

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

VINICIUS ALEX CANO PEREIRA

**IMUNOTERAPIA CLÍNICA DE CÉLULAS CAR T USADAS CONTRA TUMORES –
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

SÃO CARLOS

2023

VINICIUS ALEX CANO PEREIRA

**IMUNOTERAPIA CLÍNICA DE CÉLULAS CAR T USADAS CONTRA TUMORES –
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal de São
Carlos, como parte para obtenção do título de
bacharel.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius

SÃO CARLOS

2023

Aos pacientes reportados no presente estudo que, pela confiança na intervenção da medicina baseada em evidências, concordaram em participar dos testes clínicos apresentados nas publicações analisadas.

À minha família que possibilitou angariar meios para minha formação acadêmica e permitir com que eu alcançasse coisas maravilhosas

Aos meus amigos e colegas de profissão pela confiança que depositaram em mim e ao meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio fornecido, o qual me possibilitou conquistar coisas grandiosas e que jamais serei suficientemente grato.

Às coautoras, Amanda Tejada e Júlia Dias, pela paciência e esforços dedicados à realização deste trabalho. Sem a ajuda e dedicação de ambas, não teria sido possível atingir todo o potencial deste projeto

À professora Dra. Maria Cristina Pranchevicius, por todo o cuidado, orientação, amizade ímpar e companheirismo nesses anos de graduação. Por ter aceitado ser orientadora deste presente trabalho e pela sua ajuda ímpar na criação e supervisão da Liga Acadêmica Interdisciplinar de Imunologia Molecular (LAIIM).

Aos meus amigos Karina, Larissa, Marisa, Nathália, Stevan e Sylmara por todo o amparo, conselhos, orientações, risadas, conversas, e presença por todos esses anos. A companhia de cada um de vocês foi imprescindível, e sou eternamente grato e feliz por tê-los em minha vida.

Aos meus companheiros e amigos da Liga Acadêmica Interdisciplinar de Imunologia Molecular que, com seus esforços inestimáveis, tornaram possíveis a realização de um projeto sobre divulgação científica para à comunidade, fornecendo meios para que eu pudesse me aprimorar ainda mais como indivíduo e profissional.

Aos meus companheiros e amigos da Liga Interdisciplinar de Genética Médica (LIGeM) por toda capacitação, oportunidade em ambulatório, e pela incrível formação como profissional que me foi ofertada durante os anos que participei como ligante e diretor. Sou extremamente grato pela oportunidade!

À professora Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes, por ter me aceito em seu laboratório para estágio, e os demais membros do laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBV), Dani, Isa e Karina, por toda ajuda, formação, conselhos e risadas que me proporcionaram durante este período.

Aos meus companheiros e amigos da Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa) unidade instrumentação, por todo o suporte, ajuda, conversas e risadas que foram imprescindíveis na

minha formação e crescimento profissional e pessoal. Sou eternamente grato pelas experiências que este estágio me proporcionou.

Aos professores do curso de Bacharelado em Biotecnologia, Técnicos e ao Secretário do Curso, Rodrigo Roberto Malimpensa, por toda ajuda durante esses anos.

A todas as pessoas que, de alguma forma, me auxiliaram em minha trajetória pessoal ou profissional.

EPÍGRAFE

“Em certo sentido, a doença só passa a existir quando decidimos de comum acordo que ela existe – percebendo-a, dando-lhe nome e respondendo a ela.”

- C. E. Rosenberg

“Quem não tem formação em química ou medicina talvez não perceba quão difícil é a questão do tratamento de câncer. É quase – não tanto, mas quase – tão difícil como descobrir um agente capaz de dissolver a orelha esquerda, por exemplo, e deixar a orelha direita intacta. Tão pequena é a diferença entre a célula cancerosa e seu ancestral normal.”

- William Woglom

“Matar uma célula cancerosa numa proveta não é tarefa particularmente difícil: no mundo químico abundam venenos malévolos que, mesmo em quantidades infinitesimais, podem despachar uma célula cancerosa em minutos. O problema é encontrar um veneno seletivo – uma droga que mate o câncer sem aniquilar o paciente.”

- Siddhartha Mukherjee

RESUMO

A terapia com células T do receptor de antígeno quimérico (CAR-T *cells*) é um tipo de tratamento imunoterápico contra o câncer, que envolve a modificação genética das células T autólogas do paciente para expressar um CAR específico para um antígeno tumoral, seguido de expansão celular *ex vivo* e reinfusão de volta ao paciente. Embora as CAR-Ts represente um grande avanço no tratamento do câncer e alcançou um sucesso sem precedentes em malignidades hematológicas, especialmente em malignidades de células B recidivantes/refratárias (R/R), seu sucesso em tumores sólidos é bastante limitante devido a fatores como o microambiente tumoral altamente imunossupressor, baixa infiltração das CAR-Ts, toxicidades. Nesta revisão sistemática, avaliamos testes clínicos de CAR-Ts para diferentes tumores com o objetivo de analisar os recentes avanços nesse tipo de tratamento. Foram consultados bancos de dados como CAPES database, web of Science e Pubmed através de palavras-chaves como “*Immunotherapy*” AND “*CAR T cells*” e “*Solid tumors*” AND “*CAR T cells*”. Alguns critérios de inclusão foram estabelecidos como: a publicação dos artigos deveria ser entre os anos 2015-2021, e deveriam ser pesquisas clínicas disponíveis e publicadas em inglês. Critérios para não-inclusão consistiam em artigos de revisão e testes pré-clínicos. *PRISMA systematic review for clinical trials* foi utilizado para implementar a escrita do presente trabalho, os sites do *clinicaltrials.gov* e *fda.gov* auxiliaram nas análises relacionadas aos aprimoramentos de células CAR-T. Um total de 1.188 artigos foram obtidos, nos quais 14 contemplaram os critérios de inclusão e serviram como base para as análises da efetividade, segurança e limitações das CAR T-cells. Embora o número amostral apresentou-se pequeno, manteve-se coerente com o observado na literatura científica. Fatores críticos para ativação das CAR-Ts e resistência ao tratamento foram identificados, incluindo concentração de células T, carga de doença/antígeno, terapias anteriores e efeitos *Cytokine-Release Syndrome/Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome* (CRS/ICANS). O aprimoramento das CAR-Ts é de fundamental importância para amenizar os efeitos CRS/ICANS, evitar a morte do paciente, e sobrepor os desafios apresentados no tratamento de tumores sólidos. Uma ampla variedade de estratégias para células CAR-Ts tem sido desenvolvida e incorporada para atingir esses objetivos e, com sucesso, vem sendo testadas na prática clínica. O presente estudo reitera o grande potencial das células CAR-Ts no tratamento de tumores, mesmo com a ocorrência de algumas limitações.

Palavras-Chaves: Imunoterapia, CAR-T, tumores.

ABSTRACT

Chimeric antigen receptor T cell therapy (CAR-T cell therapy) is a type of immunotherapy for cancer treatment that involves genetically modifying the patient's own T cells to express a specific CAR for a tumor antigen, followed by *ex vivo* cell expansion and reinfusion into the patient. Although CAR-T cells represent a major advance in cancer treatment and have achieved unprecedented success in hematological malignancies, especially in relapsed/refractory B-cell malignancies (R/R), their success in solid tumors is quite limited due to factors such as the highly immunosuppressive tumor microenvironment, low CAR-T cell infiltration, and toxicities. In this systematic review we evaluate the recent CAR-T cells clinical trials tested for different malignancies to overview recent advances in cancer immunotherapy using this approach. We sourced CAPES database, web of science and Pubmed through the following keywords: “*Immunotherapy*” AND “*CAR T cells*” and “*Solid tumors*” AND “*CAR T cells*”. Some criteria were established to compose this review as the articles had to be published between 2015 and 2021, it must be clinical trials research available and published in English language. Review and pre-clinical research articles are both excluded. PRISMA systematic review for clinical trials was consulted and followed to help the discussion and data presentation, and research website, as *clinicaltrials.gov* and *fda.gov*, as well as recent pre-clinical improvement CAR T cells were incorporated into the discussion. We obtained 1.188 articles, which 14 met inclusion/exclusion criteria and discussed CAR design, T cell production, and toxicities. Sample size is small but consistent with others reviews. Determinant factors for CAR-T activation and resistance to treatment were identified, including T cell concentration, disease/antigen burden, prior therapies, and CRS/ICANS adverse. Our study has shown that CAR-T cells have a great potential in threatening malignance, even some toxicities may occur. The CAR-T improvement must be continuous to ameliorate the *Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome/Immune effector Cytokine-Release Syndrome* (CRS/ICANS) or even patient's death, as well as overcome the solid malignance resistance. Several CAR-T cells strategies have been incorporated and developed to reach this goal and successfully has been tested into clinical practice. This evidentiates the high potential of this immunotherapy approach against cancer.

