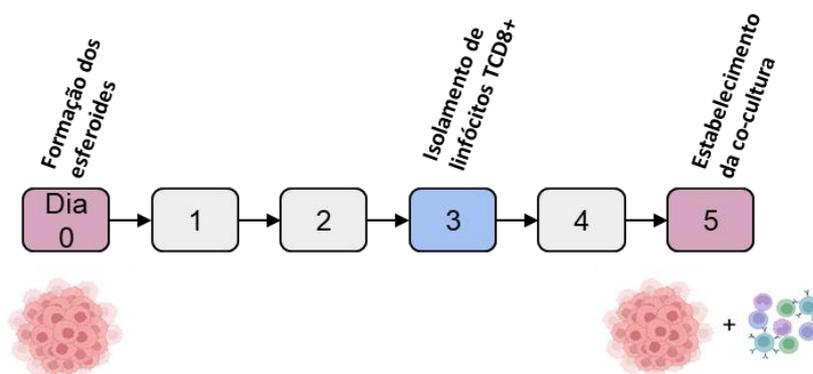
de  $10 \times 10^6$  células mononucleares, obtidas a partir dos filtros de leucodepleção, foram ressuspensas em 1 mL de tampão 1X BD IMag. Em seguida as células foram incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente em 50  $\mu$ l do reagente de enriquecimento de linfócitos T humanos biotinizados. As células marcadas foram lavadas em 1 mL de tampão 1X BD IMag e centrifugadas por 7 minutos a 1500 rpm, e o sobrenadante removido. Posteriormente as células devem ser incubadas com o reagente BD IMag Streptavidin por 30 minutos em temperatura ambiente, e lavadas com 450  $\mu$ l de tampão 1X BD IMag. Por fim o conteúdo deve ser transferido para um tubo de ensaio de citometria e o tubo colocado no ímã de separação de células/rack magnética (posição vertical) por 8 minutos. O conteúdo livre de células deve ser transferido para um novo tubo de citometria. E o tubo contendo as *beads* deve ser lavado mais duas vezes com tampão e incubado por 8 minutos na rack magnética. O conteúdo final foi centrifugado e o pellet ressuspenso em 500  $\mu$ l de T Cell Media (RPMI-1640, 10% SFB, 1% L-glutamine, 1% Pen-Strep, 1% HEPES e 1% NEAA), e por fim realizada a contagem de linfócitos citotóxicos totais por câmara de Neubauer.

#### 4.6 Ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>

Para a ativação dos linfócitos foi utilizado o kit Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 para expansão e ativação de células T. Os linfócitos foram transferidos para poço de placa de 12 poços com 1mL de meio de cultura T Cell Media, com 25  $\mu$ l de reagente de ativação para cada  $1 \times 10^6$  de linfócitos T CD8<sup>+</sup> previamente isolados, juntamente com 1 $\mu$ l/mL correspondendo a 50UI de IL-2 Humana Recombinante BD Pharmingen™.

#### 4.7 Co-cultura (linhagem celular tumoral + linfócitos T CD8<sup>+</sup>)

Após 5 dias da formação dos esferoides em placas de baixa fixação com 20.000 células tumorais e 48 horas após a ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi realizada a co-cultura, como representado na **Figura 6**.



**Figura 6** Imagem esquemática da formação da co-cultura entre linhagens tumorais de câncer de pulmão de não pequenas células e linfócitos T CD8+ previamente ativado. No dia 0, foi realizado o plaqueamento de 20.000 células tumorais em placa de baixa fixação para a formação de esferoides, no 3º dia foi realizado o isolamento e ativação de linfócitos T CD8+ e por fim no 5º dia o co-cultivo. **Fonte:** Autora, 2024 (Criado com BioRender.com).

Para isso, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> previamente ativados foram transferidos para tubos de citometria, e em seguida para a rack magnética por 8 minutos, a fim de separar os linfócitos das *beads* de ativação. Posteriormente foi realizado a contagem de linfócitos totais utilizando a câmara de Neubauer.

Removeu-se o meio de cultura dos esferoides, seguindo para o co-cultivo dos esferoides tumorais com linfócitos citotóxicos em uma proporção de célula tumoral para linfócitos de (5:1). Sendo, portanto, plaqueados 4.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup> em 100 µl de meio T Cell Media, em cada poço da placa de baixa fixação contendo os esferoides tumorais.

#### 4.8 Cortes histológicos do modelo 3D

Para a análise histológica, optou-se pela utilização do procedimento de criocorte. Os esferoides foram transferidos para um tubo microtubo de 0,6 mL e, em seguida, foram adicionados 200 µL de eosina, incubando-se por um período de 10 minutos para torná-los visíveis. Posteriormente aplicou-se o composto de incorporação para criosecção O.C.T Tissue Plus (Fisher HealthCare) no fundo de um blister. O blister foi então colocado em contato com gelo seco e, assim que o composto atingiu uma tonalidade esbranquiçada, foi retirado do

contato com gelo seco e inserido O.C.T até o topo do blister. Os esferoides foram cuidadosamente pipetados no centro do blister, que foi rapidamente transferido para o gelo seco e armazenado em freezer-80°C por pelo menos 24 horas antes da realização dos cortes. Esse procedimento possibilitou a subsequente realização do corte em criostato, e os cortes foram realizados a 8µm.

#### 4.9 Infiltração dos linfócitos

Para análise da infiltração dos linfócitos nos esferoides, foi realizado o criocorte da co-cultura, e em seguida a realização da marcação de CD8 e CD3 por imuno-histoquímica.

Após o criocorte as lâminas foram mantidas em freezer -20°C, para a realização da imuno-histoquímica foi realizado o bloqueio proteico, seguido pela lavagem da lâmina e incubação de 50 µL do anticorpo primário CD3 e CD8 (Dako) por 1 hora a 4°C. Na fase de detecção, empregou-se 50 µL do reagente *visualization HR*, com incubação por 30 minutos. Este processo foi sucedido pela incubação adicional de 2 minutos com DAB, seguida pela contra-coloração com hematoxilina.

#### 4.10 Análise da área e perímetro do modelo 3D

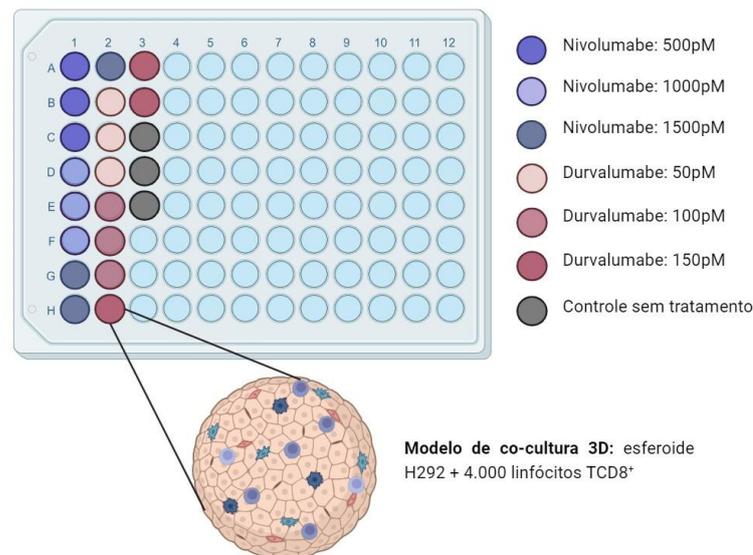
A área e o perímetro dos esferoides foram calculados através do software Fiji (Fiji Is Just ImageJ). Inicialmente, a calibração da escala foi realizada utilizando o *plugin* Analyze – Set Scale, no qual a escala da imagem obtida pelo microscópio foi selecionada. Posteriormente, a medição do esferoide foi realizada utilizando os plugins Image – Adjust – Color Threshold – Analyze – Analyze Particles.

A medição do halo linfocitário nos modelos de co-cultura 3D foi realizada utilizando o software Image-Pro Plus. Primeiramente, foi realizada a calibração da escala utilizando o plugin Measure – Calibration – Spatial – New – Image. Em seguida, as medições do halo linfocitário foram conduzidas utilizando o plugin Measure – Measurements.

#### 4.11 Tratamento com inibidores do *checkpoint* imunológico

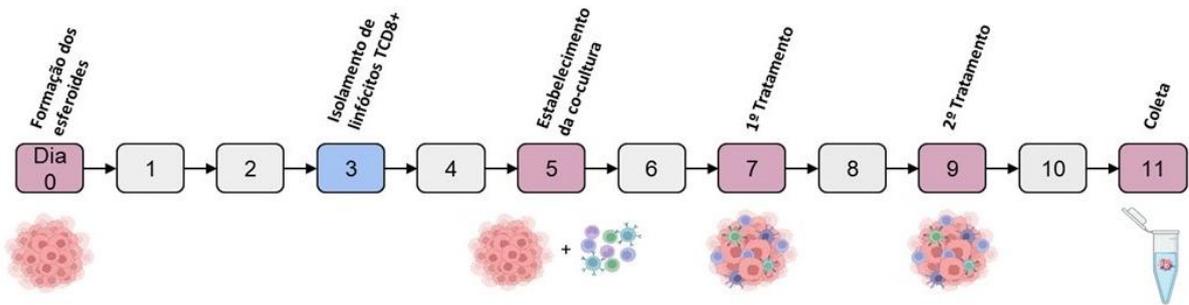
Para investigar o efeito do tratamento com anti-PD-L1 e anti-PD-1 nos modelos de co-cultura com linhagem positiva e negativa para PD-L1, os modelos foram tratados com diferentes concentrações dos anticorpos. Para o tratamento com anti-PD-1 (Nivolumabe OPDIVO®), utilizamos a concentração de IC50 relatada na revisão de literatura, que foi de 1000 pM. Além disso, testamos uma concentração acima do IC50 (1500 pM) e uma concentração abaixo do IC50 (500 pM) para avaliar possíveis efeitos dose-dependentes<sup>39-42</sup>.

Enquanto para o tratamento com anti-PD-L1 (Durvalumabe IMFINZI®) foi utilizado o IC<sub>50</sub> de 100 pM e testamos uma concentração acima do IC50 (150 pM) e uma concentração abaixo do IC50 (50 pM)<sup>39, 42</sup>, os tratamentos foram realizados em triplicata como demonstrado na **Figura 7**.



**Figura 7.** Desenho da placa utilizada para plaqueamento da co-cultura 3D e esquema das doses do tratamento com os inibidores do *checkpoint* imunológico anti-PD-1 e anti-PD-L1.

O primeiro tratamento foi realizado após 48 horas da co-cultura, sendo adicionado as concentrações descritas anteriormente em um volume de 50  $\mu$ l por poço. Após 48 horas foi realizado o segundo tratamento, e por fim, após 48 horas realizado a coleta do sobrenadante, como demonstrado na **Figura 8**.



**Figura 8.** Imagem esquemática do tempo de tratamento do modelo 3D de co-cultura entre linhagens tumorais de CPCNP e linfócitos T CD8<sup>+</sup>. No 5º dia foi realizada a co-cultura, no 7º dia foi realizado o primeiro tratamento com inibidores do *checkpoint* imunológico, no 9º dia o segundo tratamento e no 11º dia foi realizado a coleta de sobrenadante. **Fonte:** Autora, 2024 (Criado com BioRender.com).

#### 4.12 Análise dos resultados

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 8.0.2 para a digitação e análise estatística dos dados. A normalidade foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, enquanto a comparação entre três ou mais grupos foi realizada por meio do teste de ANOVA ONE-WAY. Para análises de comparações múltiplas, o teste de Tukey foi aplicado como pós-teste. Todos os resultados foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das linhagens celulares de CPNPC

Das sete linhagens de CPNPC disponíveis no Banco de Células do Hospital de Câncer de Barretos, cinco são de adenocarcinoma, uma de carcinoma de células escamosas e uma de mucoepidermóide. Quatro delas apresentam mutações em genes como *KRAS*, *PIK3CA*, *EGFR*, *TP53* e *RET*, nenhuma apresentou mutação para os genes *NRAS*, *ERBB2*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, e *MET* e duas apresentam genótipo selvagem, ou seja, sem mutação para estes genes analisados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Linhagens celulares de CPNPC avaliadas: A549, H358, H1975, HCC827, SKMES1, COR-L105, NCI-H292. Histologia correspondente e *status* de mutação para os genes *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *EGFR*, *ERBB2*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *TP53*, *RET* e *MET*.

Linhagem	A549	H358	H1975	HCC827	SKMES1	COR-L105	H292	
Histologia	AD	AD	AD	AD	CCE	AD	ME	
Status de mutação	<i>KRAS</i>	p.G12S	p.G12C	WT	WT	WT	WT	WT
	<i>NRAS</i>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	<i>PIK3CA</i>	WT	WT	p.G118D	WT	WT	WT	WT
	<i>EGFR</i>	WT	WT	L858R+T790M	Del19	WT	WT	WT
	<i>ERBB2</i>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	<i>ALK</i>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	<i>ROS1</i>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	<i>BRAF</i>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	<i>TP53</i>	WT	WT	p.R273H	V218del	p.E298X	WT	WT
	<i>RET</i>	WT	WT	WT	N723S	M1109T	WT	WT
	<i>MET</i>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

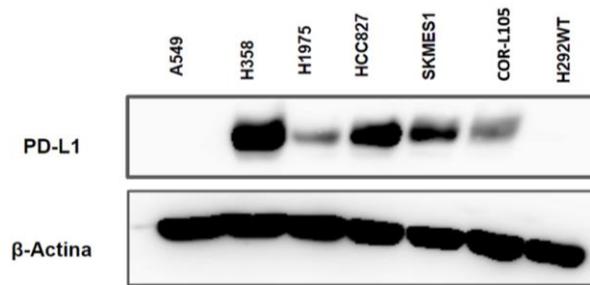
WT: Wild-Type (do inglês, selvagem). AD: Adenocarcinoma. CCE: Carcinoma de Células Escamosas. ME: Mucoepidermóide.

O status de mutação das linhagens de CPNPC para os genes *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *EGFR* e *ERBB2* foram obtidos a partir de um estudo conduzido no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos por Oliveira et al. (2022)<sup>43</sup>.

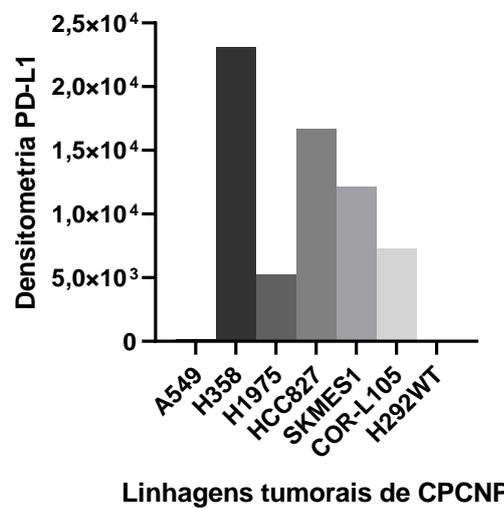
Para os genes *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *TP53*, *RET* e *MET* foi realizado uma busca no banco de dados cBioPortal e busca na literatura<sup>44-46</sup>.

## 5.2 Expressão de PD-L1 em linhagens celulares de CPNPC

Foram realizados experimentos de Western Blotting para avaliar a expressão de PD-L1 nas linhagens disponíveis. Visualizamos a ausência de expressão proteica de PD-L1 nas linhagens A549 e H292, e expressão positiva em H358, H1975, HCC827, SKMES1 e COR-L105 (Figuras 9 e 10).

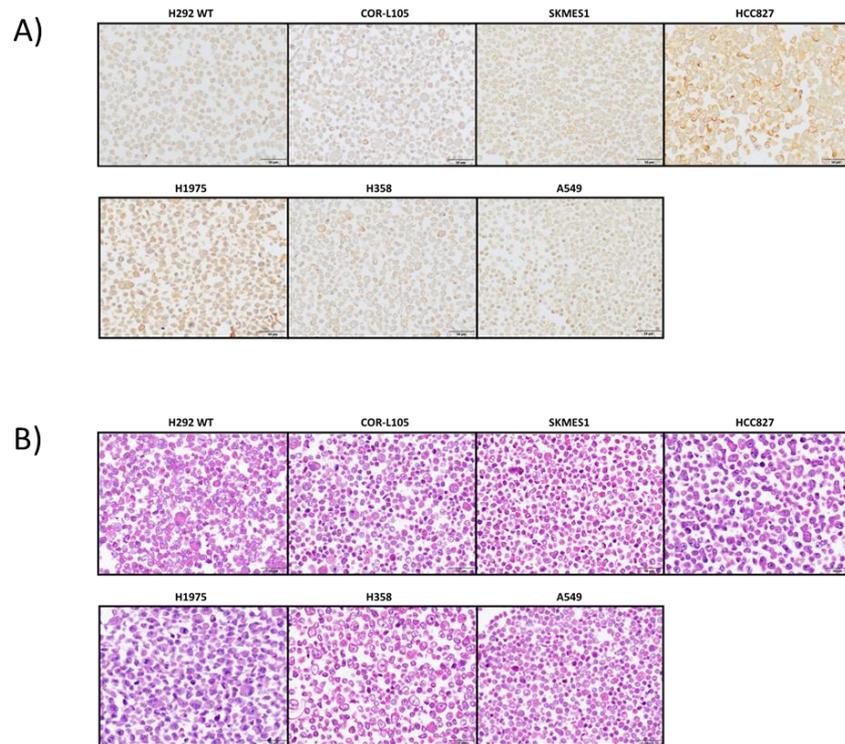


**Figura 9.** Avaliação da expressão de PD-L1 avaliados por análise de Western Blotting nas linhagens de CPNPC.

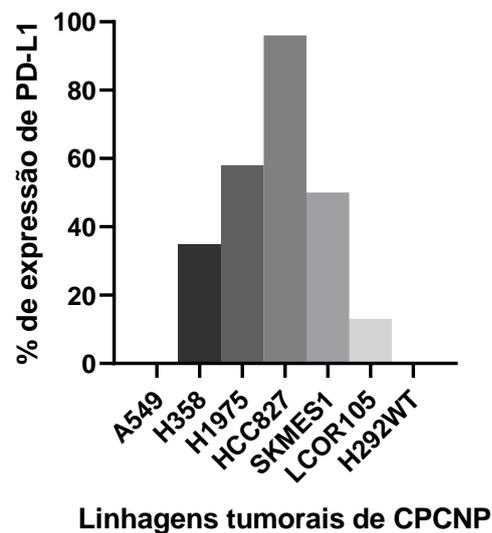


**Figura 10.** (A) Níveis de PD-L1 normalizado pelos valores de Beta-Actina em análise pelo GraphPad Prism. (B) Análise densitométrica das bandas (unidades arbitrárias).

Em seguida realizou-se a avaliação da expressão de PD-L1 por imuno-histoquímica nas linhagens de CPCNP, sendo possível observar, novamente, a ausência de expressão de PD-L1 nas linhagens A549 e H292, e expressão positiva nas linhagens HCC 827, H1975, H358, SKMES1 e COR-L105 (**Figuras 11 e 12**).



**Figura 11.** (A) Avaliação da marcação de PD-L1 por imuno-histoquímica nas linhagens de CPCNP. (B) Coloração em HE (Hematoxilina e Eosina) das linhagens de CPCNP.



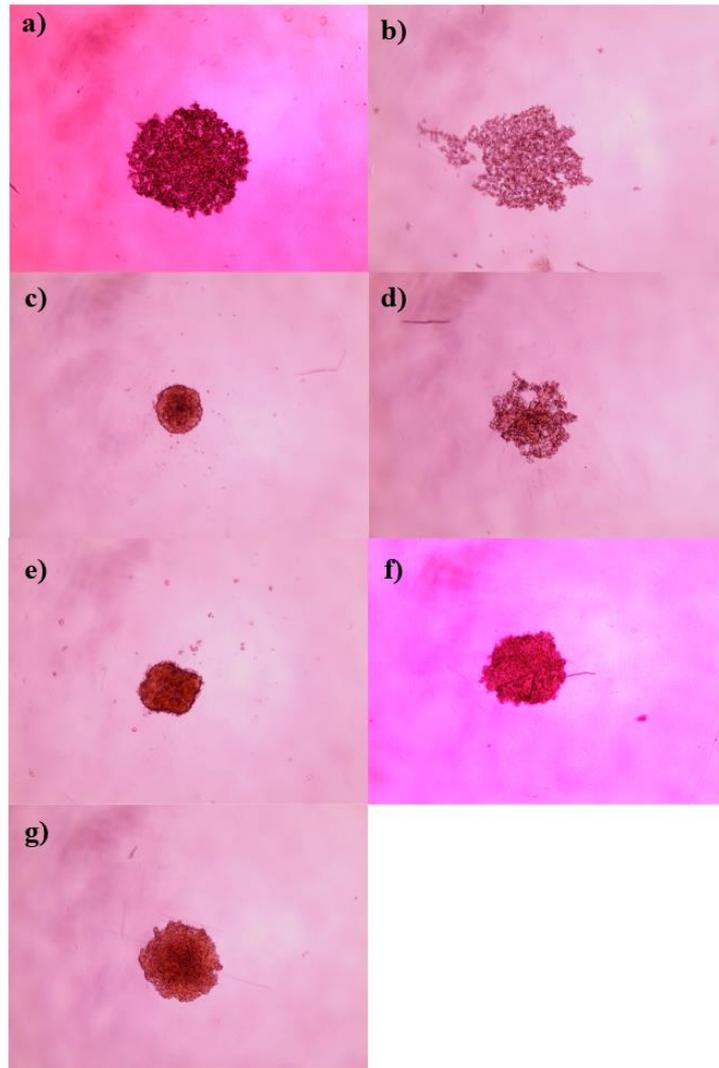
**Figura 12.** Porcentagem da expressão de PD-L1 nas linhagens de CPCNP através da marcação por imuno-histoquímica, sendo H292 0%, COR-L105 13%, SKMES 50%, HCC827 96%, H1975 58%, H358 35% e A549 0%.

### 5.3 Formação de esferoides

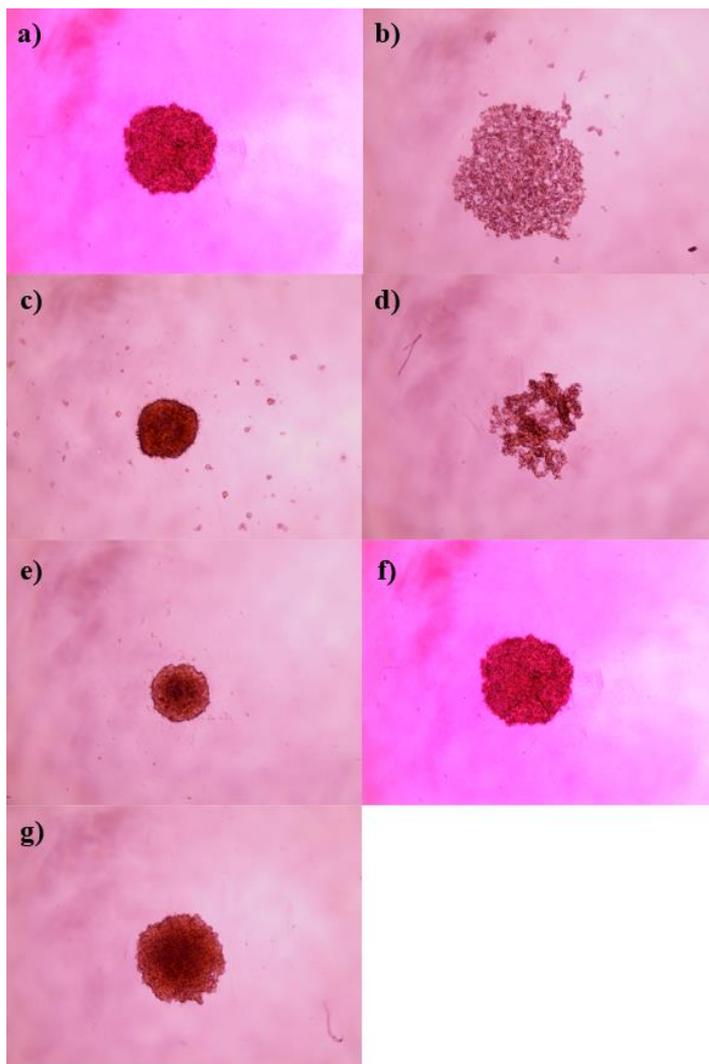
Foram realizados testes com três metodologias, placas micromoldadas, placas revestidas com agarose e placas de baixa fixação. O modelo utilizando micromoldes demonstrou capacidade de formar esferoides (**Figura Suplementar 1, 2 e 3**), entretanto, os esferoides se desintegravam facilmente (**Figura Suplementar 4 e 5**). Enquanto, o modelo com placas revestidas com agarose não conseguiu formar esferoides com as linhagens de CPCNP (**Figura Suplementar 6**). O estudo seguiu, portanto, utilizando placas de baixa fixação.

As sete linhagens foram analisadas quanto a capacidade de formação de esferoides usando microplacas de baixa fixação de 96 poços Nunclon™ Sphera™ de fundo ultrabaixo (Thermo Scientific™), para isso as linhagens foram plaqueadas em concentração de 18.000 e 12.000 células.

As linhagens H1975 e COR-L105 não formaram esferoides em nenhuma das duas concentrações testadas, enquanto as demais linhagens, formaram esferoides (**Figuras 13 e 14**). Sendo assim, foi dada continuidade aos experimentos com as linhagens H292, A549, H358, HCC 827 e SKMES1.



**Figura 13.** Foram testadas as seguintes linhagens de CPCNP na concentração de 12.000 células por poço, em microplacas de baixa fixação de 96 poços. **a)** A549; **b)** COR-L105; **c)** H358; **d)** H1975; **e)** HCC827; **f)** SKMES1; **g)** H292.

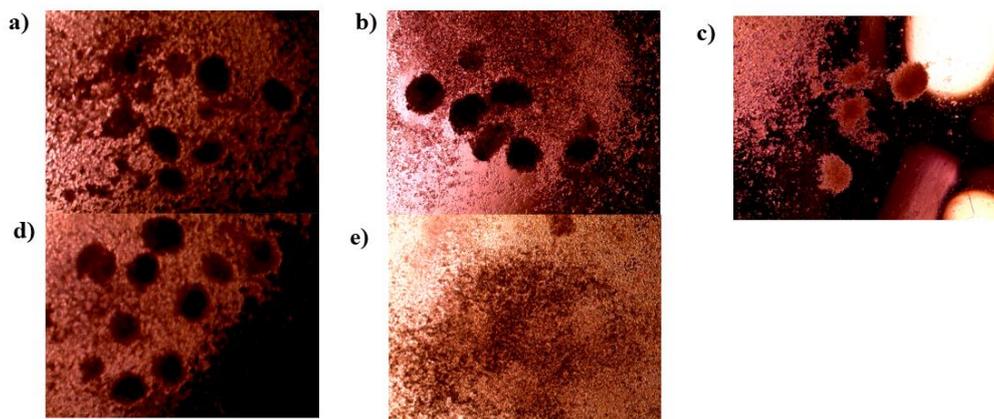


**Figura 14.** Foram testadas as seguintes linhagens de CPCNP na concentração de 18.000 células por poço, em microplacas de baixa fixação de 96 poços. **a)** A549; **b)** COR-L105; **c)** H358; **d)** H1975; **e)** HCC827; **f)** SKMES1; **g)** H292.

#### 5.4 Estabelecimento do modelo de co-cultura esferoides e linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados

Foram realizados testes para determinar a quantidade de linfócitos necessários para estabelecer o modelo de co-cultura 3D. Inicialmente,  $5 \times 10^6$  de células tumorais foram semeadas em cada poço da placa de 12 poços com agarose micromoldada, escolhemos esse modelo para iniciar os testes de concentração de linfócitos devido ao fato de ser um modelo de baixo custo. Após 72 horas de cultura, 10 esferoides da linhagem A549 foram capturados e transferidos para uma placa de 24 poços revestida com uma camada de agarose, a fim de preservar sua estrutura tridimensional. Em seguida, diferentes quantidades de linfócitos T CD8<sup>+</sup> previamente isolados e ativados foram adicionadas ao modelo de co-cultura.

Após 24 horas do estabelecimento dos modelos de co-cultura, observou-se a destruição completa de todos os esferoides pelos linfócitos quando foram utilizados 100.000, 250.000, 500.000 e 750.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados para cada 10 esferoides (**Figura 15**), demonstrando a necessidade de uma quantidade menor de linfócitos para o estabelecimento do modelo.

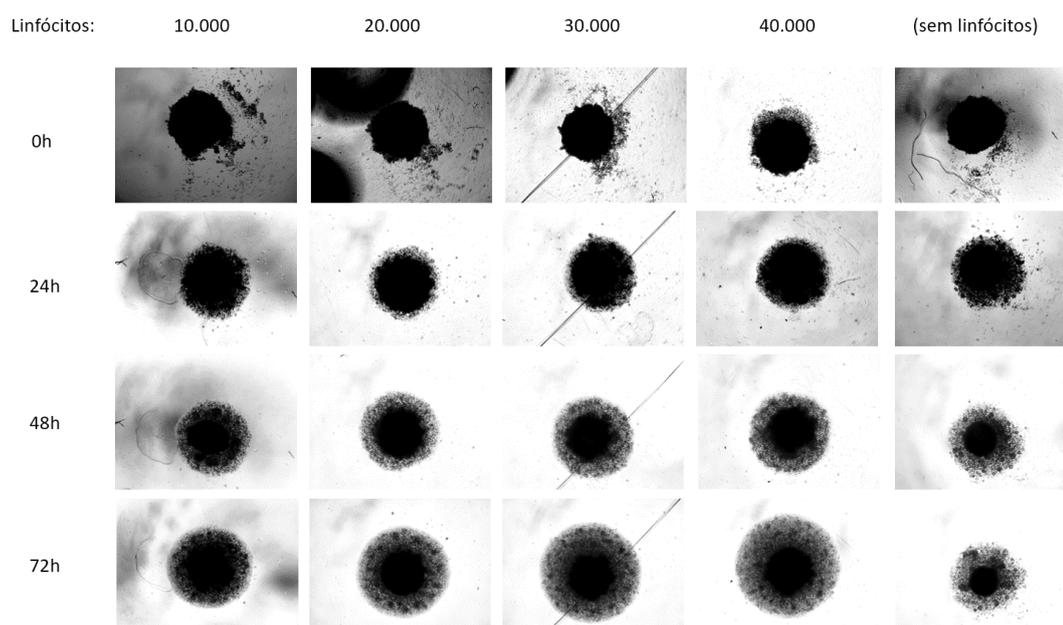


**Figura 15.** Modelos de co-cultura com esferoides estabelecidos com a linhagem A549 e linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados. Em cada poço da placa de 24 poços coberto por agarose foram adicionados 10 esferoides com concentrações distintas de linfócitos: **a)** 100.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>; **b)** 250.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>; **c)** 500.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>; **d)** 750.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>; **e)** Após 24 horas todos os esferoides foram destruídos pelos linfócitos.

Os testes seguintes para a padronização do modelo de co-cultura 3D foram realizados utilizando a linhagem H292 devido à sua facilidade de cultivo, a suas características favoráveis e por ser a única linhagem a formar esferoide que não apresentou alterações genéticas. A linhagem H292 demonstrou um crescimento rápido em cultura, formando esferoides robustos. Essa capacidade de crescimento acelerado permitiu o avanço nos experimentos, eliminando a necessidade de esperar longos períodos para a proliferação celular. Além disso, a linhagem H292 mostrou-se altamente viável para a formação de modelos de co-cultura, o que contribuiu significativamente para a eficiência e sucesso dos experimentos.

Desta forma, realizamos testes com concentrações mais baixas de linfócitos, em comparação com o teste anterior, para isso foram formados esferoides da linhagem H292 utilizando a placa de baixa fixação, e após 72 horas seguimos com o modelo de co-cultura

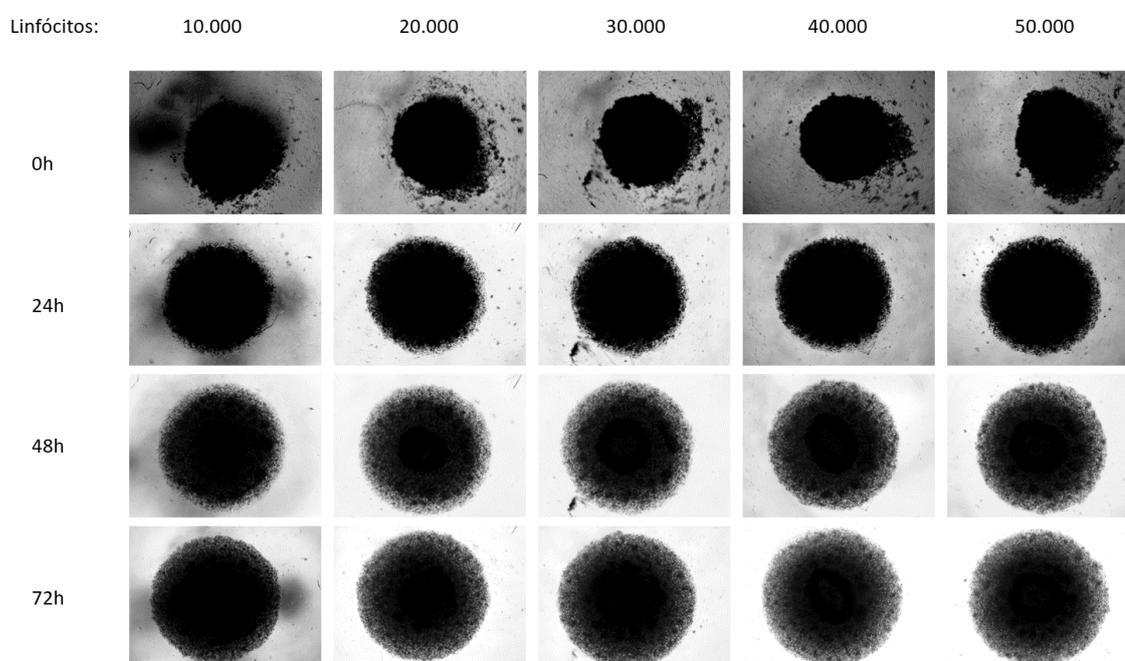
adicionando linfócitos T CD8<sup>+</sup> previamente ativados. Esferoides com 100.000 células foram formados e os modelos de co-cultura foram estabelecidos com diferentes concentrações de linfócitos: 10.000, 20.000, 30.000 e 40.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup> (**Figura 16**). Nos modelos com 10.000 e 20.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup> formaram-se pequenos halos linfocitários. Nos modelos com 40.000 e 50.000 linfócitos, foi possível observar o início da destruição dos esferoides pelos linfócitos a partir de 48 horas. Sendo assim, o modelo com 30.000 linfócitos demonstrou resultado mais satisfatório.