Keywords: Immunotherapy, CAR-T, tumors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismo de Ação da Célula CAR-T	16
Figura 2. Estruturas da molécula CAR.	18
Figura 3. Gerações de Células CAR-Ts.....	23
Figura 4. Processo de Obtenção, Produção e Expansão das CAR-Ts	25
Figura 5. Fluxograma simplificado com os passos da metodologia para obtenção dos artigos.	40
Figura 6. Esquema de Construções de CAR contendo diferentes Endodomínios.	46
Figura 7. Esquema de Construção do CAR apresentado por Gauthier et al (2021)	48
Figura 8. Construção em tandem de CAR	51
Figura 9. Esquema de construção de uma CAR-T apresentada por Liu et al (2021)	54
Figura 10. Construção das CAR-Ts apresentadas por YOU et al (2016).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. CAR-Ts aprovadas atualmente pelo FDA	20
Tabela 2. TRUCKs atualmente testados	22
Tabela 3. Clinical Trials para CAR-Ts desenvolvidas atualmente.....	36
Tabela 4. Alvos e vetores utilizados em CARTs e tipos de tumores.....	37
Tabela 5. Classificação dos 14 Artigos Obtidos	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV	Adeno-Associated Virus
AE	Adverse Effects
AICD	Activation-Induced Cell Death (AICD).
ALL	Acute Lymphocytic Leukemia
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BBB	Blood-Brain Barrier
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary Determining Regions
CLL	Chronic Lymphoid Leukemia
CNS	Central Nervous System
CNSL	Central Nervous System Leukemia
CRS	Cytokine-Release Syndrome
CSF	Cerebrospinal Fluid
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4
CY-FLU	Cyclophosphamide and Fludarabine
DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma
EFG	Epidermal Growth Factor
FAB	Fragment antigen-binding
FDA	Food and Drug Administration
FL	Follicular Lymphoma
Globocan	Global Cancer Observatory
aGVHD	Acute Graft-versus-Host Disease

GvHD	Graft-versus-Host Disease
HLH/MAS	Hemophagocytic Lymphohistiocytosis /Macrophage Activation Syndrome
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplant
HSPG	Heparin Sulfate Proteoglycan
ICANS	Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome
iCasp9	Inducible Caspase 9
ICU	Intensive Care Unit
IRES	Internal Ribosome Entry Site
LFS	Leukemia Free Survival
MAS	Macrophage Activation Syndrome
MDSCs	Myeloid Derived Suppressor Cells
MPAL	Mixed Phenotype Acute Leukemia
MM	Multiple Myeloma
NB	Neuroblastoma
NHL	Non-Hodgkin Lymphoma
ORR	Overall Response Rate
OS	Overall Survival
PB	Peripheral Blood
PD-L1	Programmed cell Death Protein Ligand 1
PET-CT	Positron Emission Tomography–Computed Tomography
SB	Sleeping Beauty transposons
SCFV	Single-Chain Fragment Variable
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TAM	Tumor Associated Macrophages

TF	Transcription Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TLS	Tumor Lysis Syndrome
TME	Tumor Microenvironment
TRUCKs	T cells Redirected for antigen-Unrestricted Cytokine-initiated Killing
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization
ZFN	Zinc Finger Nuclease

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Imunoterapias.....	14
2.2. Imunoterapia de Células CAR-Ts.....	15
2.3. Constituições Básicas.....	16
2.4. As Gerações de CAR-T estão diretamente ligadas às suas funções biológicas.....	19
2.5. Obtenção e Produção das Células CAR-Ts.....	23
2.6. Limitações das CAR-Ts.....	26
2.6.1. Desafio de Tumores Sólidos.....	26
2.6.2. Toxicidades.....	27
2.6.3. Escape Tumoral.....	30
2.7. Os Testes Clínicos Atuais para CAR-Ts.....	31
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo Geral.....	37
3.2. Objetivo Específico.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
5. RESULTADOS.....	39
6. DISCUSSÕES.....	57
7. CONCLUSÃO.....	63
8. BIBLIOGRAFIA.....	65

1. INTRODUÇÃO

Os cânceres são um conjunto no qual vários tipos de doenças estão inclusas, e que tem sido um dos maiores desafios para tratamento e cura. De maneira geral, podem ser divididos em duas categorias principais: tumores hematológicos ou líquidos para descrever os vários tipos de Linfomas e Leucemias; e tumores sólidos que atingem os órgãos. Linfoma de Não-Hodgkin (NHL) é a malignidade hematológica mais comum no mundo e abrange mais de 40 subtipos diferentes, sendo os mais comuns: linfoma folicular indolente (FL) e linfoma difuso de grandes células B agressivo (DLBCL) (THANDRA et al., 2021). Dados retirados do *Globocan* indicam que houveram 544.352 novos casos de NHL ao redor do mundo. De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO), trata-se do câncer mais comum em países ocidentais, representando cerca de 31% do total de cânceres reportados em adultos (THANDRA et al., 2021). Sua incidência é mais comum em homens com idade superior a 65 anos descendentes de europeus e hispânicos (THANDRA et al., 2021). Dentre os fatores associados com o risco de um indivíduo desenvolver NHL encontram-se desordens imunológica, medicamentos, infecções, estilo de vida, raça, histórico familiar, dentre outros. Ademais, obesidade tem sido elencada como um fator de risco para o desenvolvimento de DLBCL (ARMITAGE et al., 2017), cuja doença é a mais comum e possui uma das mortalidades mais altas, dentre os cânceres NHL, ao redor do mundo (CAMICIA; WINKLER.; HASSA., 2015). Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) é o câncer mais comum em pacientes pediátricos, sendo responsável por cerca de um terço das malignidades reportadas (GREAVES., 2018). ALL incluem um número de subtipos de malignidades hematológicas definidas pela linhagem celular acometida, como linfócitos B ou Ts, status de diferenciação e genética (GREAVES., 2018). Ademais, esses subtipos de ALL diferem nas idades dos pacientes acometidos, nas respostas clínicas observadas e possuem etiologias diferentes (GREAVES., 2018). Diferentes análises indicam, fortemente, uma associação de vários casos de leucemias como tendo etiologias pré-natais, como detecções de translocações cromossômicas, particularmente ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) podendo ser detectadas no cordão umbilical anos antes das manifestações clínicas de leucemia, o que sugere um processo de leucemogênese envolvendo várias etapas (INABA & MULLIGHAN., 2020). Ademais, há fortes evidências para a mutação anterior citada e a formação do rearranjo *KMT2A* no útero (INABA & MULLIGHAN., 2020). A leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) é a forma mais comum dentre os ALL, correspondendo a cerca de 20 subtipos de malignidades hematológicas e que possuem prevalência variada de acordo com a idade do paciente. Adicionalmente, possuem expressão

gênica divergente entre os subtipos e são iniciadas por três tipos principais de mutações: aneuploidias cromossômicas, rearranjos que desregulam oncogenes ou formam fatores de transcrição quiméricos e mutações pontuais (INABA & MULLIGHAN., 2020). Cada tipo de mutação e sua frequência varia de acordo com os subtipos, e irão afetar especificamente algum passo do desenvolvimento linfocitário, regulação do ciclo celular, genes de ativação e regulação da cromatina (INABA & MULLIGHAN., 2020).