**Figura 16** Esferoides com 100.000 células foram formados em placa de baixa fixação e os modelos de co-cultura foram estabelecidos com diferentes concentrações de linfócitos:10.000, 20.000, 30.000 e 40.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a última coluna representa o controle, sem linfócitos. h; horas.

Além disso, com o intuito de formar esferoides maiores para a realização da análise histológica do modelo 3D, foram realizados esferoides com 200.000 células, nos quais os modelos de co-cultura foram realizados adicionando-se 10.000, 20.000, 30.000 e 40.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Os resultados foram parecidos com a co-cultura com 100.000 células tumorais, nos modelos com 10.000 e 20.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup> observamos a formação de pequenos halos linfocitários (**Figura 17**). Nos modelos com 40.000 e 50.000 linfócitos, notamos

o início da destruição dos esferoides pelos linfócitos após 48 horas. Portanto, assim como no primeiro teste, os resultados mais satisfatórios foram obtidos no modelo com 30.000 linfócitos.



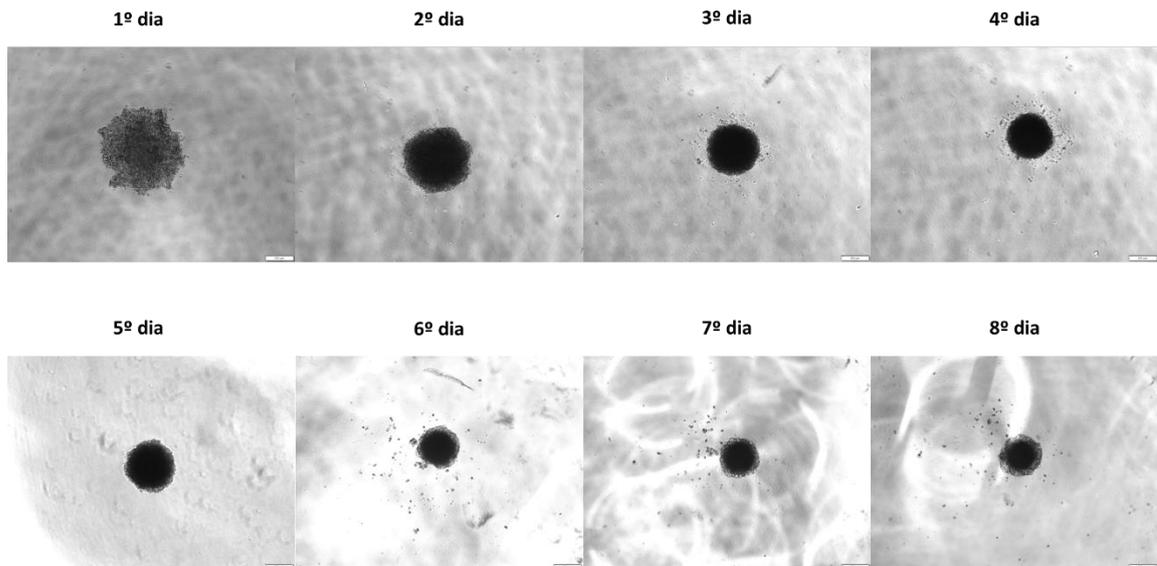
**Figura 17.** Esferoides com 200.000 células foram formados em placa de baixa fixação e os modelos de co-cultura foram estabelecidos com diferentes concentrações de linfócitos: 10.000, 20.000, 30.000, 40.000 e 50.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

### 5.5 Área e perímetro dos esferoides

Ao proceder a remoção dos esferoides com 100.000 e 200.000 células, observou-se a desintegração do núcleo dessas estruturas, indicando possível fragilidade decorrente da elevada densidade celular na formação dos esferoides. Isso, possivelmente ocorreu, devido às limitações na difusão de oxigênio e nutrientes, que podem resultar em condições propícias à apoptose ou necrose nas células localizadas no núcleo dos esferoides. O que poderia comprometer a representação adequada do ambiente tumoral e afetar os resultados experimentais. Sendo assim, retornamos à utilização de esferoides com 20.000 células, buscando preservar a integridade e a representatividade do modelo tridimensional.

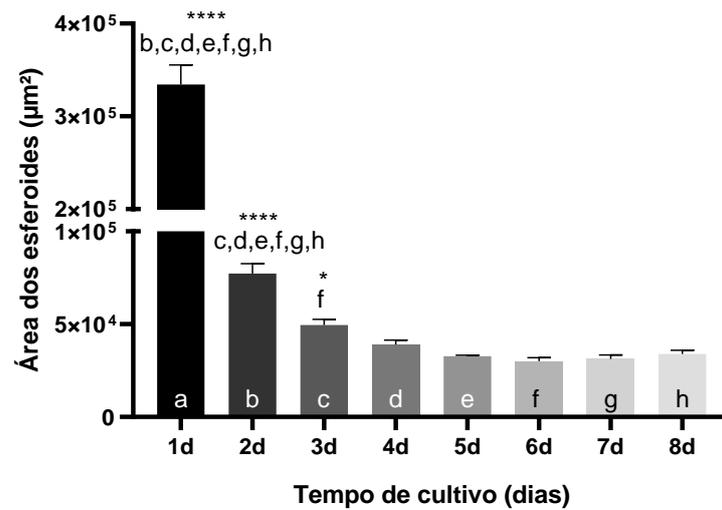
Os esferoides com 20.000 células foram acompanhados e as imagens capturadas utilizando o software IrfanView 64, durante o período de 8 dias (**Figura 18**). Para a medição da

área (**Figura 19**) e do perímetro (**Figura 20**) dos esferoides utilizou-se o software Fiji. A formação inicial de esferoides envolve a agregação celular e a adesão das células umas às outras, resultando na formação de uma estrutura tridimensional, sendo assim, observou-se que, no 1º dia após o plaqueamento, os esferoides exibiam uma área e perímetro superior aos dias subsequentes, atingindo sua compactação máxima em torno do 4º e 5º dia.



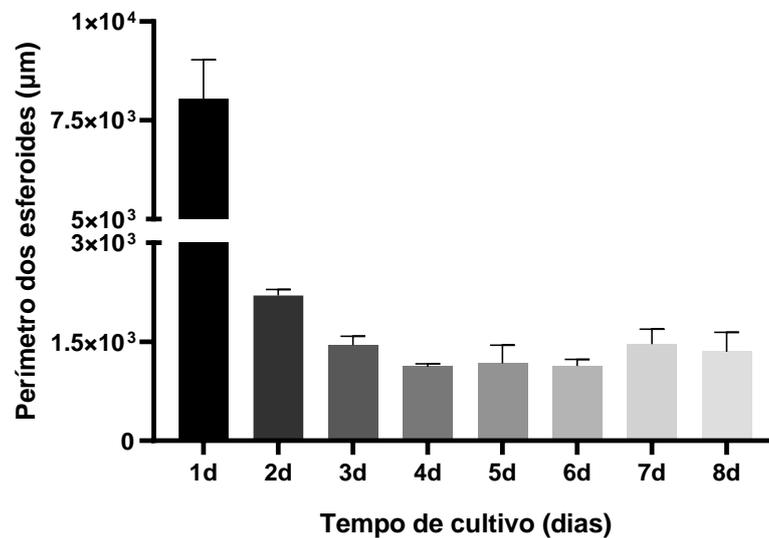
**Figura 18.** Esferoides formados com a linhagem H292 utilizando a placa de baixa fixação e acompanhados por 8 dias.

A avaliação do crescimento celular ao longo de 8 dias revelou padrões distintos de expansão da área dos esferoides. O 1º dia de cultivo apresentou a maior área média entre todos os dias analisados ( $p < 0,0001$ ), seguido pelo 2º dia, que também demonstrou uma área significativamente maior do que nos dias subsequentes ( $p < 0,0001$ ). Além disso, foi observado que o 3º dia de cultivo apresentou uma área maior em comparação com o 6º dia ( $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre os dias 4, 5, 6, 7 e 8 ( $p > 0,05$ ). Consideramos como dia de condensação ideal dos esferoides o ponto de estabilidade da expansão da área, sendo eles os dias 4 e 5, onde ocorreram a fase de platô de crescimento da área do modelo 3D (**Figura 19**).



**Figura 19.** Área dos esferoides monitorados por 8 dias (n=4), (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste). Letras nas barras dos gráficos acompanhadas por \*\*\*\* correspondem a  $p < 0,0001$  em relação ao grupo correspondente, segundo letras na abscissa do gráfico. Letras acompanhadas por \* correspondem a  $p < 0,05$ .

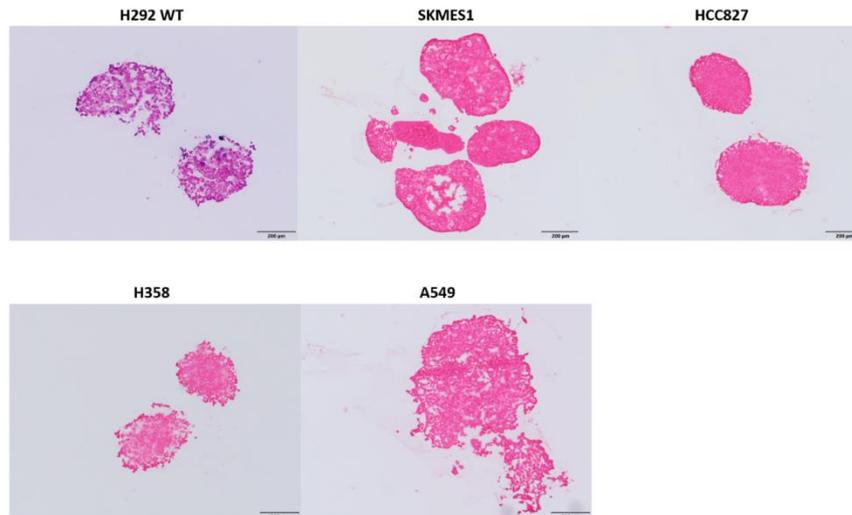
Em relação ao perímetro dos esferoides ao longo de 8 dias observamos que o 1º dia de cultivo apresentou o maior perímetro entre todos os dias analisados ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 20**).



**Figura 20.** Perímetro dos esferoides monitorados por 8 dias (n=4). (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).

### 5.6 Histologia dos modelos 3D

Após a padronização do processo de criocorte das estruturas 3D, obtivemos a imagem das cinco linhagens de CPCNP que formaram esferoides na placa de baixa fixação (**Figura 21**).

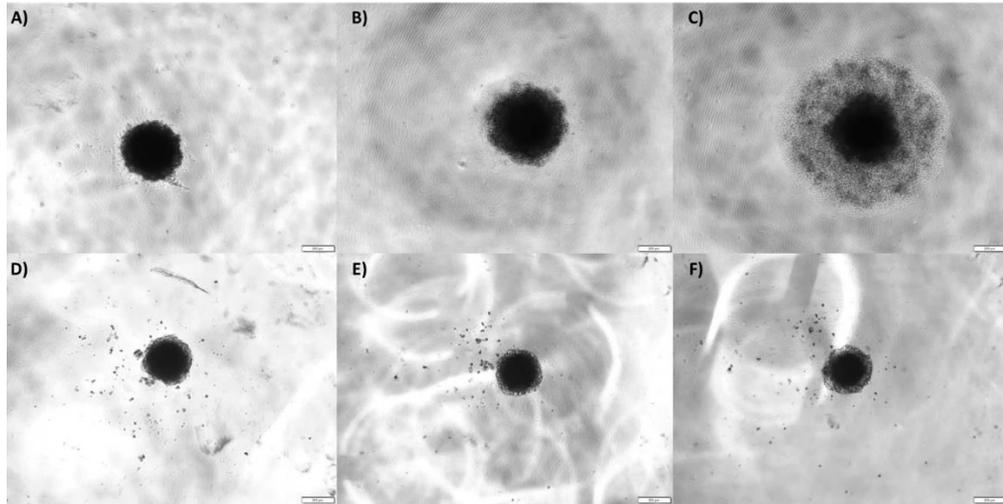


**Figura 21.** Cortes realizados com criostato dos esferoides formados a partir das linhagens de CPCNP e corados em HE.

### 5.7 Área e perímetro dos esferoides após co-cultura

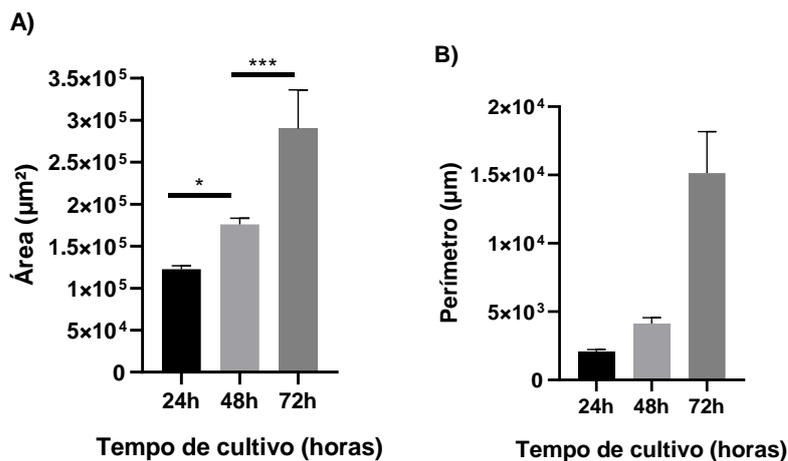
Após padronizar a concentração para a formação dos esferoides em 20.000 células tumorais, conduzimos testes para determinar a concentração ideal de linfócitos na co-cultura. Com base nos resultados obtidos na co-cultura anterior com 100.000 células tumorais e 30.000 linfócitos (**Figura 16**), realizamos um cálculo de proporção para as 20.000 células tumorais iniciais, o que resultou em uma estimativa de aproximadamente 6.000 linfócitos.

Consideramos que os esferoides estavam completamente formados a partir do 5º dia, como resultado observado nas **Figuras 18 e 19**. Desta forma, os esferoides H292 foram cultivados por cinco dias e posteriormente submetidos à co-cultura com 6.000 linfócitos TCD8<sup>+</sup> em 200 µL de meio T Cell Media. O monitoramento do modelo de co-cultura se estendeu por três dias, e as imagens capturadas utilizando o software IrfanView 64 (**Figura 22 A-C**). Notavelmente, a partir do segundo dia de co-cultura, observou-se o surgimento de um discreto halo linfocitário, o qual se tornou mais evidente a partir do terceiro dia. Como esperado, não houve a formação do halo no esferoide controle, sem linfócitos (**Figura 22 D-E**).



**Figura 22.** Co-cultura 3D entre esferoides H292 cultivados por 5 dias e 6.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup> monitorados durante o período de três dias após o co-cultivo. **A)** primeiro dia após a co-cultura, **B)** segundo dia de co-cultura e **C)** terceiro dia. As imagens (D-F) são os controles em que esferoides H292 foram cultivados isoladamente durante o **D)** 6º dia **E)** 7º dia e **F)** 8º dia.

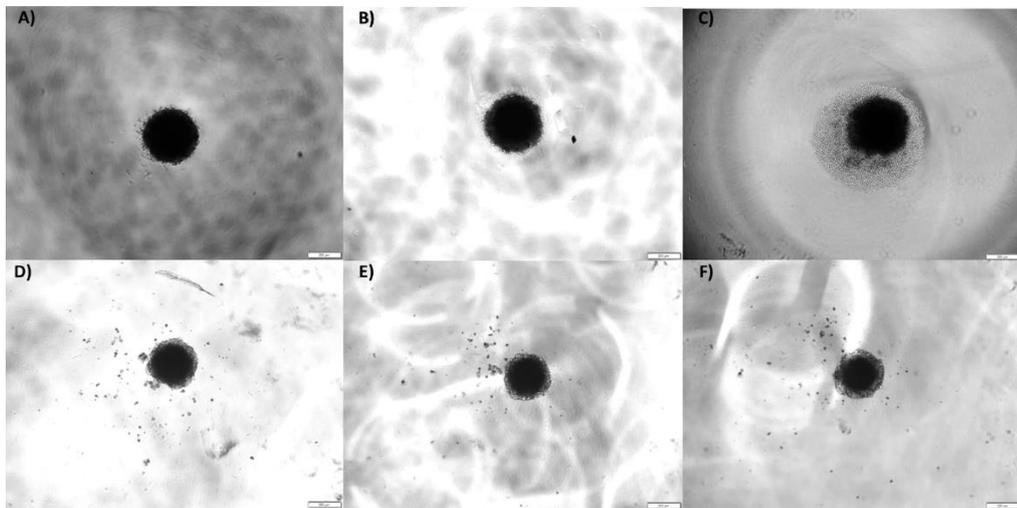
Para a medição da área (**Figura 23 A**) e do perímetro (**Figura 23 B**) utilizou-se o software Fiji. A análise da área da co-cultura revelou diferenças ao longo do tempo. Sendo a área no 2º dia de co-cultura maior que a do 1º dia ( $p < 0,05$ ), enquanto a do 3º dia maior que a do 2º dia ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 23.** **A)** Área dos esferoides no modelo de co-cultura 3D com 6.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>. **B)** Perímetro dos esferoides no modelo de co-cultura 3D acompanhado por três dias. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste), barras no gráfico

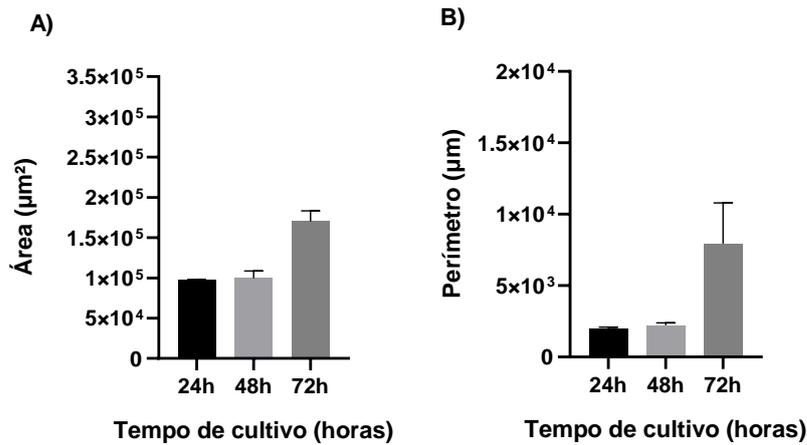
acompanhada por \* representa  $p < 0,05$  e \*\*\* representa  $p < 0,0005$ , (n=4).

Com o objetivo de otimizar e padronizar o modelo de co-cultura 3D, de forma mais fidedigna ao que ocorre em *in vivo*, foram realizados testes com a concentração de 4.000 linfócitos (**Figura 24**). Da mesma forma que o modelo de co-cultura com 6.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>, podemos observar a formação do halo linfocitário no 3º dia de co-cultura.



**Figura 24.** Co-cultura 3D entre esferoides H292 cultivados por 5 dias e 4.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup> monitorados durante o período de três dias após o co-cultivo. **A)** primeiro dia após a co-cultura, **B)** segundo dia de co-cultura e **C)** terceiro dia. As imagens (D-F) são os controles em que esferoides H292 foram cultivados isoladamente durante o **D)** 6º dia **E)** 7º dia e **F)** 8º dia.

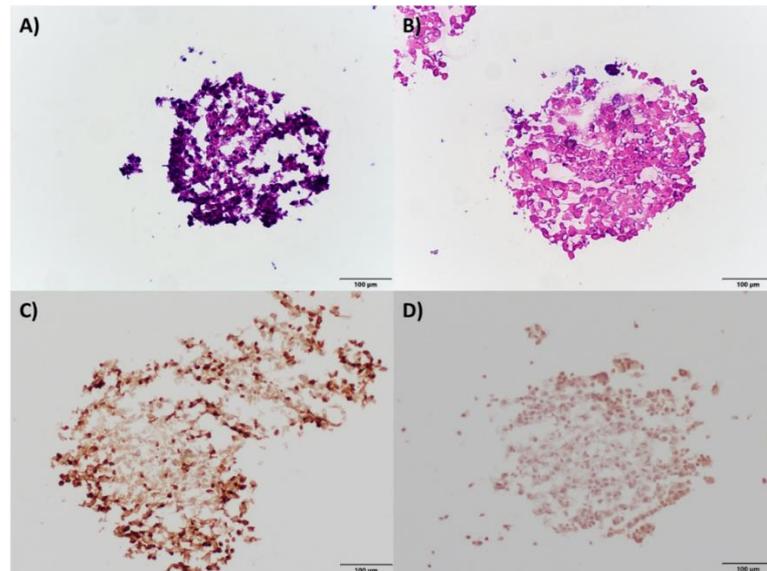
Em relação a análise da medição da área do modelo de co-cultura com 4000 linfócitos, não houve diferença em relação ao 1º e 2º dia, contudo, o 3º dia apresentou maior área em relação aos demais dias (**Figura 25**).



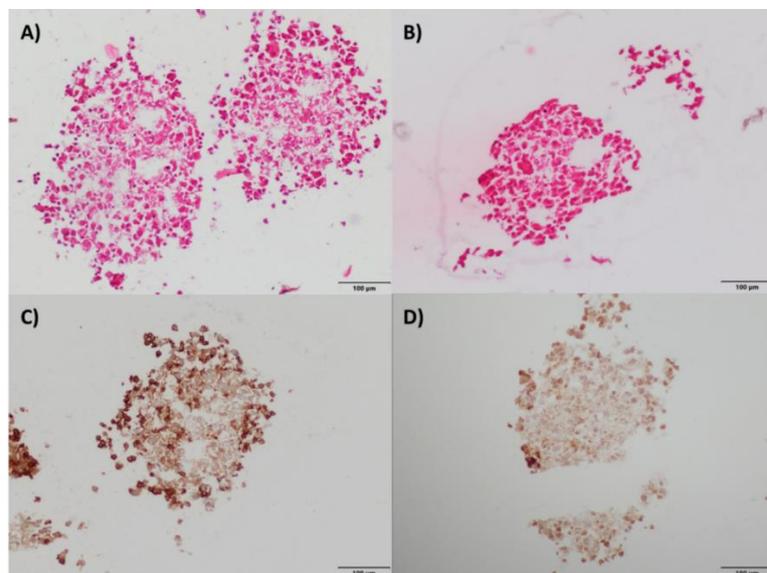
**Figura 25. A)** Área dos esferoides no modelo de co-cultura 3D com 4000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>. **B)** Perímetro dos esferoides no modelo de co-cultura 3D acompanhado por três dias. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).

### 5.8 Infiltração de linfócitos nos modelos de co-cultura

Com o intuito de verificar a efetiva infiltração de linfócitos nos esferoides tumorais, realizamos criocortes a partir dos modelos de co-cultura em duas condições distintas, ilustradas na **Figura 26** (co-cultura com 6.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>) e **Figura 27** (co-cultura com 4.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>). As lâminas foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (HE), e à análise de expressão de CD3 e CD8 por meio da técnica de imuno-histoquímica. Os resultados obtidos demonstram infiltração de linfócitos em ambos os modelos de co-cultura. Embora as duas concentrações de linfócitos tenham demonstrado a presença de infiltrado tumoral, escolhemos prosseguir o modelo de co-cultura com 4.000 linfócitos, com proporção de células tumorais para linfócitos de 5:1, uma vez que essa concentração pode refletir com maior precisão a densidade e a dinâmica de células imunes no microambiente tumoral *in vivo*.



**Figura 26.** Co-cultura 3D realizada com esferoide da linhagem H292 com 20.000 células e 6.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>. **A)** Coloração HE da co-cultura (esferoide + linfócitos) **B)** Coloração HE do esferoide, somente (controle) **C)** Análise da expressão de CD3 por imuno-histoquímica no modelo de co-cultura **D)** Análise da expressão de CD8 por imuno-histoquímica no modelo de co-cultura.



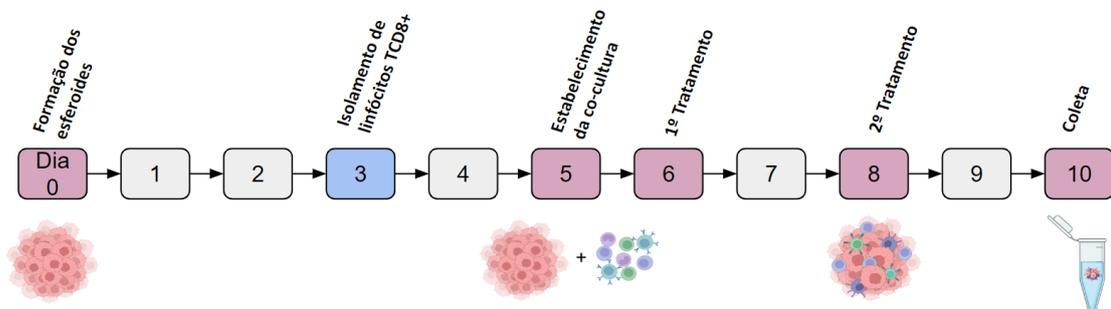
**Figura 27.** Co-cultura 3D realizada com esferoide da linhagem H292 com 20.000 células e 4.000 linfócitos T CD8<sup>+</sup>. **A)** Coloração HE da co-cultura (esferoide + linfócitos) **B)** Coloração HE do esferoide, somente (controle) **C)** Análise da expressão de CD3 por imuno-histoquímica no modelo de co-cultura **D)** Análise da expressão de CD8 por imuno-histoquímica no modelo de co-cultura.

### 5.9 Tratamento com anti-PD-L1 e anti-PD1

Foram realizados três tratamentos em diferentes períodos após a formação da co-cultura, sendo eles, 24, 48 e 72 horas após a formação da co-cultura. De forma resumida, a princípio nos 3 modelos de tratamento seguiu-se o seguinte, no dia 0 foram plaqueadas 20.000 células da linhagem H292 em placa de baixa fixação, após 48 horas foi realizada a troca do meio de cultura RPMI 10% SFB. No 3º dia foi realizado o isolamento de PBMCs dos filtros de leucodepleção, seguido por isolamento e ativação por 48 horas dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Posteriormente, no 5º dia, removemos o meio de cultura dos esferoides, e adicionamos 4.000 linfócitos em 100 µL de meio T Cell Media em cada poço com os esferoides já totalmente formados.

Três concentrações distintas foram testadas para cada imunoterápico: Nivolumabe (anti-PD1) nas concentrações de 500 pM, 1000 pM e 1500 pM e Durvalumabe (anti-PD-L1) nas concentrações de 50 pM, 100 pM e 150 pM. O experimento foi realizado em triplicata, com grupos de co-cultura 3D tratados (intervalo de 2 dias entre tratamentos) e um grupo controle de co-cultura 3D sem tratamento.

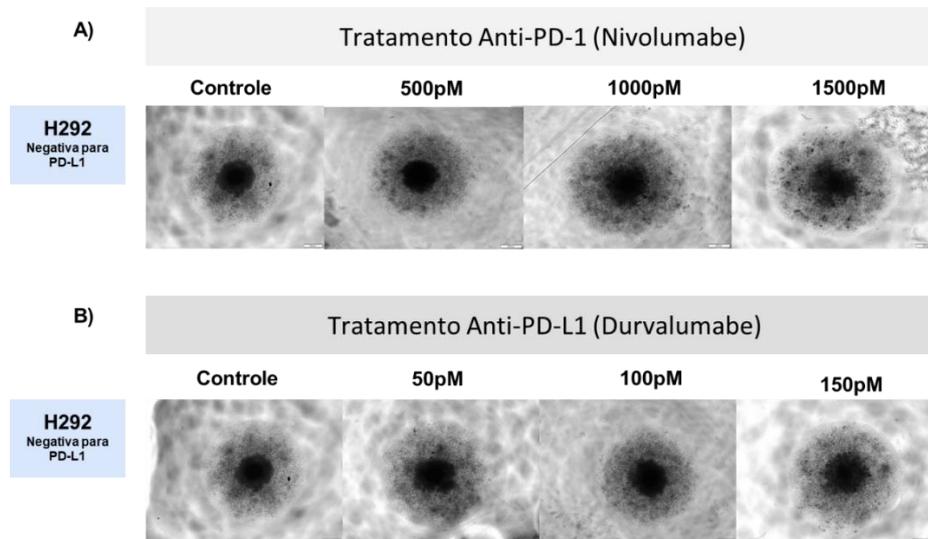
No primeiro modelo, o tratamento se deu após 24 horas da formação da co-cultura e o segundo tratamento após 48 horas, sendo assim, os tratamentos com anti-PD-L1 e anti-PD1 foram realizados nos dias 6 e 8, adicionando em cada dia, 100µL do imunoterápico diluídos em meio T Cell Media. No 10º dia coletamos o meio de cultura e armazenamos em freezer -80°C (Figura 28).



**Figura 28.** Esquema do tratamento realizado 24 horas após o estabelecimento do modelo de co-cultura 3D. A co-cultura foi realizada no 5º dia após a formação do esferoide, o primeiro

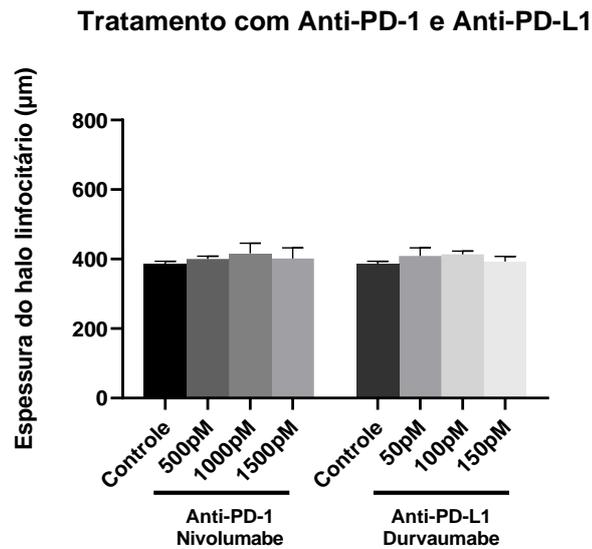
tratamento se deu no 6º dia, seguido pelo segundo tratamento no 8º dia e por fim a coleta do sobrenadante realizado no 10º dia.

Foi realizado o acompanhamento do tratamento do modelo de co-cultura com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens capturadas utilizando o software IrfanView 64 (Figura 29). Para a medição do halo linfocitário (Figura 30) utilizou-se o software Image-Pro Plus 6.0.



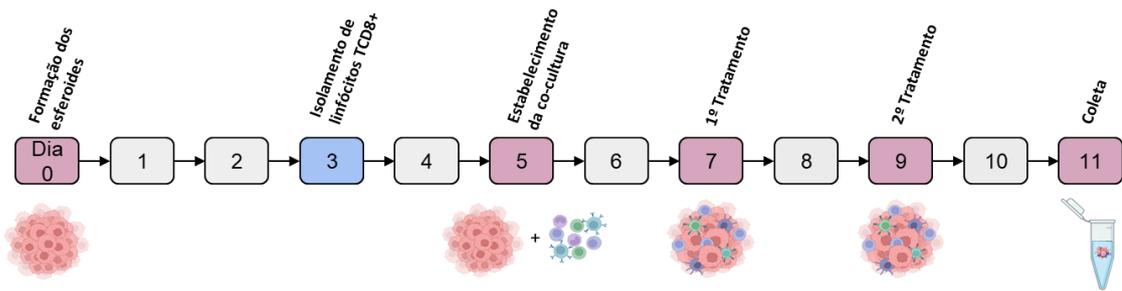
**Figura 29.** Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H292, em que o tratamento se deu 24 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento.

Não houve diferença estatística da espessura do halo linfocitário nos diferentes tratamentos com anti-PD-1 e anti-PD-L1.

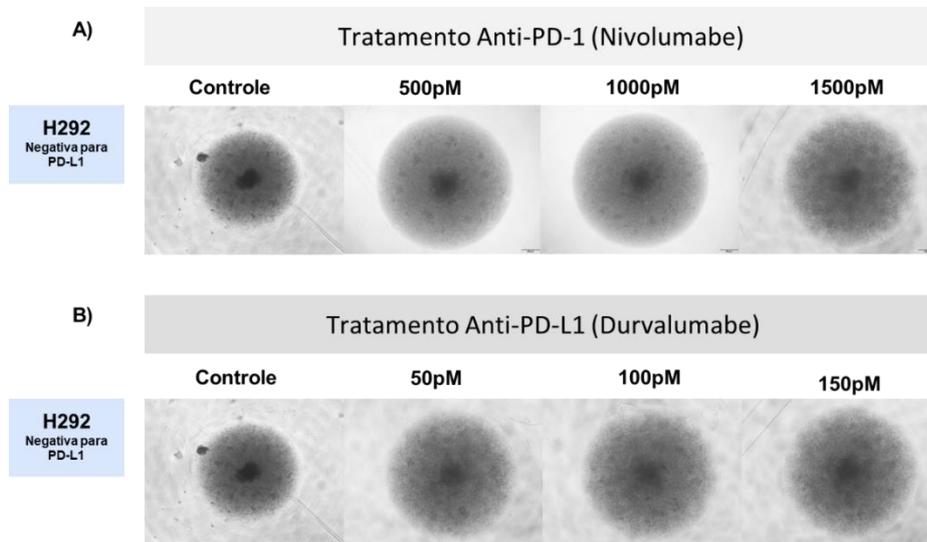


**Figura 30.** Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 24 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).

No segundo modelo, o tratamento se deu após 48 horas da formação da co-cultura e o segundo tratamento após 48 horas, sendo assim, os tratamentos com anti-PD-L1 e anti-PD1 foram realizados nos dias 7 e 9 conforme ilustrado na **Figura 31**, dessa vez adicionamos em cada tratamento 50 µL do imunoterápico diluídos em meio T Cell Media uma vez que, no modelo anterior, 300 µL totais de meio no poço na placa de 96 poços resultou em transbordamento. No 11º dia coletamos o meio de cultura e armazenamos em freezer -80°C. Durante o cultivo do modelo 3D realizamos a aquisição das imagens dos esferoides para monitoramento dos mesmos (**Figura 32 e 33**).