Tais cânceres hematológicos, descritos previamente, têm sido curados com tratamentos convencionais, dentre os quais moléculas capazes de impedir o progresso do câncer, quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea. Este último sendo a ferramenta imunoterápica mais promissora e aplicada no tratamento para cânceres hematológicos, no entanto possui uma grande limitação que consiste em achar indivíduos que sejam haplo-ídênticos. Dessa forma, torna-se necessário a procura e desenvolvimento de novas ferramentas imunoterápicas que visem combater de maneira efetiva e a longo prazo esse tipo de doença (YANG et al., 2023). No entanto, esse entendimento e desenvolvimento de imunoterapias só foi possível devido ao reconhecimento de que o progresso do câncer e nosso sistema imune estavam diretamente correlacionados e que, caso obtivermos meios de aprimorar ou intensificar a resposta imunológica de um indivíduo, podemos de maneira concomitante estar fornecendo meios terapêuticos para atividade antitumoral. Dr Willian Coley em 1983, atualmente conhecido como pai da imunoterapia, procurou meios alternativos à cirúrgica como método do tratamento de sarcoma, e mostrou que pacientes com diagnóstico de sarcoma e que desenvolveram erisipela pela infecção do microrganismo *Streptococcus pyrogenes*, poderiam ter o câncer em remissão espontânea a longo prazo ou até mesmo o desaparecimento do tumor (CARLSON; FLICKINGER JR; SNOOK., 2020; ABBOTT & USTOYEV., 2019). Dessa forma, começou-se a injetar, o que fora denominada como “toxina mista de Coley” em tumores de pacientes com várias malignidades diferentes, dentre as quais: sarcoma, linfoma e câncer testicular (ABBOTT & USTOYEV., 2019). Paul Erlich, em 1909, sugeriu que os tumores seriam controlados pelo sistema imunológico, no entanto, a falta de tecnologia na época que pudesse por em prova essa ideia fez com que esse fato somente pudesse ser comprovado anos mais tarde (CARLSON; FLICKINGER JR; SNOOK., 2020; ABBOTT & USTOYEV., 2019). Hoje, no entanto, é bem estabelecido de que as células tumorais podem e são reconhecidas pelo sistema imune devido às diferenças intrínsecas nas células tumorais e células não-tumorais ou saudáveis. Os pesquisadores Lewis Thomas e Frank Burnet sugeriram que os antígenos das

células tumorais, denominados neoantígenos, eram capazes de desencadear uma resposta imunológica antitumoral (SILVA et al., 2021).

Imunoedição foi elencado como o termo responsável por descrever o processo dinâmico em que o sistema imune consegue, em certo período, reconhecer e eliminar as células tumorais, ao passo que, também, contribui para a formação de neoantígenos pela pressão seletiva e, juntamente a vários mecanismos das células tumorais, propicia um ambiente para evasão tumoral do sistema imunológico (SILVA et al., 2021; ABBOTT & USTOYEV., 2019). A imunoedição é compreendida em três fases distintas na qual a primeira é a eliminação e refere-se a um período em que a imunovigilância está constantemente ativada. Células que eventualmente não possuem reparo de seu material genético e que tornam-se malignas, podem ser reconhecidas e mortas pelo nosso sistema imunológico através deste processo. Células da imunidade inata são capazes de reconhecer as células tumorais e, mediante auxílio das células apresentadoras de antígeno, são capazes de estimular a imunidade adaptativa, na qual linfócitos Ts CD4⁺ e CD8⁺, específicos para tumores, serão gerados. Dessa forma, a imunovigilância é considerada a fase de desenvolvimento tumoral indetectável. Em seguida temos a segunda fase, consistindo nas células tumorais que não foram eliminadas, por algum motivo, pelo sistema imunológico e, no entanto, são incapazes de progredir. Nesta fase, essas células resistentes, são capazes de coexistir com o sistema imunológico por anos. A terceira e última fase consiste na fuga ou evasão, na qual as células cancerosas possuem capacidade de crescer e metastatizar. Nesta fase, o sistema imunológico não consegue mais conter o crescimento de células malignas (ABBOTT & USTOYEV., 2019). Vários mecanismos de resistência conferem às células cancerosas capacidades de evitar a eliminação pelo sistema imunológico, dentre as quais pode-se constatar: capacidade de expressar moléculas na superfície de células cancerosas inibitórias à ativação de células do sistema imunológico (ABBOTT & USTOYEV., 2019).

Tendo como vista essa correlação entre o sistema imunológico e o câncer, algumas ferramentas visam identificar os principais componentes do sistema imunológico responsáveis pela atividade antitumoral e, com base nisso, desenvolver e criar novas estratégias para aprimorar essa resposta imunológica e torna-la mais robusta e eficiente em sua capacidade de eliminar células cancerosas. Alguns métodos de imunoterapias consistem em vacinas, administração de anticorpos monoclonais, e inibidores de checkpoints imunológicos (ABBOTT & USTOYEV., 2019), e podem ser divididas em duas categorias principais como imunoterapia ativa, consistindo em estimulação de respostas imunológicas, formação de memória e resposta duradoura; e imunoterapias passivas que produzem respostas específicas, mas de baixa duração,

requerendo administração regulares dos agentes terapêuticos (ABBOTT & USTOYEV., 2019). Exemplos de imunoterapia ativa e passiva são vacinas para tratamento de câncer e administração de anticorpos monoclonais, respectivamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Imunoterapias

Imunoterapia têm revolucionado o tratamento de cânceres e compõem a quarta frente de tratamento da doença; sendo as primeiras: a cirurgia, a radiação e a quimioterapia (PAN et al., 2022). Seu objetivo consiste na utilização de diferentes componentes do sistema imunológico a fim de erradicar as células tumorais, seja de cânceres hematológicos ou sólidos, e pode ser compreendida em três frentes principais: Terapia celulares adotivas (ACT), vacinas tumorais e inibidores de checkpoints imunológicos (ICI) (ALNEFAIE et al., 2022). Outras intervenções terapêuticas podem ser citadas, como o uso de citocinas, utilização de vírus oncolíticos, e administração de anticorpos monoclonais, sendo os inibidores de *checkpoint* e as citocinas, as classes terapêuticas com maior investigação científica e aplicação clínica (SILVA et al., 2021). A intervenção através da imunoterapia tem se tornado uma das estratégias mais promissoras no combate ao câncer devido à obtenção de respostas antitumorais mais persistentes, redução de metástases e recorrências (SILVA et al., 2021).

Dentre a categoria ACT, temos o exemplo de ferramentas que visam a obtenção e separação dos linfócitos T infiltrantes (TIL), que poderão ser cultivados *in vitro* nos laboratórios e, após a obtenção de grandes quantidades celulares, re-infusionados no paciente para efetivação da atividade antitumoral. Todavia, um dos fatores limitantes intrínsecos a esta abordagem consiste no acesso ao milieu tumoral em tumores sólidos, bem como o tempo necessário para fabricação e produção destas células (ALNEFAIE et al., 2022; VANDGHANOONI et al., 2022). Outra ferramenta, consiste na identificação dos receptores de células T (TCR) destes TILs e, através de ferramentas de biologia molecular, transformar células imunes do sangue periférico do paciente para receber estas células com TCR engenheirados. No entanto, as limitações encontradas nessa abordagem terapêutica consistem na necessidade de haver a ligação TCR:MHC para ativação da atividade citotóxica destas células, o que muitas vezes acaba por ser impedido em decorrência da atividade de células tumorais para não expressar ou alocar na superfície celular, moléculas dos genes *HLA* (ALNEFAIE et al., 2022; VANDGHANOONI et al., 2022). Uma terceira e última abordagem baseia-se na utilização das células CAR-Ts, que

são engenheiradas para expressar um receptor quimérico sintético com alta afinidade a uma proteína tumoral e capaz de desencadear uma cascata de eventos em linfócitos T engenheirados (ALNEFAIE et al., 2022; VANDGHANOONI et al., 2022), que podem ser ativados sem a presença de células dendríticas (VANDGHANOONI et al., 2022).

2.2. Imunoterapia de Células CAR-Ts

O ano de 2013 torna-se um marco na história da imunoterapia antitumoral devido aos resultados de ensaios clínicos com células CAR-Ts. Tais resultados apresentaram eficácia terapêutica de cerca de 90% em malignidades hematológicas como leucemias linfoblástica aguda de células B (B-ALL), crianças com ALL e linfomas agressivos não-Hodgkin (ABBOTT & USTOYEV., 2019). Tais resultados serviram como base para que em 2017 fosse aprovado, pelo FDA, a primeira CAR-T para B-ALL, tisagenlecleucel, em pacientes com até 25 anos (ABBOTT & USTOYEV., 2019). As CARs consistem em receptores artificiais construídos para interagir, de maneira específica, com uma proteína alvo alocada à superfície de células tumorais. Esses receptores sintéticos serão incorporados nos linfócitos Ts nativos dos pacientes e irão desencadear uma resposta antitumoral através do seu ligamento com seus respectivos alvos proteicos (**Figura 1**) As moléculas CAR possuem algumas diferenças dos TCRs nativos destas células, uma vez em que elas podem, de maneira eficiente, reconhecer antígenos independente da expressão de moléculas MHC (DAI et al., 2016). As moléculas do MHC são codificadas pelos genes de histocompatibilidade humana *HLA* e podem ser classificadas em duas classes: MHC-I e MHC-II (SHAFER; KELLY; HOYOS; 2022). Os receptores celulares MHC-I estão presentes em todas as células nucleadas, ao passo que o MHC-II estão presentes na superfície celular de células apresentadoras de antígeno (APCs), como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. O MHC-I se liga ao receptor de células T CD8⁺ (SUN et al., 2021) e necessita de ligação de domínios co-estimulatórios como proteínas B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) ligadas ao receptor CD28 presentes em linfócitos T para com que estes sejam ativados. No entanto, as CAR-Ts possuem esse receptor modificado, de modo com que não torna-se necessário a ligação TCR-complexo MHC:antígeno. No entanto, o fragmento scFv presente na estrutura CAR liga-se à epítomos de proteínas enoveladas presentes na superfície celular de células tumorais e é capaz de desempenhar uma cascata intracelular de ativação e proliferação destas células (SHAFER; KELLY; HOYOS; 2022). Esse reconhecimento independente da expressão de moléculas do gene *HLA* é vantajoso em decorrência de alguns tipos de tumores conseguirem realizar o escape do sistema imunológico através de mecanismos de

downregulation dessas proteínas, evitando o seu reconhecimento pelo sistema imunológico. Além do mais, as células CAR-Ts, com seus fragmentos variáveis de cadeia única (*single-chain fragmente variable*, scFv), são aptas a não somente reconhecerem epítomos proteicos, mas carboidratos e lipídeos (NAIR & WESTIN., 2020; CRUZ-RAMOS & GARCÍA-FONCILLAS., 2019).