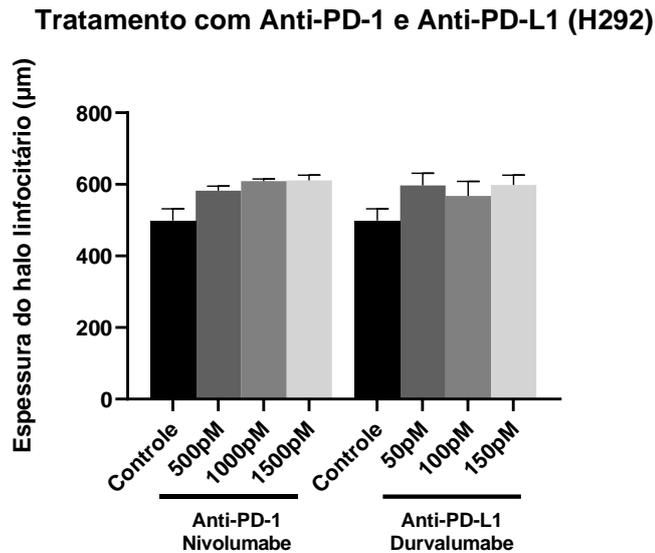


**Figura 31.** Esquema do tratamento realizado 48 horas após o estabelecimento do modelo de co-cultura 3D. A co-cultura foi realizada no 5º dia após a formação do esferoide, o primeiro tratamento se deu no 7º dia, seguido pelo segundo tratamento no 9º dia e por fim a coleta do sobrenadante realizado no 11º dia.

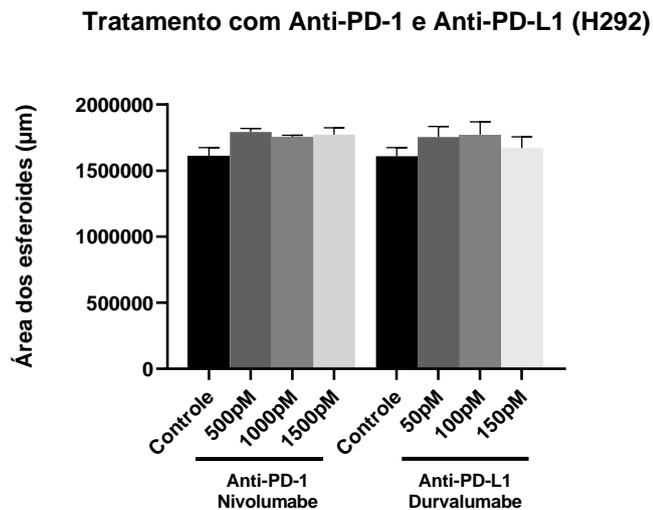


**Figura 32.** Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H292, em que o tratamento se deu 48 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento.

Os esferoides da linhagem H292 tratados com Nivolumabe apresentaram maior halo linfocitário comparado ao controle, contudo não houve diferença entre os grupos em relação a área. Os esferoides tratados com Durvalumabe com 50 pM e 150 pM apresentaram maior espessura do halo linfocitário do que o controle. Não observamos diferença entre os grupos tratados com Nivolumabe e Durvalumabe.



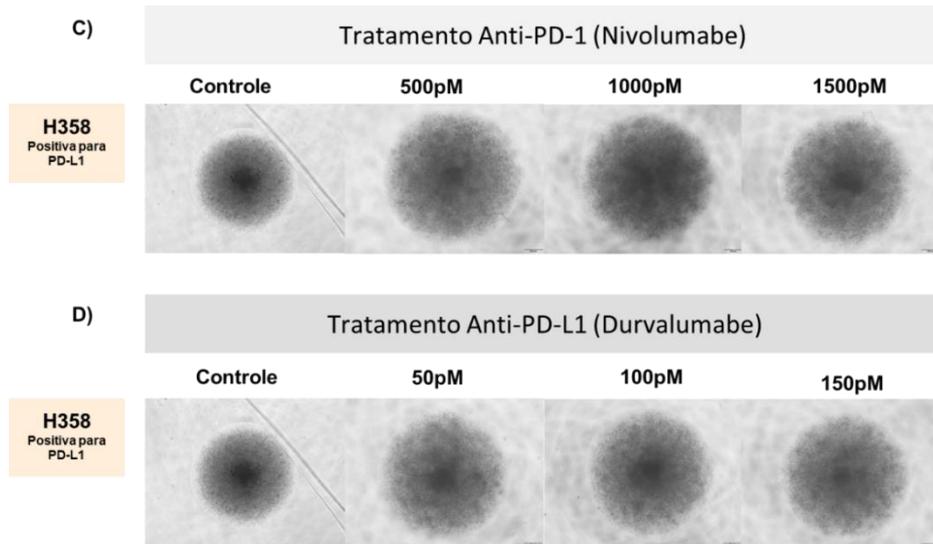
**Figura 33.** Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 48 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).



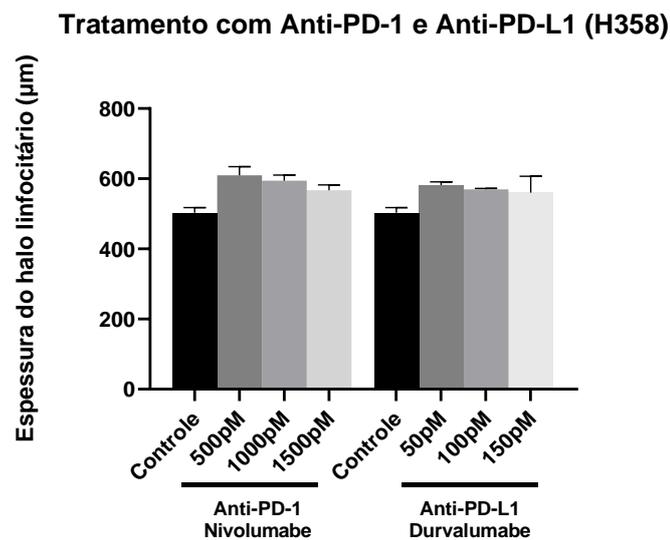
**Figura 34.** Área do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 48 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).

Os esferoides da linhagem H358 tratados com Nivolumabe apresentaram maior halo linfocitário e área comparado ao controle. Os esferoides tratados com 50 pM e 100 pM de

Durvalumabe apresentaram maior espessura do halo linfocitário do que o controle, e os esferoides tratados com Durvalumabe apresentaram maior área em comparação ao controle. Contudo, não observamos diferenças entre os grupos tratados com Nivolumabe e Durvalumabe.

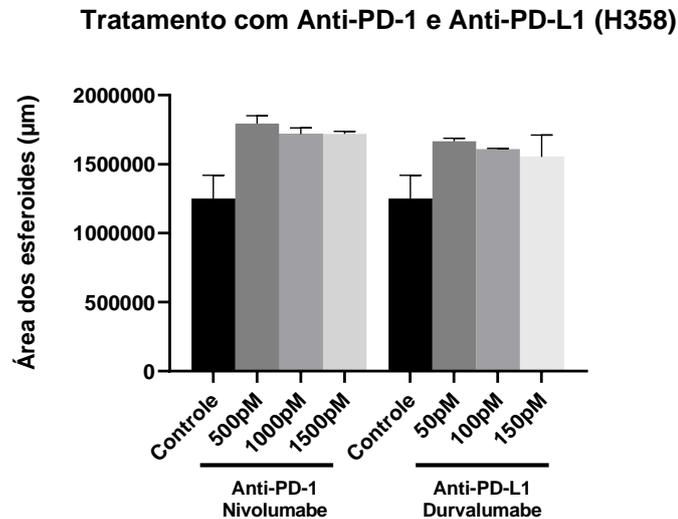


**Figura 35.** Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H358, em que o tratamento se deu 48 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento.



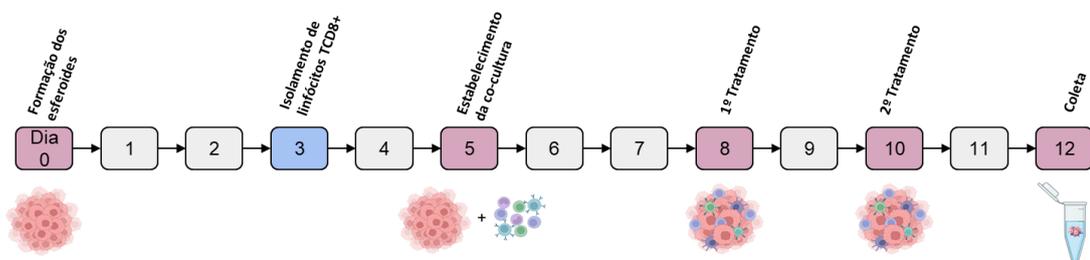
**Figura 36.** Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H358, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 48 horas após o co-cultivo. (Shapiro-

Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).



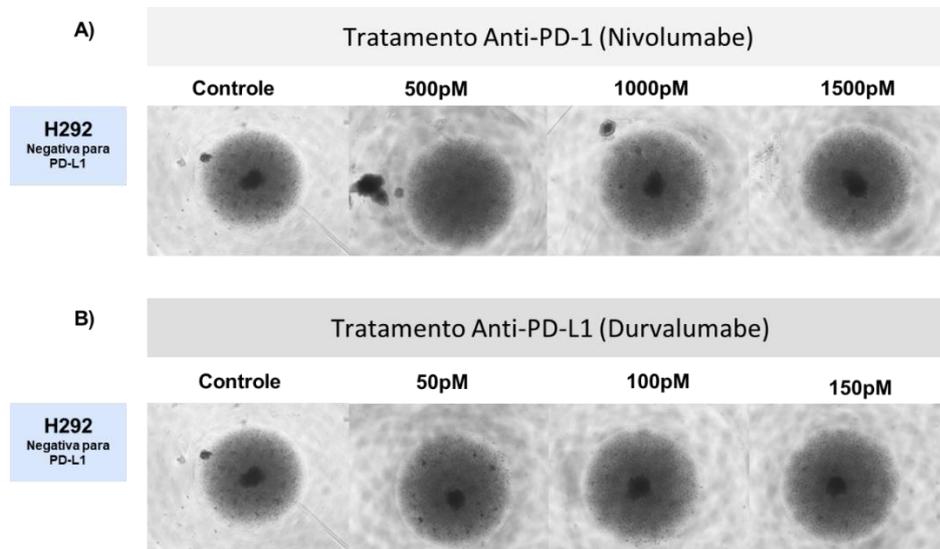
**Figura 37.** Área do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H358, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 48 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).

No terceiro modelo, o tratamento se deu após 72 horas da formação da co-cultura e o segundo tratamento após 48 horas, sendo assim, os tratamentos com anti-PD-L1 e anti-PD1 foram realizados nos dias 8 e 10, sendo adicionado 50 µL do imunoterápico diluídos em meio T Cell Media. No 12º dia coletamos o meio de cultura e armazenamos em freezer-80°C (**Figura 38**).



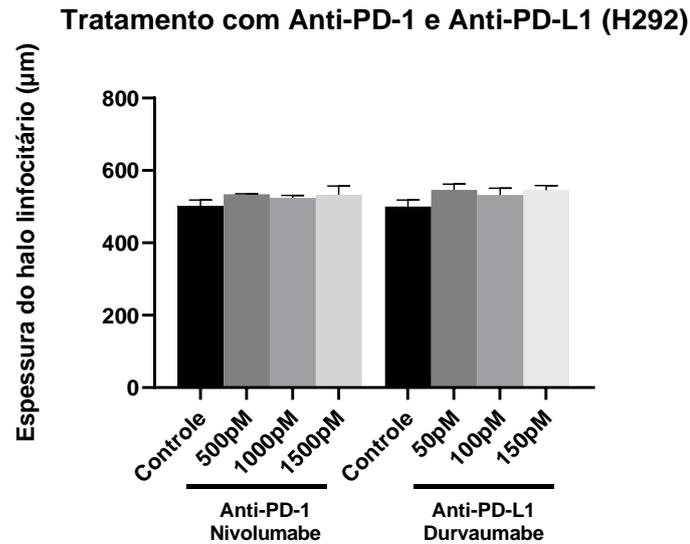
**Figura 38.** Esquema do tratamento realizado 72 horas após o estabelecimento do modelo de co-cultura 3D. A co-cultura foi realizada no 5º dia após a formação do esferoide, o primeiro

tratamento se deu no 8º dia, seguido pelo segundo tratamento no 10º dia e por fim a coleta do sobrenadante no 12º dia.

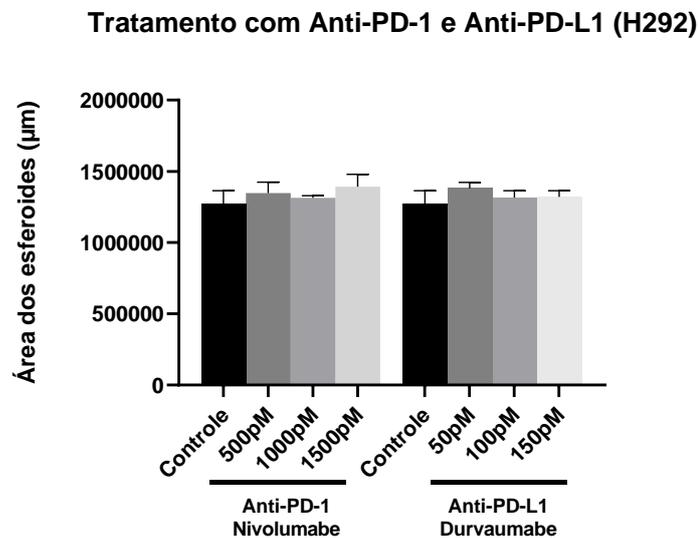


**Figura 39.** Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H292, em que o tratamento se deu 72 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento.

Os tratamentos testados, após 72 horas do co-cultivo com a linhagem H292, não apresentaram diferença significativa em comparação com o grupo controle, também não foi observado diferença entre os grupos de tratamento.

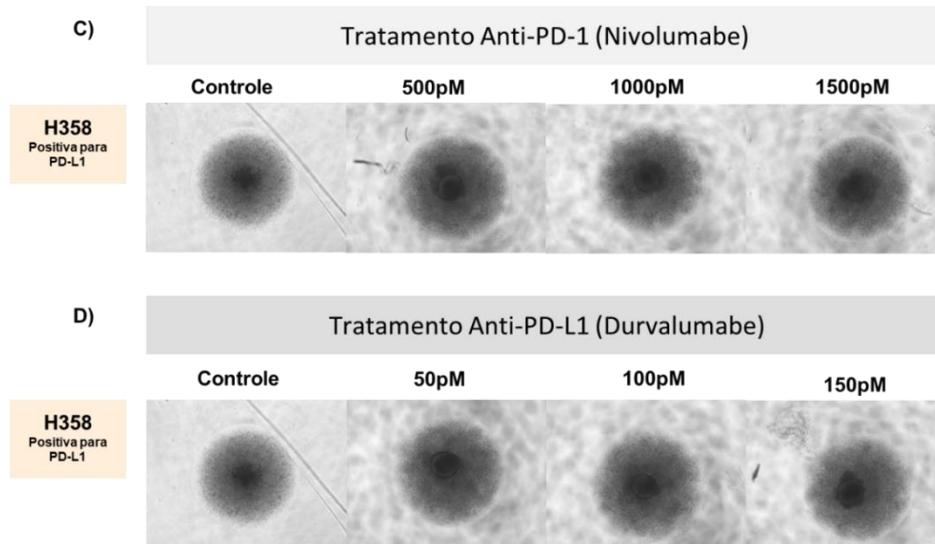


**Figura 40.** Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 72 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).

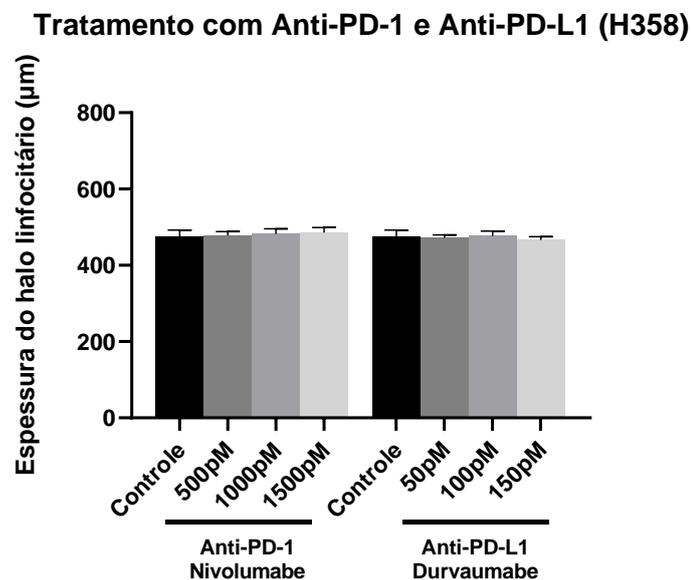


**Figura 41.** Área do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 72 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).

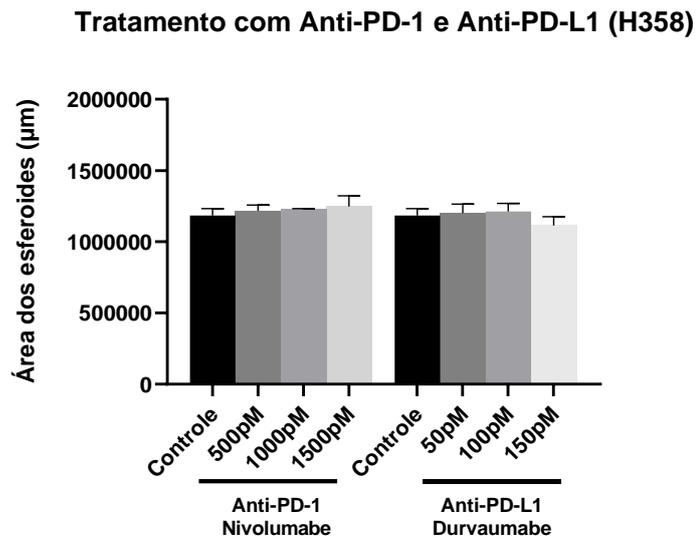
Em relação ao tratamento com a linhagem H358, realizado 72 horas após o co-cultivo. Não observamos diferença entre os tratamentos, nem entre os tratamentos e o controle.



**Figura 42.** Imagens obtidas do modelo 3D estabelecido com a linhagem H358, em que o tratamento se deu 72 horas após o estabelecimento da co-cultura. Os esferoides foram tratados com Nivolumabe e Durvalumabe, e as imagens correspondem ao fim do tratamento.

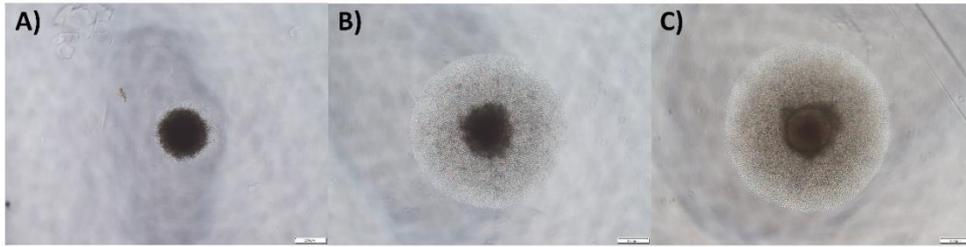


**Figura 43.** Espessura do halo linfocitário, do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H358, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 72 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).



**Figura 44.** Área do modelo de co-cultura 3D com a linhagem H292, após o fim do tratamento com Nivolumabe e Durvalumabe. O primeiro tratamento se deu 72 horas após o co-cultivo. (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ , ANOVA ONE-way  $p < 0,05$  e Turkey pós-teste).

Estabelecemos o segundo dia após a co-cultura como o momento ideal para iniciar o tratamento no modelo 3D. Essa escolha foi reforçada após a padronização do volume de meio utilizado, para o co-cultivo entre os esferoides e os linfócitos, em 100 µL de meio T Cell Media em cada poço. A partir dessa padronização observou-se que com um menor volume de meio, os linfócitos levaram menos tempo para se aproximarem dos esferoides em comparação aos esferoides plaqueados com 200 µL de meio como observado na **Figura 24**. Agora pudemos observar a formação do halo linfocitário já no 2º dia após a formação da co-cultura (**Figura 45**). Não sendo mais necessário esperar até o 3º dia para observar a presença do halo linfocitário ao redor dos esferoides.



**Figura 45.** Co-cultura 3D entre esferoides H292 que foram cultivados por 5 dias e posteriormente co-cultivados com 4000 linfócitos TCD8<sup>+</sup> em 100µL de meio T Cell Media monitorados durante o período de três dias após o co-cultivo. **A)** primeiro dia após a co-cultura, **B)** segundo dia de co-cultura e **C)** terceiro dia.

## 6. DISCUSSÃO

Modelos de cultura tridimensionais (3D) *in vitro* são capazes de capturar com precisão as características genéticas e histológicas dos tumores. No entanto, a ausência de um microambiente tumoral, incluindo as células T que circundam o tumor, resultam em divergências entre a resposta clínica ao ICI e a responsividade observada em modelos pré-clínicos. Estabelecer um modelo de co-cultura 3D que incorpore células do sistema imunológico, como os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, apresenta desafios consideráveis devido à complexidade de recriar um ambiente que permita interações precisas e viáveis entre as células tumorais e as células imunológicas. Apesar dessas dificuldades, tais modelos são essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos de imunidade tumoral e resistência à terapia, além de fornecerem ferramentas valiosas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas<sup>47</sup>.

Neste projeto, superamos as limitações prévias e desenvolvemos um modelo de co-cultura tridimensional (3D) que mimetiza a interação entre células tumorais de câncer de pulmão de não pequenas células (CPCNP) e linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Para isso, foram analisadas diferentes metodologias visando a padronização do modelo e a sua incorporação no laboratório de cultura celular do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Amor.

Com o objetivo de identificar a metodologia mais eficaz em termos de formação dos esferoides, interação entre as populações celulares, reprodução do modelo, e considerando também o aspecto econômico. Foram testadas três metodologias como estratégias para a

criação do modelo 3D sendo elas, micromoldes de precisão para formar géis de agarose com micropoços<sup>48, 49</sup>, placas revestidas com agarose<sup>9, 50</sup> e placas de baixa fixação<sup>14</sup>.

Em nosso estudo observamos que o modelo utilizando micromoldes demonstrou capacidade de formar esferoides, entretanto, ao transferi-los para outro poço a fim de iniciar a co-cultura, observou-se que os esferoides se desintegravam facilmente. Por outro lado, o modelo com placas revestidas com agarose não conseguiu formar esferoides com as linhagens de CPCNP. Além disso, ambas as metodologias apresentam desafios adicionais, como diferentes etapas de manipulação da agarose e preparo das placas, que podem aumentar o risco de contaminação e diminuir a reprodutibilidade da técnica.

A técnica de formação de esferoides utilizando matriz, como a agarose, tem a vantagem de permitir a recuperação das células após cultura. No entanto, entre as desvantagens estão a necessidade de manuseio do hidrogel utilizado e a produção de esferoides heterogêneos. Em relação as placas micropadronizadas, as vantagens incluem a relativa facilidade para observar os esferoides e a possibilidade de recuperá-los após cultura. As desvantagens incluem a necessidade de revestir os poços para criar uma superfície de baixa adesão, a formação de esferoides de tamanhos variados e a possibilidade de que vários esferoides em um poço sobrecarreguem a química do ensaio, resultando em resultados não fidedignos<sup>51</sup>.

Em nossas análises a estratégia empregando a placa de baixa fixação demonstrou ser eficaz na formação de esferoides, para as linhagens A549, H292, SKMES1, HCC827 e H358 independentemente da quantidade inicial de células tumorais plaqueadas. Contudo as linhagens H1975 e COR-L105 não formaram esferoides em nenhuma das concentrações testadas.

As placas de baixa fixação são vantajosas por permitirem a formação de diversos esferoides (96 poços ou 384 poços), a fácil recuperação dos esferoides, a possibilidade de multiplexar os ensaios bioquímicos e a análise final pode ser feita na mesma placa. Entre as desvantagens estão a geração de esferoides de tamanhos variáveis e a possibilidade de haver uma mistura de células anexadas e esferoides nos poços<sup>51</sup>.

Embora a metodologia utilizando placas de baixa fixação tenha maior custo quando comparado com as outras duas metodologias avaliadas, este foi o método mais eficaz para a

formação de esferoides consistentes e tem como vantagem sua facilidade de semeadura celular, reprodutibilidade, formação de esferoides redondos, facilidade na manutenção da cultura e a possibilidade de realizar ensaios na placa de semeadura sem a necessidade de transferir para outra placa<sup>14, 52</sup>.

Os esferoides formados com esta técnica exibem, ainda, estruturas altamente compactas, uma característica associada a uma adesão célula-célula robusta, fundamental para modelos 3D eficazes. Além disso, o design dos poços promove a formação de um único esferoide centralizado em cada poço, facilitando a aquisição de imagens e análises subsequentes<sup>52</sup>. Portanto, essa metodologia foi selecionada como a mais adequada para a padronização do modelo de co-cultura 3D.

Após selecionar qual metodologia para formação dos esferoides utilizar, e levando em consideração o objetivo de estabelecer um modelo de co-cultura entre linhagens tumorais e linfócitos, que possa ser utilizado para triagem de imunoterapias, prosseguimos para a análise da expressão de PD-L1 das linhagens de CPCNP. A avaliação da expressão de PD-L1, por meio de ensaios imuno-histoquímicos, tem sido amplamente utilizada para orientar a seleção de pacientes para receber o tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou anti-PD-L1, sendo, atualmente, o biomarcador mais validado e aceito<sup>53,54</sup>.

Os mecanismos de supressão imunológica via interação PD-1/PD-L1 em tumores são complexos, e incluem a indução de apoptose, anergia e exaustão de células T, amplificação da função das células T reguladoras, inibição da proliferação de células T, bem como a limitação da ativação de células T e da produção de IL-2. Apesar dos benefícios clínicos significativos observados com a terapia anti-PD-1/PD-L1 em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), a utilização da expressão de PD-L1 como biomarcador preditivo permanece controversa devido à variabilidade dos ensaios e incertezas quanto à sua eficácia clínica<sup>55</sup>.

Isso se deve ao fato de que apesar da associação entre expressão positiva de PD-L1 e melhores desfechos clínicos, incluindo taxas de resposta mais elevadas, tem sido observado o aumento na sobrevida livre de progressão mesmo em pacientes com expressão negativa de PD-L1 submetidos à terapia com ICI<sup>56-59</sup>. Sendo assim, atualmente, não está claro se a expressão

constitutiva de PD-L1 resultante desses processos de sinalização oncogênica resulta em diminuição ou aumento da probabilidade de resposta à terapia anti-PD-1/L1<sup>60</sup>

Para fornecer uma compreensão mais aprofundada de como tumores com expressão positiva e negativa para PD-L1 respondem ao tratamento com os inibidores do *checkpoint* imunológico, optamos por desenvolver modelos de co-cultura 3D com linhagens de CPCNP com expressão positiva e negativa para PD-L1. Em nossos achados observamos que as linhagens HCC 827, H1975, H358, SKMES1 e COR-L105 apresentaram expressão positiva para PD-L1, enquanto as linhagens A549 e H292 apresentaram expressão negativa.

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, conforme relatado por Kim et al. (2019)<sup>55</sup>, as linhagens H1975 e H358 apresentam expressão de PD-L1, enquanto a linhagem A549 não possui expressão. Sharma et al. (2023)<sup>61</sup> confirmaram a falta de expressão de PD-L1 na linhagem H292. Yu et al. (2020)<sup>62</sup> destacaram a alta expressão de PD-L1 na linhagem HCC827, e Chen et al. (2021)<sup>63</sup> relataram a expressão na linhagem SKMES1.

Além disso, foi analisado a presença de mutações nos genes *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *EGFR*, *ERBB2*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *TP53*, *RET* e *MET* nas setes linhagens testadas para a formação de esferoides. Esses genes estão relacionados com o desenvolvimento e progressão do câncer<sup>64,65</sup>.

Das sete linhagens testadas, cinco apresentaram alteração em um ou mais genes avaliados, esses resultados oferecem uma oportunidade para, futuramente, explorar o impacto dessas mutações no microambiente tumoral por meio do modelo de co-cultura 3D entre linhagens de câncer de pulmão e linfócitos, além de aprofundar a compreensão da interação entre as mutações genéticas e a resposta imunológica.

Em pacientes sem alterações genéticas alvo e sem contraindicações aos inibidores PD-1/PD-L1, a imunoterapia, seja como monoterapia ou em combinação, tornou-se o tratamento padrão na linha de frente para câncer de pulmão escamoso e não escamoso avançado<sup>66</sup>.

Para avaliar o efeito dos inibidores do *checkpoint* imunológico em linhagens celulares com diferentes níveis de expressão de PD-L1, conduzimos experimentos utilizando duas linhagens em que a formação do esferoide foi altamente reprodutível e nenhuma teve sua morfologia comprometida, sendo elas: H292, que apresenta expressão negativa de PD-L1 e é WT para os

genes analisados; e H358, que exibe alta expressão de PD-L1 e possui a mutação p.G12C no gene *KRAS*. Devido à ausência de uma linhagem WT com alta expressão de PD-L1 capaz de formar esferoides, optamos por continuar nossos experimentos com a linhagem H358.

Essa decisão também foi fundamentada em estudos que revelaram que pacientes com CPCNP portadores de mutações no gene *KRAS* obtiveram um resultado superior com o uso dos ICIs em comparação com pacientes portadores de mutação no gene *EGFR*<sup>67</sup>. Outro estudo revelou benefício significativo na sobrevida dos pacientes portadores da mutação no gene *KRAS* tratados com ICIs em relação àqueles tratados com quimioterapia ou ao controle local isolado em pacientes com CPCNP com metástases cerebrais<sup>68</sup>.

Enquanto um estudo retrospectivo que analisou o tratamento com ICIs em pacientes G12C e não-G12C mostrou que a taxa de resposta objetiva, a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global foram melhores em pacientes com mutações *KRAS* G12C. O estudo traz ainda que embora os inibidores AMG 510 e MRTX849 direcionados à mutação *KRAS* G12C mostraram-se promissores nos primeiros ensaios clínicos, o uso de inibidores *KRAS* G12C no tratamento do CPCNP é limitado no mundo real<sup>69</sup>.

Dessa forma, estabelecemos esferoides com ambas as linhagens na concentração de semeadura de  $2 \times 10^4$  células em 100  $\mu$ L de meio RPMI completo. Em outro estudo, também utilizando a placa de baixa fixação, foram semeadas entre 0,5 e  $1,25 \times 10^4$  células de linhagem de tumor de bexiga para gerar esferóides em 200  $\mu$ L de meio de cultura por poço<sup>70</sup>. Decidimos produzir esferoides com um tamanho que facilitasse o manuseio durante a elaboração de cortes em criostato, bem como a realização de análises de histologia e imuno-histoquímica posteriormente, sendo esse o tamanho limite estabelecido.

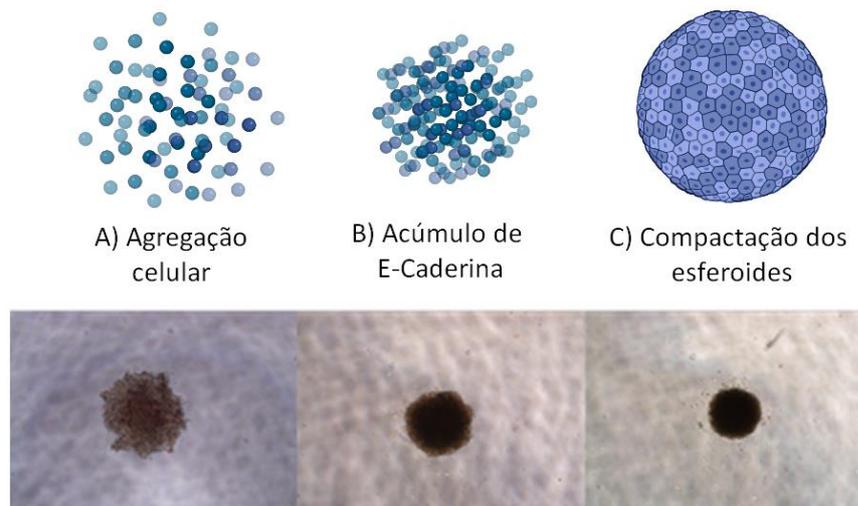
Amaral et al. (2017) que estabeleceu esferoides com linhagem de câncer de bexiga, descreveu que após 48h da formação da estrutura 3D foi observada diminuição no tamanho dos esferoides, que se tornaram mais compactos, formando esferoides sólidos, Zanoni et al. (2016) nomearam o intervalo de tempo para este processo como “tempo de esferoidização” que varia dependendo do tipo de célula e das condições de cultura<sup>70</sup>.

Zanoni et al. (2016) manteve esferoides da linhagem A549, de carcinoma pulmonar de células não pequenas, por uma semana em cultura para observar o processo de

"esferoidização". De acordo com o estudo, os esferoides levaram aproximadamente uma semana para atingirem a completa formação<sup>71</sup>. Já Al-Hity et al. (2021) constatou que os esferoides 66CL4 e 4T1, ambos de linhagem de câncer de mama, levaram 4 dias para formarem completamente<sup>14</sup>.

Em nossos estudos mantivemos os esferoides da linhagem H292 em cultivo por 8 dias e observamos, igualmente aos autores anteriores, uma diminuição da área dos esferoides após 48 horas, acompanhado por sua compactação máxima no 5º dia após o plaqueamento.

As células tumorais formam estruturas tridimensionais devido à interação entre integrinas e a matriz extracelular. Essa interação resulta na agregação celular e posterior compactação mediada pela interações de caderinas (proteínas transmembrana), como mostrado na **Figura 46**<sup>72</sup>. Esse processo explica a necessidade de um período específico para a formação completa dos esferoides.