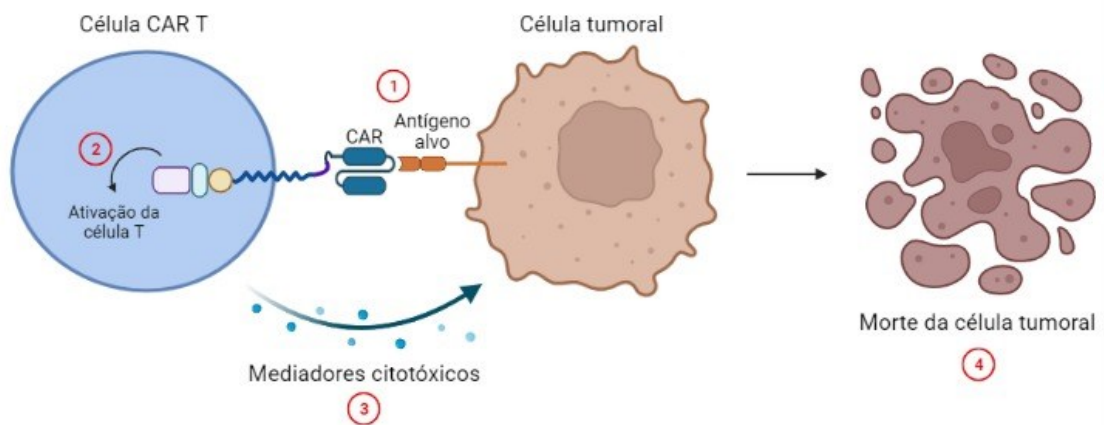


Figura 1. Mecanismo de Ação da Célula CAR-T

Legenda. Mecanismo de ação da CAR-T. (1) A CAR-T se liga ao antígeno-alvo expresso na superfície da célula tumoral através do scFv. (2) Com essa interação scFv:proteína-alvo, os dois sinais necessários para a ativação celular da CAR-T ocorrem e então ela é ativada. (3) Posteriormente, a CAR-T ativada está apta para liberar mediadores citotóxicos como granzimas e perforinas, que irão ocasionar a morte da célula tumoral (4).

Fonte: Autoria do grupo de trabalho do presente estudo, feito pelo Biorender.

2.3. Constituições Básicas

As CAR-Ts possuem algumas similaridades básicas na constituição de seu receptor quimérico. A porção extracelular, também denominada ectodomínio, é derivada de scFv de cadeias leves (VL) e pesadas (VH) de um anticorpo monoclonal contra alguma proteína de câncer (**Figura 2**) (VANDGHANOONI et al., 2022). Todos os fatores importantes na hora de construir e obter um scFv ideal ainda não são totalmente compreendidos, no entanto, é extremamente valioso realizar um processo de screening de múltiplos scFvs para obtenção de CARs com potencial uso clínico, que será escolhido após a visualização e mensuração

de scFvs que conseguiram ocasionar melhores e maiores reduções de células cancerosas para um tumor de interesse (SMITH et al., 2018). O processo de *screening* para encontrar scFv que tenham melhores resultados de ligação ao antígeno pode ser feito com a construção de diferentes cassetes gênicos para expressão da molécula CAR, onde variam os segmentos gênicos específicos para o scFv. Em seguida, transforma-se as células T com estas diferentes construções e após a obtenção de diferentes grupos de CAR-Ts, realizam-se testes *in vitro* e *in vivo*, e avaliam-se parâmetros como capacidade proliferativa destas células, atividade citotóxicas desempenhadas contra células tumorais e capacidade de liberação de citocinas (KANG et al., 2020). As sequências para o scFv podem ser oriundas de humanos ou modelos murinos (RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020), todavia, o reconhecimento da construção da CAR pelo sistema imune pode contribuir para toxicidades e, portanto, fragmentos baseados anticorpos humanizados ou humanos, ao invés de scFv baseado em modelos murinos, podem reduzir a imunogenicidade e ser vantajosos (RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020). Um estudo com pacientes com B-ALL mostrou que 80% dos pacientes que não responderam à terapia com CAR-T desenvolveram imunidade aos peptídeos murinos do scFv destas células. Em todos os pacientes que não respondiam, expansão ou persistência imediata após a infusão ou detecção de atividade antitumoral não foram observados, após a administração de uma segunda dose de CAR-T 10x maior do que a primeira (TURTLE et al., 2016).

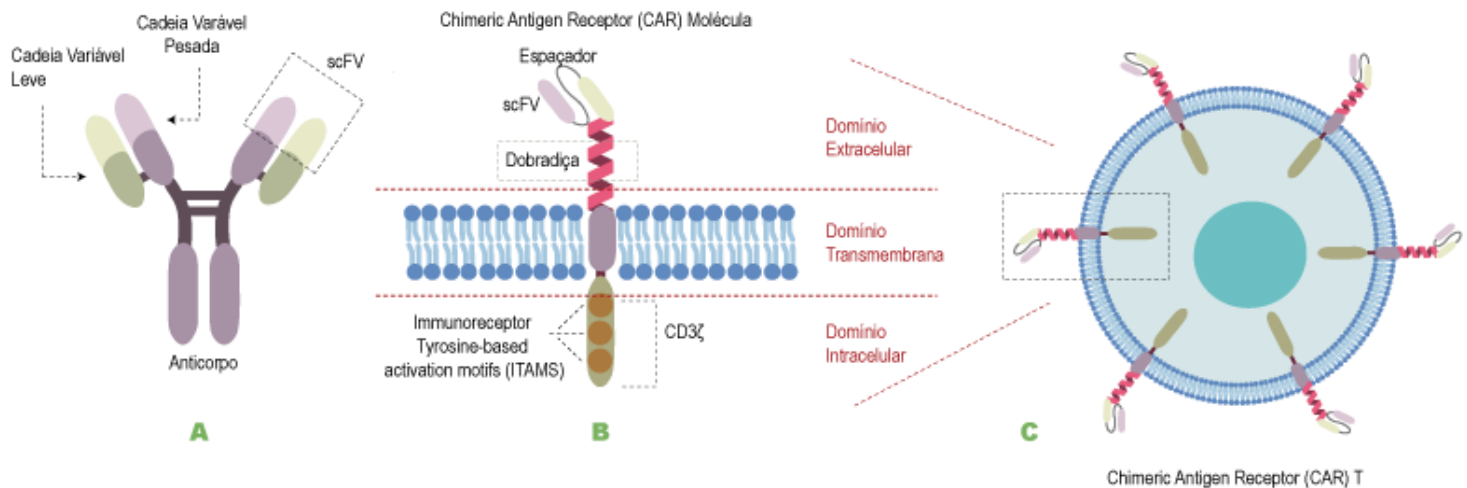


Figura 2. Estruturas da molécula CAR.

Legenda: Esquema da estrutura das células CAR-Ts. (A) Estrutura de um anticorpo, cujas estruturas diferentes, como a cadeia pesada e leve, estão sinalizadas de roxo e verde, respectivamente. As cores mais claras e escuras, de ambas cadeias, denotam a porção variável e conservada do fragmento de anticorpo, sendo a última responsável pelas funções efetoras e celulares dos anticorpos. Ligações disulfetos ligam ambas cadeias, leves e pesadas, bem como o fragmento de ligação ao antígeno (Fab) com a parte conservada do anticorpo. Entre a porção Fab, é possível distinguir o fragmento que efetivamente liga-se ao antígeno e é altamente variável, denominada cadeia única de fragmento variável (scFv). (B) Estrutura da molécula Chimeric Antigen Receptor (CAR) ancorada à membrana celular, onde o scFv pode ser observada ao topo (ectodomínio), seguido de um espaçador (colorido em rosa), domínio transmembrana responsável pelo ancoramento da construção à superfície celular, seguido de um domínio de sinalização intracelular, CD3ζ neste caso. Ademais, é possível observar o três domínios ITAMs presentes no CD3ζ, que confere grande ativação a esta estrutura. (C) Esquema representando a molécula CAR na superfície celular do linfócito T.

Fonte: Minha própria autoria.

A cadeia que liga ambos scFv, geralmente, é composta de resíduos de glicina e serina (Gly₄Ser)₃ (LARSON & MAUS., 2021; RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020), responsáveis pela flexibilidade da estrutura e polaridade exigida do meio extracelular, respectivamente, conferindo uma montagem adequada da proteína CAR para reconhecimento antigênico. No entanto, outros tipos de moléculas podem ser utilizadas (LARSON & MAUS; 2021). Em seguida há a dobradiça, comumente derivada de fragmentos IgG-, CD28, CD8a. Essa unidade, também chamada de espaçador, classificada como a porção extracelular responsável por um comprimento maior até a unidade de ligação do domínio transmembrana e está envolvida na maior ou menor atividade das células CAR-T. Uma das características dos espaçadores derivados de IgG é causar a depleção das células CAR T e, conseqüentemente, sua persistência *in vivo*, já que eles interagem com os receptores Fcγ (STERNER & STERNER., 2021; RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020). Além disso, já é bem conhecido que essa

dobradiça é essencial para permitir um espaçamento intercelular adequado para gerar uma sinapse imunológica. Também se sabe que espaçadores maiores têm flexibilidade suficiente para permitir a ligação a epítomos de membrana proximais, enquanto espaçadores menores tendem a ter maior eficácia contra epítomos de membrana distais (STERNER & STERNER., 2021).

Os domínios transmembrana consistem em um domínio alfa hélice que percorre por toda a membrana celular e são chaves tanto para a estabilidade da molécula CAR na membrana citoplasmática de linfócitos T, bem como para a estabilidade de sua expressão (ALNEFAIE et al., 2022). Geralmente são derivadas de proteínas do tipo I, como CD3 ζ , CD28, CD4 ou CD8 α (LARSON & MAUS; 2021; RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS, 2020) e precedidas pelo domínio de sinalização, CD3 ζ .

2.4. As Gerações de CAR-T estão diretamente ligadas às suas funções biológicas.

As primeiras gerações de CAR-Ts consistem na junção de um scFv de um anticorpo monoclonal a um domínio CD3 ζ que possui três motivos para *tyrosine-kinase* (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*, ITAMs) (LARSON & MAUS; 2021), enzima fosforilativa responsável pela sinalização intracelular de ativação dos linfócitos T análogo ao que ocorre, naturalmente, em um receptor TCR. No entanto, embora esta construção fosse suficiente para obter uma resposta antitumoral em testes pré-clínicos (MOHANTY et al., 2019), não era suficiente para conferir uma resposta celular adequada em termos de persistência e ativação *in vivo*, sendo necessário uma molécula co-estimulatória para auxiliar na função citotóxica, metabolismo e persistência das CAR-Ts (VANDGHANOONI et al., 2022; RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020). Domínios co-estimulatórios são proteínas auxiliares necessárias para atingir uma expansão robusta de linfócitos T, persistência e atividade antitumoral. (WEINKOVE et al., 2019). São definidas como proteínas de superfície celular que possuem capacidade de ocasionar a sinalização intracelular de modo a aumentar os sinais mediados pela ligação do TCR (WEINKOVE et al., 2019). Os domínios co-estimulatórios aumentam a proliferação celular, produção e secreção de citocinas, formação de memória e sobrevivência celular (WEINKOVE et al., 2019). Desse modo, CAR-Ts de segunda geração são conhecidas por possuírem, para além da estrutura comum da CAR, moléculas co-estimulatórias como CD28 e 4-1BB (CD137) (ALNEFAIE et al., 2022; MOHANTY et al., 2019). No entanto, outras moléculas co-estimulatórias também podem ser utilizadas como OX40, CD27 e *inducible T cell*

co-stimulator (ICOS) (HASLAUER et al., 2021; LARSON & MAUS; 2021). Todas as CAR-Ts, atualmente aprovadas pela agência estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA) (**Tabela 1**) são construções de segunda geração (LARSON & MAUS; 2021). Ademais, vale ressaltar que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou três destas CAR-Ts para uso nacional, em ordem cronológica de aprovação: KYMRIAH, CARVYKTI (para tratamento de mieloma múltiplo) e YESCARTA. No Brasil, dois centros de referência para o desenvolvimento de CAR-Ts estão sendo construídos, um localizado na cidade de Ribeirão Preto e outro em São Paulo, ambos localizados no estado de São Paulo (Para mais informações: <https://terapiacelular.butantan.gov.br/>).

Célula CAR-T	Nome Comercial	Antígeno Marcado	Domínio Coestimulatório	Tipo de Câncer	Ano de Aprovação
Axicabtagene Ciloleucel	YESCARTA	CD19	CD28	Linfoma de células B grandes de adultos	2017
Tisagenlecleucel	KYMRIAH	CD19	4-1BB (CD137)	r/r Linfoma de células B grandes	2018
Brexucabtagene Autoleucel	TECARTUS	CD19	CD28	r/r Linfoma de Células do Manto (MCL)	2020
				r/r ALL precursor de células B	
Lisocabtagene Maraleucel	BREYANZI	CD19	4-1BB (CD137)	r/r Linfoma de células B grandes	2021
Idecabtagene Vicleucel	ABECMA	BCMA	4-1BB (CD137)	r/r Mieloma Múltiplo	2021
Ciltacabtagene Autoleucel	CARVYKTI	BCMA	4-1BB (CD137)	r/r Mieloma Múltiplo	2022

Tabela 1. CAR-Ts aprovadas atualmente pelo FDA

Fonte. Food and Drug Administration (2023)

Embora não se saiba totalmente o mecanismo intracelular envolvendo os diferentes domínios co-estimulatórios, sabe-se que desempenham atividades diferentes em decorrência, também, de respostas do imunometabolismo. As CARs baseadas em domínios CD28 possuem uma resposta efetora como memória e uma ativação da via glicolítica (RAZAVI et al., 2023; LARSON & MAUS; 2021), as CARs com domínio 4-1BB (CD137) possuem um fenótipo de

memória central e se baseiam em metabolismo de ácido graxo (LARSON & MAUS; 2021), e capacidade respiratória e biogênese mitocondrial aumentadas (RAZAVI et al., 2023). Além disso, os domínios 4-1BB mostram um pico menor de expansão de células T, permitindo uma maior resistência das células T e menor toxicidade mediada por citocinas (RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS, 2020). Dessa forma, a inclusão do domínio co-estimulatório 4-1BB deve ser apropriada e menos tóxica em pacientes com uma grande carga de doença e/ou onde há uma alta densidade antigênica, enquanto o domínio CD28 deve ser utilizado para alcançar um limiar desejável de ativação de células CAR T no contexto de baixa densidade antigênica na superfície de tumores, ou um CAR com um domínio de ligação scFv de baixa afinidade em sua construção (RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS, 2020). Portanto, a escolha dos domínios co-estimulatórios são importantes para os resultados esperados em uma dada intervenção terapêutica.