**Figura 46.** Formação de um esferóide representado com a linhagem H292 cultivada por 3 dias. **(A)** 1º dia, formação de agregados celulares soltos via ligação integrina-MEC; **(B)** 2º dia, um período de atraso para expressão e acumulação de caderina; **(C)** 3º dia, formação de esferóides compactos através de interações entre caderinas<sup>72</sup>. Adaptado de BENIEN, P; SWAMI, A. (2024).

Saraiva et al. (2020) estabeleceram o 6º dia após a formação dos esferoides, utilizando a linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231, como o momento em que a estrutura

estava completamente formada. No 6º dia, portanto, realizaram a co-cultura com PBMCs, em uma proporção de células tumorais para PBMCs de 1:1<sup>73</sup>. Já Al-Hity et al. (2021) estabeleceram o modelo de co-cultura entre linhagem de câncer de mama triplo negativo e esplenócitos contendo linfócitos T ativados na proporção de 1:5<sup>14</sup>.

Lin et al. (2022) estabeleceram um modelo de co-cultura 3D entre linhagem de câncer pancreático e linfócitos T isolados de camundongos em uma proporção de 10:1<sup>74</sup>. Aqui estabelecemos a co-cultura após 5 dias da formação do esferoide, em uma proporção de células tumorais para linfócitos T CD8<sup>+</sup> de 5:1, um modelo de co-cultura que reflete essa proporção pode ser mais representativo do ambiente tumoral in vivo, uma vez que o número de células tumorais é superior ao de linfócitos.

Estabelecemos, portanto, o modelo de co-cultura 3D e comprovamos, através da padronização dos cortes histológicos em criostato, a capacidade dos linfócitos de infiltrar o esferoide tumoral. Por fim, após ajustar o volume de meio de cultura para 100 µL de meio T Cell Media em cada poço, determinamos o segundo dia após a formação da co-cultura como o momento ideal para iniciar os tratamentos com inibidores do *checkpoint* imunológico, uma vez que foi o período em que observamos o início da formação do halo linfocitário.

Embora, em nossas análises, não tenhamos observado diferenças entre os tratamentos com Nivolumabe e Durvalumabe, com o tratamento iniciado no segundo dia após a co-cultura, observamos que ambos os tratamentos induziram o aumento do halo linfocitário em comparação ao grupo controle sem tratamento. Esses achados evidenciam a capacidade do modelo em promover a resposta imunológica frente ao tratamento imunomodulador.

Em ambas as linhagens, H358 e H292, com expressão positiva e negativa para PD-L1, respectivamente, o tratamento com diferentes concentrações de Nivolumabe (anti-PD-1) apresentaram aumento do halo linfocitário em comparação ao grupo controle, sem tratamento. O anticorpo monoclonal anti-PD-1 atua bloqueando a proteína PD-1, presente nas células imunológicas, e é responsável por regular a resposta imune do corpo. Ao bloquear PD-1, o Nivolumabe ajuda o sistema imunológico a reconhecer e atacar células cancerígenas<sup>28, 75, 76</sup>.

Observou-se, ainda, que o tratamento com Durvalumabe (anti-PD-L1) nas concentrações de 50 pM e 150 pM resultou no aumento da espessura do halo linfocitário na linhagem H292, em

comparação com o controle. Na linhagem H358, concentrações de 50 pM e 100 pM de Durvalumabe também resultaram em uma maior espessura do halo linfocitário do que no grupo controle. Notavelmente, as linhagens H358 e H292, com expressão positiva e negativa de PD-L1, respectivamente, apresentaram respostas distintas as concentrações de 100pM e 150pM do tratamento com Durvalumabe. O que evidencia a importância de considerar a heterogeneidade molecular dos tumores ao avaliar a eficácia dos tratamentos imunoterápicos. Esses resultados sugerem que ajustes nas concentrações de Durvalumabe podem ser explorados como uma estratégia para otimizar a resposta com os inibidores do *checkpoint* imunológico frente a diferentes contextos tumorais.

É importante reconhecer que nosso estudo apresenta algumas limitações, incluindo a falta de avaliação de outros parâmetros imunológicos e a natureza *in vitro* dos experimentos. No entanto, nossos resultados fornecem uma base sólida para investigações futuras sobre os mecanismos de resposta aos tratamentos imunoterápicos e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes para o câncer.

Desta forma, demonstramos uma das aplicações dessa padronização, o de avaliar o efeito de agentes terapêuticos imunomoduladores, como imunoterapias, para entender como essas intervenções afetam a resposta imune e a dinâmica do tumor. Este modelo, pode ainda, ser adaptado para outras linhagens celulares de diferentes tipos tumorais, provenientes de culturas estabelecidas ou primárias. Além disso, o modelo aqui desenvolvido é adequado para:

- Investigar as interações iniciais entre linfócitos e células tumorais em um contexto 3D;
- Auxiliar na compreensão de como as células tumorais desenvolvem mecanismos de resistência à resposta imune, permitindo o estudo de vias de escape e estratégias para superar a resistência;
- A avaliação de terapias combinadas, incluindo tratamentos imunomoduladores em conjunto com outros agentes terapêuticos, para otimizar a resposta ao tratamento.

Este modelo foi desenvolvido a partir de um sistema alogênico, uma vez que, a padronização desenvolvida por nosso grupo de pesquisa para a obtenção de linfócitos de doadores saudáveis é mais acessível e prática em comparação com a obtenção de linfócitos de pacientes com

câncer<sup>38</sup>. Além de permitir um maior controle experimental, minimizando variáveis relacionadas à heterogeneidade do sistema imunológico presente em pacientes com câncer.

Contudo, otimizações deste protocolo podem ser aplicadas visando o desenvolvimento de um modelo de co-cultura 3D com células tumorais e imunes obtidas diretamente de pacientes oncológicos. Isso envolveria a padronização do tempo de cultivo da linhagem 2D, assim como o período necessário para a formação dos esferoides.

Diferentes técnicas, além da análise de imagens, podem ser aplicadas a este modelo de co-cultura, como imunofenotipagem por citometria de fluxo, ensaios de viabilidade celular, ou ELISA do sobrenadante da cultura. Tais técnicas tem potencial para auxiliar na investigação da resposta imunológica diante do tratamento utilizado no modelo de co-cultura 3D desenvolvido nesse estudo.

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, estabelecemos o primeiro modelo de co-cultura 3D entre linhagens tumorais e células do sistema imunológico dentro do Laboratório de Cultura Celular do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Amor em Barretos. Este é um marco significativo para nosso laboratório e representa um avanço importante em nossas pesquisas.

Este modelo de co-cultura 3D é caracterizado por sua simplicidade e reprodutibilidade, empregando um meio de cultura RPMI completo (com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina), e sendo facilmente replicável com o uso de placas de baixa fixação. Com uma proporção de 5:1 entre as células tumorais e imunes, este modelo se mostra representativo das interações que ocorrem no microambiente tumoral *in vivo*. Além disso, realizamos a padronização dos cortes histológicos em criostato, confirmando a eficaz infiltração das células imunes no esferoide tumoral.

Por fim, este modelo tem potencial para auxiliar na caracterização da eficácia de medicamentos anticâncer em células de câncer de pulmão de não pequenas células, auxiliando, portanto, no desenvolvimento de novas terapias, e na otimização de estratégias terapêuticas combinadas. Adicionalmente, desenvolvemos uma plataforma para estudar a complexa interação entre o câncer e linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Pan E, Bogumil D, Cortessis V, Yu S, Nieva J. *A Systematic Review of the Efficacy of Preclinical Models of Lung Cancer Drugs*. **Front Oncol**. 2020;10:591.
2. Day CP, Merlino G, Van Dyke T. *Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges*. **Cell**. 2015;163(1):39-53.
3. Schenk EL, Mandrekar SJ, Dy GK, Aubry MC, Tan AD, Dakhil SR, et al. *A Randomized Double-Blind Phase II Study of the Seneca Valley Virus (NTX-010) versus Placebo for Patients with Extensive-Stage SCLC (ES SCLC) Who Were Stable or Responding after at Least Four Cycles of Platinum-Based Chemotherapy: North Central Cancer Treatment Group (Alliance) N0923 Study*. **J Thorac Oncol**. 2020;15(1):110-9.
4. Moreno L, Pearson AD. *How can attrition rates be reduced in cancer drug discovery?* **Expert Opin Drug Discov**. 2013;8(4):363-8.
5. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. **Assay Drug Dev Technol**. 2014;12(4):207-18.
6. Rebelo SP, Pinto C, Martins TR, Harrer N, Estrada MF, Loza-Alvarez P, et al. *3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment*. **Biomaterials**. 2018;163:185-97.
7. Lin YN, Nasir A, Camacho S, Berry DL, Schmidt MO, Pearson GW, et al. *Monitoring Cancer Cell Invasion and T-Cell Cytotoxicity in 3D Culture*. **J Vis Exp**. 2020(160).
8. Miller AJ, Spence JR. *In Vitro Models to Study Human Lung Development, Disease and Homeostasis*. **Physiology (Bethesda)**. 2017;32(3):246-60.
9. Ribeiro DL, Tuttis K, Oliveira LCB, Serpeloni JM, Gomes INF, Lengert AVH, et al. *The Antitumoral/Antimetastatic Action of the Flavonoid Brachyidin A in Metastatic Prostate Tumor Spheroids In Vitro Is Mediated by (Parthanatos) PARP-Related Cell Death*. **Pharmaceutics**. 2022;14(5).
10. Ma X, Wang Q, Li G, Li H, Xu S, Pang D. *Cancer organoids: A platform in basic and translational research*. **Genes Dis**. 2024;11(2):614-32.

11. Dhandapani M, Goldman A. *Preclinical Cancer Models and Biomarkers for Drug Development: New Technologies and Emerging Tools*. **J Mol Biomark Diagn**. 2017;8(5).
12. Roarty K, Echeverria GV. *Laboratory Models for Investigating Breast Cancer Therapy Resistance and Metastasis*. **Front Oncol**. 2021;11:645698.
13. Babini G, Morini J, Barbieri S, Baiocco G, Ivaldi GB, Liotta M, et al. *A Co-culture Method to Investigate the Crosstalk Between X-ray Irradiated Caco-2 Cells and PBMC*. **J Vis Exp**. 2018(131).
14. Al-Hity G, Yang F, Campillo-Funollet E, Greenstein AE, Hunt H, Mampay M, et al. *An integrated framework for quantifying immune-tumour interactions in a 3D co-culture model*. **Commun Biol**. 2021;4(1):781.
15. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. *Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids*. **Cell**. 2018;174(6):1586-98 e12.
16. Li Y, Lu Z, Che Y, Wang J, Sun S, Huang J, et al. *Immune signature profiling identified predictive and prognostic factors for esophageal squamous cell carcinoma*. **Oncoimmunology**. 2017;6(11):e1356147.
17. Zappa C, Mousa SA. *Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances*. **Transl Lung Cancer Res**. 2016;5(3):288-300.
18. Tan S, Li D, Zhu X. *Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond*. **Biomed Pharmacother**. 2020;124:109821.
19. Barbosa AM, Gomes-Goncalves A, Castro AG, Torrado E. *Immune System Efficiency in Cancer and the Microbiota Influence*. **Pathobiology**. 2021;88(2):170-86.
20. Hoekstra ME, Vijver SV, Schumacher TN. *Modulation of the tumor micro-environment by CD8(+) T cell-derived cytokines*. **Curr Opin Immunol**. 2021;69:65-71.
21. Barnes TA, Amir E. *HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer*. **Br J Cancer**. 2017;117(4):451-60.

22. Wang CI, Chang YF, Sie ZL, Ho AS, Chang JS, Peng CL, et al. *Irradiation Suppresses IFN $\gamma$ -Mediated PD-L1 and MCL1 Expression in EGFR-Positive Lung Cancer to Augment CD8(+) T Cells Cytotoxicity.* **Cells.** 2021;10(10).
23. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. *Delivery technologies for cancer immunotherapy.* **Nat Rev Drug Discov.** 2019;18(3):175-96.
24. Hsu ML, Naidoo J. *Principles of Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer.* **Thorac Surg Clin.** 2020;30(2):187-98.
25. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. *The biology and management of non-small cell lung cancer.* **Nature.** 2018;553(7689):446-54.
26. Lu Y, Zhang X, Ning J, Zhang M. *Immune checkpoint inhibitors as first-line therapy for non-small cell lung cancer: A systematic evaluation and meta-analysis.* **Hum Vaccin Immunother.** 2023;19(1):2169531.
27. Della Vittoria Scarpati G, Fuscillo C, Perri F, Sabbatino F, Ferrone S, Carlomagno C, et al. *Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: management of adverse events.* **Onco Targets Ther.** 2014;7:203-9.
28. Zheng Y, Fang YC, Li J. *PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity.* **Oncol Lett.** 2019;18(5):5399-407.
29. Kennedy LB, Salama AKS. *A review of cancer immunotherapy toxicity.* **CA Cancer J Clin.** 2020;70(2):86-104.
30. Stankovic B, Bjorhovde HAK, Skarshaug R, Aamodt H, Frafjord A, Muller E, et al. *Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer.* **Front Immunol.** 2018;9:3101.
31. Mei Z, Huang J, Qiao B, Lam AK. *Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma.* **Int J Oral Sci.** 2020;12(1):16.
32. Bareham B, Georgakopoulos N, Matas-Cespedes A, Curran M, Saeb-Parsy K. *Modeling human tumor-immune environments in vivo for the preclinical assessment of immunotherapies.* **Cancer Immunol Immunother.** 2021;70(10):2737-50.

33. Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. *Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy.* **Semin Cancer Biol.** 2018;52(Pt 1):103-9.
34. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. *Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy.* **Cell.** 2017;168(4):707-23.
35. Park JV, Chandra R, Cai L, Ganguly D, Li H, Toombs JE, et al. *Tumor Cells Modulate Macrophage Phenotype in a Novel In Vitro Co-Culture Model of the NSCLC Tumor Microenvironment.* **J Thorac Oncol.** 2022;17(10):1178-91.
36. Lin G, Fan X, Zhu W, Huang C, Zhuang W, Xu H, et al. *Prognostic significance of PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocyte in surgically resectable non-small cell lung cancer.* **Oncotarget.** 2017;8(48):83986-94.
37. de Ruiter EJ, Mulder FJ, Koomen BM, Speel EJ, van den Hout M, de Roest RH, et al. *Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).* **Mod Pathol.** 2021;34(6):1125-32.
38. Lima JA, Sorroche BP, Tostes K, Dias TC, de Carvalho Rodrigues N, Tansini A, et al. *Repurposing discarded leukodepletion filters as a source of mononuclear cells for advanced in vitro research.* **J Immunol Methods.** 2024:113694.
39. Kasichayanula S, Mandlekar S, Shivva V, Patel M, Girish S. *Evolution of preclinical characterization and insights into clinical pharmacology of checkpoint inhibitors approved for cancer immunotherapy.* **Clin Transl Sci.** 2022;15(8):1818-37.
40. Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT, Huang H, Feingersh D, et al. *In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates.* **Cancer Immunol Res.** 2014;2(9):846-56.
41. Lee HT, Lee SH, Heo YS. *Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology.* **Molecules.** 2019;24(6).
42. Zak KM, Grudnik P, Magiera K, Domling A, Dubin G, Holak TA. *Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2.* **Structure.** 2017;25(8):1163-74.