Para aumentar a atividade antitumoral das CAR-Ts, foram construídas as CAR-Ts de terceira geração que possuem dois domínios co-estimulatórios (ALNEFAIE et al., 2022; LARSON & MAUS., 2021; MOHANTY et al., 2019). A quarta geração consiste em CAR-Ts com capacidade de liberar citocinas no meio extracelular, tal qual IL-12 (ALNEFAIE et al., 2022; VANDGHANOONI et al., 2022) ou possuem receptores adicionais como ligantes co-estimulatórios (LARSON & MAUS., 2021) e são referidos como TRUCKs (*T cells redirect for universal cytokine killing*). Ademais, outras citocinas podem ser secretadas em TRUCKs, como IL-2 (MOHANTY et al., 2019), IL-15, IL-18 (ALNEFAIE et al., 2022), IL-7, IL-17 e outras (VANDGHANOONI et al., 2022). Alguns dos TRUCKs potenciais consistem em CAR-Ts que podem produzir e secretar citocinas-chave como IL-12, IL-15, anticorpos monoclonais como anti PD-1 ou anti PD-L1, enzimas como heparinase que degradam os fibroblastos, que dificultam a infiltração linfocitária no microambiente tumoral (TME) ou modificadores de TME (IRVINE et al., 2022). Alguns dos estudos atuais envolvendo TRUCKs são apresentados na tabela abaixo:

Citocina	IL-36 γ	IL-18	IL-12
Efeitos no Sistema Imune	Promove a expansão e produção de citocinas pró-inflamatórias de células T	Estimula diretamente a secreção de IFN- γ	Aumenta a capacidade citotóxica das células CD8 ⁺ , mitiga a fuga do tumor por perda de antígeno, melhora a apresentação cruzada de antígenos e reprograma as células supressoras derivadas de mielóide (MDSCs)
Tipo de Câncer Investigado	Linfoma (camundongos)	Tumores Hematológicos CD19 ⁺ (camundongos)	Modelo singênico de carcinomatose peritoneal ovariana
Resultados	Aumenta a expansão e persistência das células CAR-Ts Erradicação superior do tumor em comparação com as células CAR-Ts convencionais, devido à ativação de APCs endógenas e células T por IL-36 γ Produção mais robusta de IFN γ e TNF- α após estimulação	Aumento da eficácia antitumoral através da estimulação autócrina de IL-18 e do aumento da resposta antitumoral endógena de células T	Expansão e atividade antitumoral das CAR-Ts aumentada Sobrevivência aumentada.
Referência	LI, Xinghuo et al. 2021.	AVANZI, Mauro P. et al., 2018.	YEKU, Oladapo O. et al., 2017.

Tabela 2. TRUCKs atualmente testados

Legenda. Interleucina-36 γ (IL-36 γ); Interleucina-18 (IL-18); Interleucina-12 (IL-12); Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α); Células Apresentadoras de Antígeno (APC).; Interferon- γ (IFN- γ)

As quintas gerações estão sendo desenvolvidas atualmente e se baseiam na estrutura da segunda geração (ALNEFAIE et al., 2022) somada à presença de um receptor truncado (IL-2R β) para induzir uma sinalização intracelular mediante à estimulação antigênica. Ademais, o domínio IL-2R β possui um sítio de ligação para STAT3, e essas CAR-Ts apresentam um sítio de ativação dependente da via JAK-STAT3 (KAGOYA et al., 2018).

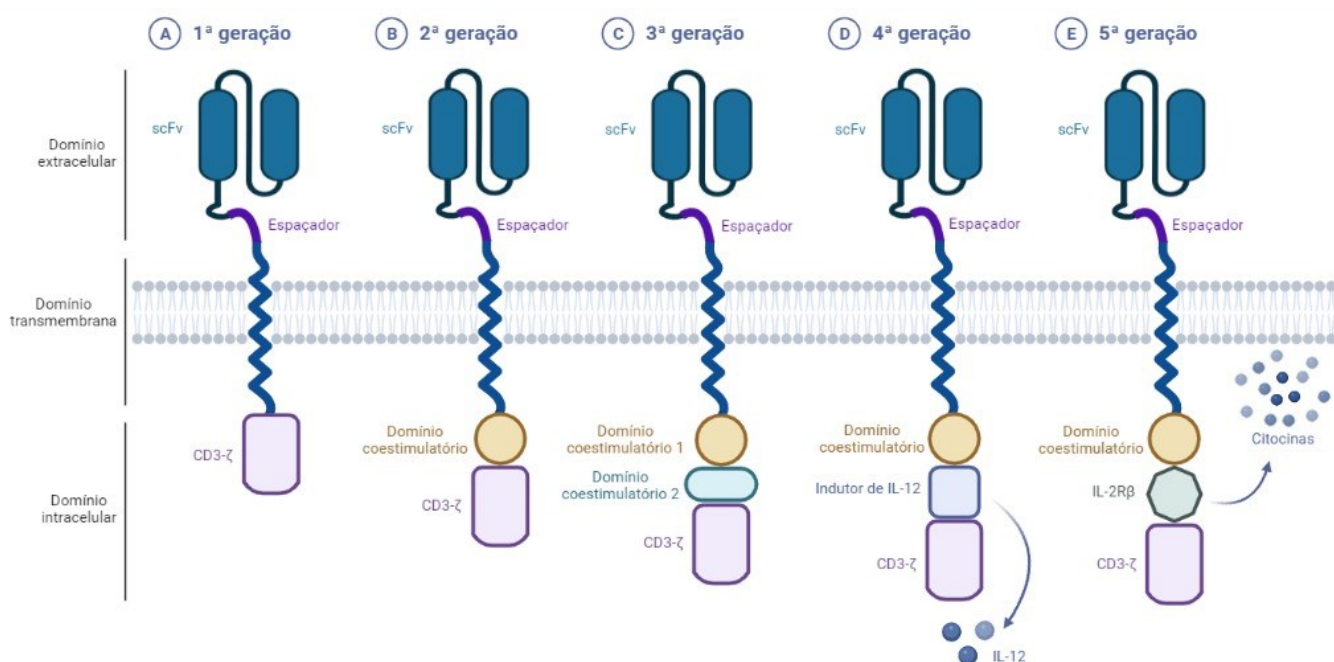


Figura 3. Gerações de Células CAR-Ts

Legenda: Esquemática das diferentes gerações de CAR-Ts. Da esquerda para a direita, 1-5.

Fonte: Autoria do grupo de trabalho do presente estudo, feito no Biorender (2023).

2.5. Obtenção e Produção das Células CAR-Ts.

O processo de produção das células CAR-Ts consiste no isolamento das células T de um doador (alógeno) ou do paciente (autólogo), obtido pela coleta do sangue periférico (PB) dos indivíduos, e separados através de um processo conhecido como leucaferese. Após isso os linfócitos Ts são isolados usando-se anticorpos contendo esferas metálicas. Em seguida, as células isoladas são então cultivadas e ativadas por APCs autólogas ou alogênicas ou com anticorpos monoclonais anti-CD3 ou anti-CD28; uma mistura de ambos com citocinas também pode ser efetuada (ALNEFAIE et al, 2021). IL-12 é a citocina comumente utilizada para obtenção de um rápido aumento celular (ALNEFAIE et al., 2021). Estudos recentes reportaram que um coquetel de citocinas como IL-2, IL-7 e IL-15 foram capazes de induzir uma expansão melhor de células CAR-Ts CD4⁺ e CD8⁺ (ALNEFAIE et al., 2021; COPPOLA et al., 2020). O próximo passo consiste na transdução dessas células com o cassete gênico para expressão da molécula CAR por métodos virais e não virais. Vetores virais são comumente empregados como vetores de transdução devido a sua capacidade de obtenção de grandes números de células T transduzidas em pouco tempo e sua alta competência de transferência (ALNEFAIE et al., 2021). Esses vetores virais incluem retrovírus, lentivírus, adenovírus e vírus adenoassociado.

As limitações da utilização de agentes virais consistem na possibilidade de tumorigênese e toxicidades ocasionadas pela mutação insercional feita por esses agentes. Para evitar as limitações oriundas desta técnica de transdução e facilitar a entrega do material genético dentro dos linfócitos de maneira segura e precisa, outros métodos de transfecção não viral foram desenvolvidos e apresentaram-se viáveis para produção de CAR-Ts, como os baseados em transposons, *sleeping beauty* (SB), o sistema mais utilizado para substituição dos vetores virais (ALNEFAIE et al., 2021). Outra técnica como eletroporação de RNAm codificante para a molécula CAR também é possível.

No processo de obtenção das células CAR-Ts, o próximo passo consiste na expansão celular através de biorreatores. Em seguida, quando as células atingem o volume adequado para finalidade terapêutica, as células são re-infundidas no paciente. O processo de re-infusão somente ocorre quando os testes para verificar possíveis contaminações oriundas de algum processo de produção dessas CAR-Ts, como detecção de bactérias, fungos, micoplasmas ou presença de endotoxinas (RAMOS et al., 2021) são negativos. As infusões normalmente ocorrem após 48-96h do tratamento quimioterápico para linfodepleção, como uma forma de garantir a expansão, por homeostase, das CAR-Ts. Em seguida, o paciente é monitorado para averiguar se há o surgimento de algum efeito adverso decorrente da imunoterapia. Ao todo, o processo leva cerca de 3 semanas, sendo o de preparação celular o mais demorado (ALNEFAIE et al., 2021).

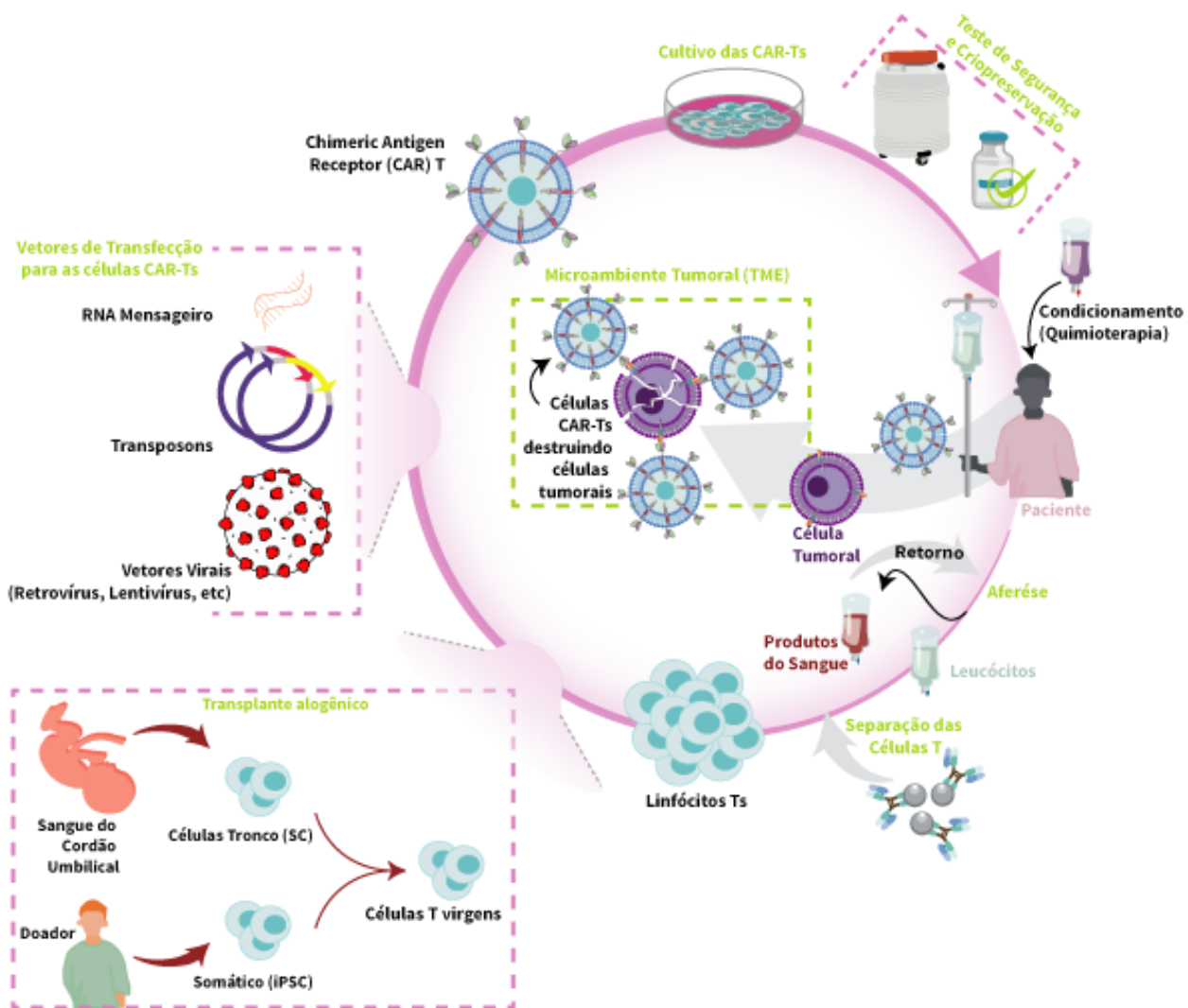


Figura 4. Processo de Obtenção, Produção e Expansão das CAR-Ts

Legenda: Representação do processo de construção das células CAR-T. O passo inicial, como sendo um transplante autólogo, pode ser observado e envolve a remoção de uma amostra do sangue do paciente para obtenção dos leucócitos. Este processo é procedido pela aferese, que separa os componentes do sangue em leucócitos e outros produtos sanguíneos, como eritrócitos. Dentre os leucócitos, um subtipo celular é desejado, como os linfócitos T e, portanto, é realizada a separação dessas células com outras células do sistema imune. Nessa etapa, anticorpos que se ligam estritamente aos linfócitos T são utilizados; acoplados a uma esfera metálica e, sob influência magnética, é possível separar as células desejadas. No entanto, há outros métodos para obtenção de células CAR-Ts, como representado no quadrante “Transplante Alogênico” onde linfócitos T podem ser obtidos do cordão umbilical de recém-nascidos, de doadores saudáveis ou até mesmo através da indução de iPSCs e subsequente diferenciação em linfócitos T. Uma vez que há a separação desse subtipo celular, seja por meio autólogo ou alogênico, a próxima etapa consiste na transfecção ou transdução dessas células, seja por vetor viral ou não-viral. Dentre as transfecções virais, retrovírus ou lentivírus são comumente empregados, enquanto na transdução não-viral, plasmídeos contendo o gene CAR e transposonsases ou RNAs mensageiros são utilizados. Após a transfecção destas células com o constructo desejado, elas são cultivadas para produzir largas quantidades celulares, podendo ser utilizados biorreatores. No processo final, estas células são armazenadas em nitrogênio líquido, caso necessário, e são submetidas a testes de segurança para observar possíveis contaminações microbiológicas durante o processo de obtenção, fabricação e produção destas células. Caso o produto esteja em condições adequadas para administração, o paciente passa por um processo de condicionamento para ocasionar

uma depleção linfocitária transitória e, então, são administradas as CAR-Ts, que irão atingir o microambiente tumoral e desempenhar atividade antitumoral.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

2.6. Limitações das CAR-Ts

2.6.1. Desafio de Tumores Sólidos

Desde a sua aprovação pelo FDA, essas CAR-Ts têm obtido resultados bastante promissores e eficientes em diversos tipos de tumores hematológicos, incluindo os mais avançados como leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) e linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), com construção anti-CD19, e múltiplo mieloma (MM) com construções anti BCMA (antígeno de maturação de células B, BCMA) (HUANG; HUANG; HUANG et al., 2022). Apesar do sucesso no tratamento de tumores hematológicos, tumores sólidos apresentam uma realidade bastante diferente, devido a algumas características:

1. Efeito *on-target/off-tumor*: desencadeado pela ligação do scFv das células CAR T contra proteínas de células saudáveis, levando à toxicidade e sendo um fator limitante resultante desta imunoterapia.
2. Heterogeneidade do antígeno tumoral observada no ambiente tumoral, com especial ênfase nas colônias negativas que se tornarão a principal população através de seleção artificial ocasionada pela pressão do tratamento.
3. O microambiente tumoral altamente imunossupressor (TME) devido à presença de citocinas-chave para a ineficiência da atividade das células T, como TGF- β , IL-10, proteína de ligação à morte celular programada 1 (PD-L1), presença de células com capacidade imunossupressora, como células T_{HELP}, Macrófagos Associados a Tumores (TAMs), Células Supressoras Derivadas de Mieloide (MDSCs) (YOU et al., 2016). Além disso, existe a possibilidade de que as células T modificadas com CAR produzam e secretam moléculas de quimiocinas para ajudar outros tipos de células imunes a trafegar para o tumor.

O tráfego de células imunológicas é impedido por diversos fatores típicos de tumores sólidos. Enquanto em neoplasias hematológicas, os encontros entre células tumorais e CAR T administradas por via intravenosa (IV) são facilitados por estarem no mesmo compartimento do sangue periférico (PB), tumores sólidos são difíceis de infiltrar. Por exemplo, o extravasamento de células imunológicas é limitado pela regulação negativa de moléculas de adesão específicas, como ICAM-1 e VCAM-1, pelas células endoteliais do tumor. Uma das

maiores barreiras que inibem a infiltração de células CAR T no tumor é a barreira física formada pelo proteoglicano de heparan sulfato (HSPG) (ALNEFAIE et al., 2022). Além disso, células CAR T que produzem e secretam heparinase no meio extracelular têm demonstrado maiores taxas de infiltração e eliminação de tumor (CARUANA et al., 2015).

Muitos tumores sólidos são invariavelmente menos oxigenados do que os tecidos normais, o que favorece a resistência à radioterapia e quimioterapia anticâncer, bem como a predisposição a metástases tumorais aumentadas (YOU et al., 2016; DHANI et al., 2015). Estudos tem sugerido que a hipóxia tumoral pode afetar a atividade do CAR T nas células tumorais, e novas estratégias que normalizem o suprimento de sangue para o tumor antes da injeção de células CAR T poderiam solucionar esse problema (YOU et al., 2016). Além disso, tumores sólidos têm a capacidade de apresentar uma taxa metabólica anormal, consumindo excessivamente alguns aminoácidos essenciais para a atividade das células T. Isso, combinado com a hipóxia e acidificação da matriz extracelular, torna difícil a sobrevivência das células T, afetando a atividade antitumoral. Portanto, a modulação do TME pode ser uma ferramenta promissora para aumentar a atividade das células CAR T e melhorar os resultados (FENG et al., 2017).