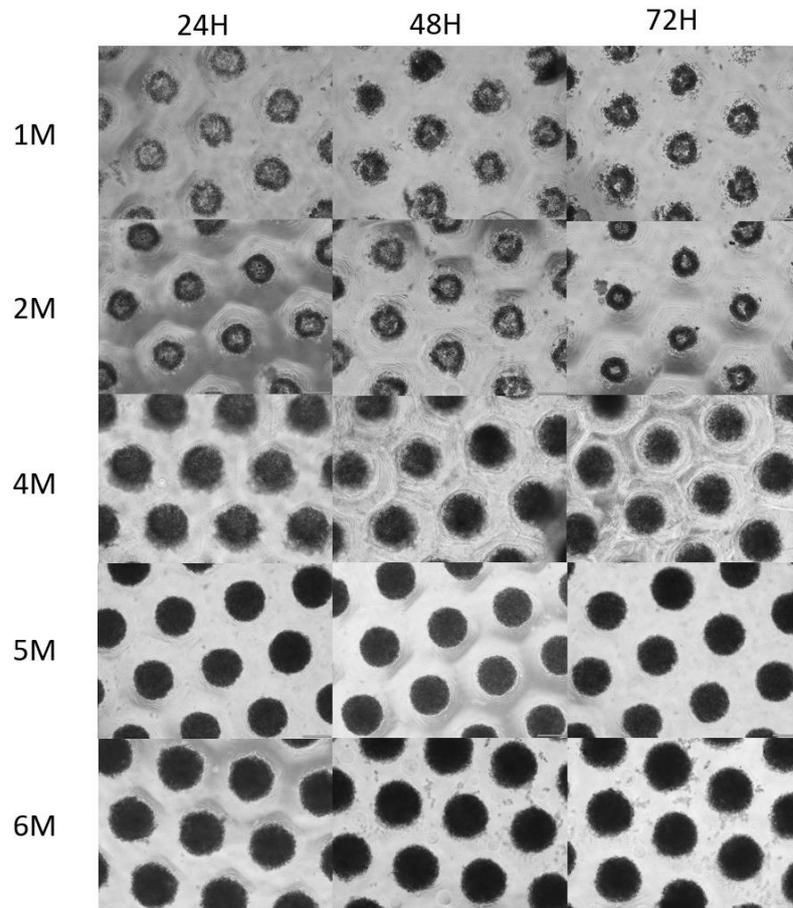
43. da Silva-Oliveira RJ, Gomes INF, da Silva LS, Lengert AVH, Laus AC, Melendez ME, et al. *Efficacy of Combined Use of Everolimus and Second-Generation Pan-EGRF Inhibitors in KRAS Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines*. **Int J Mol Sci**. 2022;23(14).
44. Jung S, Kim DH, Choi YJ, Kim SY, Park H, Lee H, et al. *Contribution of p53 in sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer*. **Sci Rep**. 2021;11(1):19667.
45. Iwakawa R, Kohno T, Enari M, Kiyono T, Yokota J. *Prevalence of human papillomavirus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma*. **Cancer Sci**. 2010;101(8):1891-6.
46. Endoh H, Yatabe Y, Shimizu S, Tajima K, Kuwano H, Takahashi T, et al. *RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication*. **Int J Cancer**. 2003;106(1):45-51.
47. Jeong SR, Kang M. *Exploring Tumor-Immune Interactions in Co-Culture Models of T Cells and Tumor Organoids Derived from Patients*. **Int J Mol Sci**. 2023;24(19).
48. Charelli LE, Dernowsek JA, Balbino TA. *Generation of Tissue Spheroids via a 3D Printed Stamp-Like Device*. **J Vis Exp**. 2022(188).
49. Gonzalez-Fernandez T, Tenorio AJ, Leach JK. *Three-Dimensional Printed Stamps for the Fabrication of Patterned Microwells and High-Throughput Production of Homogeneous Cell Spheroids*. **3D Print Addit Manuf**. 2020;7(3):139-47.
50. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. *Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach*. **Nat Protoc**. 2009;4(3):309-24.
51. Nath S, Devi GR. *Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model*. **Pharmacol Ther**. 2016;163:94-108.
52. Bresciani G, Hofland LJ, Dogan F, Giamas G, Gagliano T, Zatelli MC. *Evaluation of Spheroid 3D Culture Methods to Study a Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cell Line*. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2019;10:682.
53. Doroshov DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjjatic S, et al. *PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2021;18(6):345-62.
54. Patel SA, Weiss J. *Advances in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer: Immunotherapy*. **Clin Chest Med**. 2020;41(2):237-47.

55. Kim DH, Kim H, Choi YJ, Kim SY, Lee JE, Sung KJ, et al. *Exosomal PD-L1 promotes tumor growth through immune escape in non-small cell lung cancer*. **Exp Mol Med**. 2019;51(8):1-13.
56. Steven A, Fisher SA, Robinson BW. *Immunotherapy for lung cancer*. **Respirology**. 2016;21(5):821-33.
57. Tostes K, Siqueira AP, Reis RM, Leal LF, Arantes L. *Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor Response in NSCLC: Current Developments and Applicability*. **Int J Mol Sci**. 2023;24(15).
58. Arfe A, Fell G, Alexander B, Awad MM, Rodig SJ, Trippa L, et al. *Meta-Analysis of PD-L1 Expression As a Predictor of Survival After Checkpoint Blockade*. **JCO Precis Oncol**. 2020;4:1196-206.
59. Chen Y, Liu Q, Chen Z, Wang Y, Yang W, Hu Y, et al. *PD-L1 expression and tumor mutational burden status for prediction of response to chemotherapy and targeted therapy in non-small cell lung cancer*. **J Exp Clin Cancer Res**. 2019;38(1):193.
60. Davis AA, Patel VG. *The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors*. **J Immunother Cancer**. 2019;7(1):278.
61. Sharma G, Braga MC, Da Pieve C, Szopa W, Starzetz T, Plate KH, et al. *Immuno-PET Imaging of Tumour PD-L1 Expression in Glioblastoma*. **Cancers (Basel)**. 2023;15(12).
62. Yu W, Hua Y, Qiu H, Hao J, Zou K, Li Z, et al. *PD-L1 promotes tumor growth and progression by activating WIP and beta-catenin signaling pathways and predicts poor prognosis in lung cancer*. **Cell Death Dis**. 2020;11(7):506.
63. Chen W, Saxton B, Tessema M, Belinsky SA. *Inhibition of GFAT1 in lung cancer cells destabilizes PD-L1 protein*. **Carcinogenesis**. 2021;42(9):1171-8.
64. Lahiri A, Maji A, Potdar PD, Singh N, Parikh P, Bisht B, et al. *Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises*. **Mol Cancer**. 2023;22(1):40.
65. Wadowska K, Bil-Lula I, Trembecki L, Sliwinska-Mosson M. *Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review*. **Int J Mol Sci**. 2020;21(13).

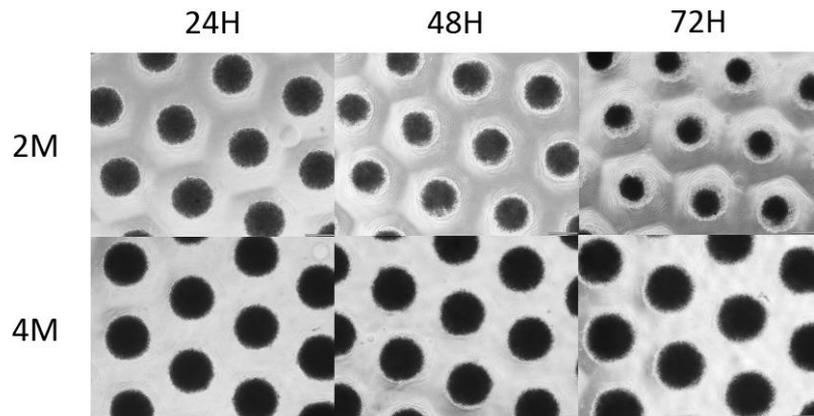
66. Alexander M, Kim SY, Cheng H. *Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer*. **Lung**. 2020;198(6):897-907.
67. Mazieres J, Drilon A, Lusque A, Mhanna L, Cortot AB, Mezquita L, et al. *Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry*. **Ann Oncol**. 2019;30(8):1321-8.
68. Lauko A, Kotecha R, Barnett A, Li H, Tatineni V, Ali A, et al. *Impact of KRAS mutation status on the efficacy of immunotherapy in lung cancer brain metastases*. **Sci Rep**. 2021;11(1):18174.
69. Gu X, Si J, Guan Y, Xu Y, Shao L, Zhang Y, et al. *Efficacy of immune checkpoint inhibitors in patients with KRAS-mutant advanced non-small cell lung cancer: A retrospective analysis*. **Open Med (Wars)**. 2023;18(1):20230653.
70. Amaral RLF, Miranda M, Marcato PD, Swiech K. *Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening*. **Front Physiol**. 2017;8:605.
71. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, et al. *3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained*. **Sci Rep**. 2016;6:19103.
72. Benien P, Swami A. *3D tumor models: history, advances and future perspectives*. **Future Oncol**. 2014;10(7):1311-27.
73. Saraiva DP, Matias AT, Braga S, Jacinto A, Cabral MG. *Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient-Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies*. **Front Oncol**. 2020;10:1543.
74. Lin YN, Schmidt MO, Sharif GM, Vietsch EE, Kiliti AJ, Barefoot ME, et al. *Impaired CXCL12 signaling contributes to resistance of pancreatic cancer subpopulations to T cell-mediated cytotoxicity*. **Oncoimmunology**. 2022;11(1):2027136.
75. Li J, Xu X. *Immune Checkpoint Inhibitor-Based Combination Therapy for Colorectal Cancer: An Overview*. **Int J Gen Med**. 2023;16:1527-40.
76. Shimizu T, Inoue E, Ohkuma R, Kobayashi S, Tsunoda T, Wada S. *Soluble PD-L1 changes in advanced non-small cell lung cancer patients treated with PD-1 inhibitors: an individual patient data meta-analysis*. **Front Immunol**. 2023;14:1308381.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

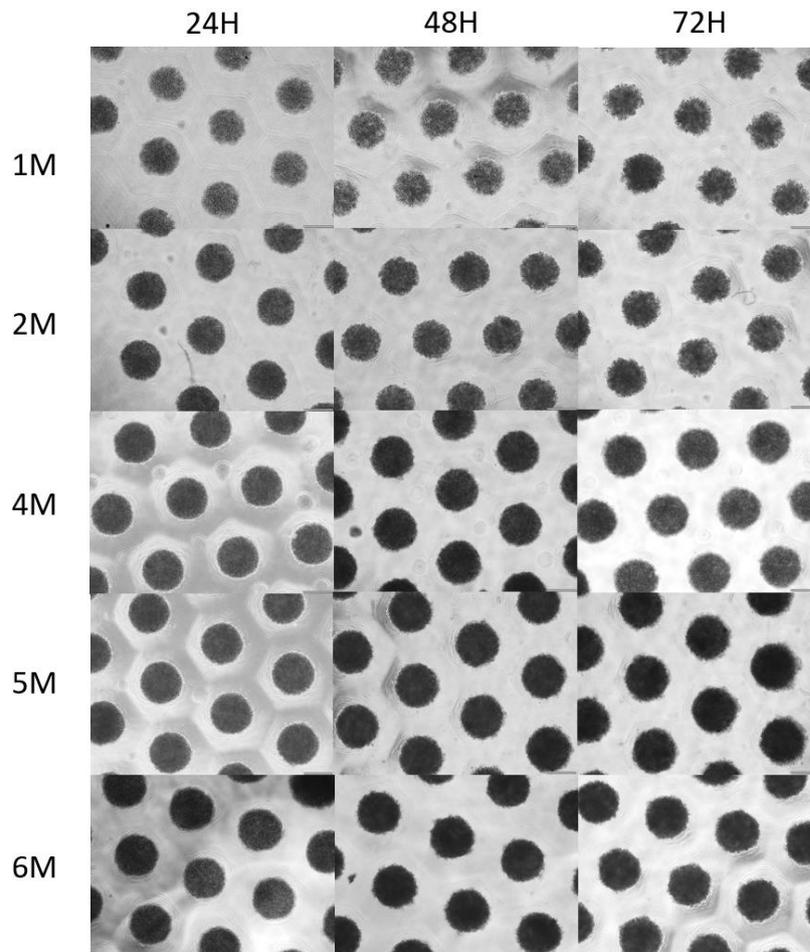
Anexo A – Formação de esferoides utilizando micromoldes de precisão para formar géis de agarose com micropoços



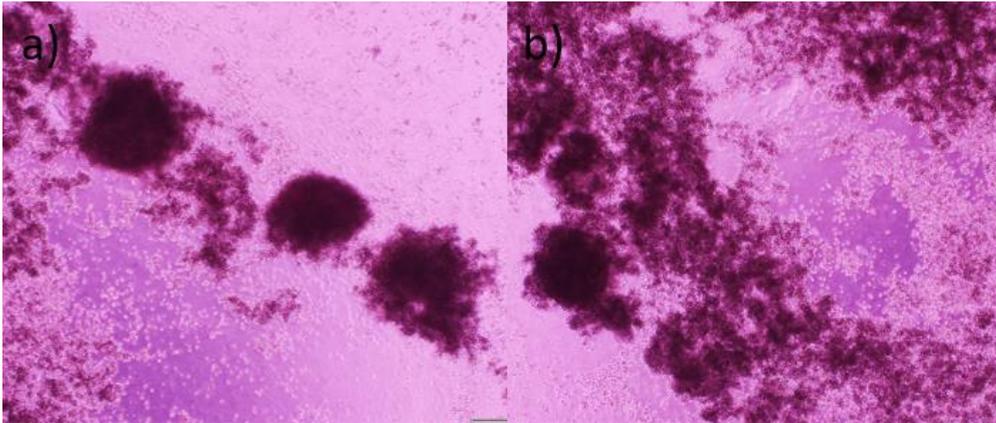
**Figura Suplementar 1.** Linhagem A549 semeada em placa de 12 poços contendo gel de agarose micromoldada. As células foram semeadas na concentração de 1, 2, 4, 5 e 6 milhões, e fotografadas 24h, 48h e 72h após serem semeadas. M: milhão, H: hora.



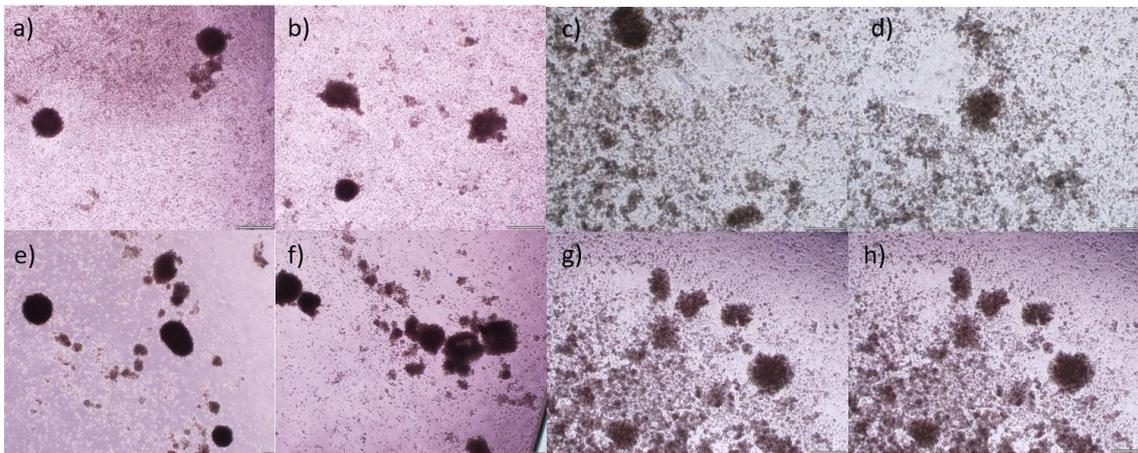
**Figura Suplementar 2.** Linhagem H292 WT semeada em placa de 12 poços contendo gel de agarose micromoldada. As células foram semeadas na concentração de 2 e 4 milhões, e fotografadas às 24h, 48h e 72h.



**Figura Suplementar 3.** Linhagem LCOR105 semeada em placa de 12 poços contendo gel de agarose micromoldada. As células foram semeadas na concentração de 1, 2, 4, 5 e 6 milhões, e fotografadas às 24h, 48h e 72h.

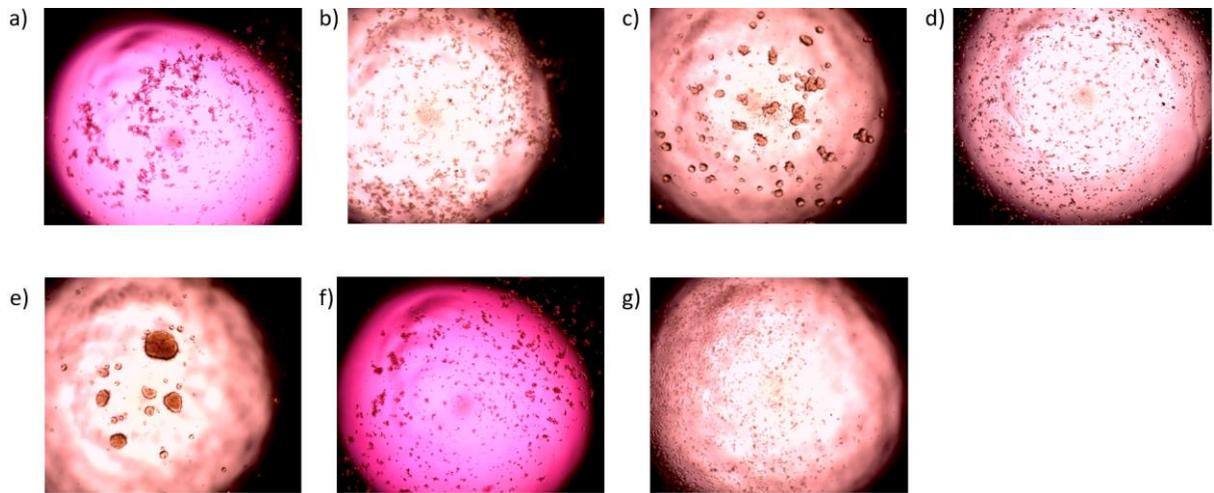


**Figura 47.** Captura dos esferoides formados a partir da linhagem A549. **a)** e **b)** A549, utilizando-se uma pipeta P1000.



**Figura Suplementar 548.** Em **a)** e **b)** captura dos esferoides da linhagem H292 com pipeta P100. **c)** e **d)** captura de esferoides da linhagem LCOR105 com pipeta P100. **e)** e **f)** esferoides H292 WT capturados com pipeta *pasteur*, e **g)** e **h)** linhagem LCOR105 capturadas com pipeta *pasteur*.

Anexo B – Formação de esferoides utilizando placas revestidas com Agarose



**Figura Suplementar 6.** Protocolo de formação de esferoides com microplacas revestidas com agarose. **a)** A549; **b)** LCOR105; **c)** H358; **d)** H1975; **e)** HCC827; **f)** SKMES1; **g)** H292 WT.