2.6.2. Toxicidades

Normalmente, os pacientes são submetidos à quimioterapia antes do tratamento com CAR-Ts, o que produz toxicidades classificadas como não-específicas e possuem capacidade de atingir múltiplos órgãos (SANTOMASSO et al., 2019). A terapia com células CAR-Ts produz toxicidades que podem estar associadas com a proliferação, depleção e exaustão destas células (SANTOMASSO et al., 2019), e podem ser divididas em dois grupos distintos, onde 1) toxicidades gerais ocorrem pela super ativação de células T, levando a altos níveis de liberação de citocinas sistêmicas; e 2) os efeitos *on-target off-tumor* que consistem na ativação das células CAR-Ts por células não-malignas que expressam o antígeno (RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020). As toxicidades inflamatórias comumente relacionadas às CAR-Ts são mediadas pela síndrome de liberação de citocinas (CRS) (HANSEN; DAM; FARAMAND., 2021; SANTOMASSO et al., 2019) e aparecem poucos dias após a infusão de células CAR-Ts (SINGH & MCGUIRK; 2020; (YÁÑEZ; SÁNCHEZ-ESCAMILLA; PERALES., 2019).

A Síndrome da Liberação de Citocinas (CRS) é a toxicidade mais comum e potencialmente fatal observada após a infusão de células CAR-T (GRAHAM et al., 2018) e

toxicidade severas podem limitar o uso dessas células (BRUDNO; KOCHENDERFER, 2019). Os sintomas da CRS incluem febre, hipotensão, hipóxia, taquicardia sinusal, função cardíaca deprimida, disfunção de órgãos, mal-estar, fadiga, mialgia, náusea, anorexia, vazamento capilar, falência hepática, coagulação intravascular disseminada, síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS) e até mesmo morte (RUBIN; VAITKEVICIUS, 2021; RUBIN et al., 2019; BRUDNO; KOCHENDERFER, 2019; GRAHAM et al., 2018; LEICK; MAUS, 2018; BONIFANT et al., 2016). Estes sintomas podem afetar diferentes órgãos, como os componentes do sistema cardiovascular, respiratório, hepático, renal, hematológico e nervoso (NEELAPU et al., 2019), e podem ocorrer em decorrência de uma intensa atividade pró-inflamatória desencadeada pelas citocinas liberadas em CAR-Ts ativas (RUBIN et al., 2019) e outras células do sistema imune (BRUDNO; KOCHENDERFER, 2019), como os macrófagos ativados quando estes recebem um sinal exagerado para produzir citocinas (GRAHAM et al., 2018). Por exemplo, a adição de domínios co-estimulatórios como CD28 ou 4-1BB às moléculas CAR, podem aumentar a resposta antitumoral destas células, no entanto, mesmo que CAR-Ts contendo domínios CD28 se expandam mais rapidamente do que CAR-Ts contendo 4-1BB, elas também possuem grandes chances de aumentar a toxicidade (SANTOMASSO et al., 2019; BONIFANT et al., 2016). As proteínas e citocinas chaves relacionadas à CRS incluem: proteína reativa C (CRP), ferritina, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- γ (BRUDNO; KOCHENDERFER, 2019; SANTOMASSO et al., 2019; LEICK; MAUS, 2018). Disfunção de órgãos podem ser reversíveis e evitados em pacientes cuja toxicidade é observada e manejada precocemente, e a gravidade da CRS é diretamente correlacionada com as citocinas presentes no soro do paciente (ALNEFAIE et al., 2022). Devido ao custo elevado de técnicas que visem o monitoramento de citocinas em tempo real, o perfil de citocinas presentes no paciente usualmente não é monitorado (BONIFANT et al., 2016).

As toxicidades observadas são, geralmente, reversíveis e auto-limitadas, no entanto, casos severos necessitam de cuidados intensos e, ocasionalmente, administração de agentes imunossupressores (BRUDNO; KOCHENDERFER, 2019). Uma variedade de terapias está sendo estudadas para atenuar os sintomas inflamatórias sem interferir na atividade antitumoral desempenhada pelas células CAR-Ts. Moléculas com efeitos sistêmicos de corticosteroides tem sido utilizada para amenizar os efeitos adversos ocasionados pela CRS, todavia, altas doses e uso prolongado podem afetar a atividade antitumoral das CAR-Ts (BONIFANT et al., 2016). Dessa forma, algumas moléculas com capacidade de inibir a ação das citocinas pró-inflamatórias, liberadas pelas CAR-Ts ativas, têm sido utilizadas com o intuito de manejo

dessas toxicidades, como a administração do anticorpo tocilizumab, que bloqueia o receptor de interleucina-6 (IL6R), interrompendo essa via de ativação (SINGH & MCGUIRK; 2020; RUBIN et al., 2019) ou corticoesteróides (STERNER & STERNER., 2021; RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020) e inibidores de IL-6 como siltuximab (RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020) são utilizados na clínica.

As neurotoxicidades são a segunda maior causa de toxicidades relacionadas à administração e ativação de CAR-Ts (HANSEN; DAM; FARAMAND., 2021; SANTOMASSO et al., 2019). O início dos sintomas neurotóxicos ocorrem entre os dias 5-6 após a infusão das CAR-Ts e sintomas neurológicos acometidos previamente, indicam a possibilidade de um curso clínico severo de toxicidade (RUBIN; VAITKEVICIUS, 2021). Algumas neurotoxicidades incluem delírio, encefalopatia, afasia, letargia, tremor, confusão, tontura, disfunção motora, ataxia, distúrbio do sono, mioclonia, dificuldade de concentração, distúrbio de linguagem, fraqueza e a depressão do nível de consciência compõe a síndrome de neurotoxicidade associada às células efetoras imunes (ICANS) observadas em alguns pacientes após a terapia com CAR-Ts (FABRIZIO & CURRAN, 2021; Lee et al., 2019; SANTOMASSO et al., 2019). ICANS é determinado pela disrupção da barreira hematoencefálica (BBB) e níveis de citocinas aumentados no líquido cefalorraquidiano (CSF), ocorrendo simultaneamente à CRS ou após (RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020). A neurotoxicidade oriunda da administração de células CAR-Ts é relativamente comum, sendo observada em 23-67% dos pacientes que recebem este tratamento para linfoma e 40-62% para leucemias (SANTOMASSO et al., 2019), e o uso de bloqueadores de IL-6 não ameniza os efeitos neurotóxicos em muitos pacientes (YÁÑEZ; SÁNCHEZ-ESCAMILLA; PERALES., 2019). Além disso, sintomas como convulsões, afasia, dores de cabeça, alucinações e até mesmo edema cerebral podem estar correlacionados à produção de IL-15, IL-6, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IFN- γ , IL-12, IL-8 e outros que não são específicos para ICANS e também são encontrados em CRS (HAN; DAM; FARAMAND., 2021; SANTOMASSO et al., 2019). Embora o ICANS seja menos elucidado do que o CRS, ambos estão relacionados a um pico mais alto das células desenvolvidas *in vivo* (SANTOMASSO et al., 2019). A síndrome de encefalopatia (CRES) também pode ser observada durante a administração de células CAR-T e os pacientes podem experimentar disfasia e desorientação, provavelmente devido à presença de células CAR T no líquido cefalorraquidiano (CSF) (GRAHAM et al., 2018).

A neurotoxicidade dos pacientes que recebem CAR-Ts e seus sintomas dependem de alguns fatores como: o antígeno marcado, os domínios coestimulatórios usados na construção

da CAR, a dose da CAR-T, regime de quimioterapia preparatória para o condicionamento, o tipo de tumor selecionado para tratamento e terapias anteriores (RUBIN; VAITKEVICIUS, 2021). O anticorpo, tocilizumab, aprovado pelo FDA para tratar CRS severo pode aumentar o risco por subseqüentes neurotoxicidades (RUBIN; VAITKEVICIUS, 2021; GRAHAM et al., 2018; LEICK; MAUS, 2018), no entanto, é a droga de primeira escolha para tratamento de CRS (LEICK; MAUS, 2018). Ademais, este anticorpo monoclonal tem a capacidade de reverter o quadro de CRS sem diminuir a atividade antitumoral desempenhada pelas CAR-Ts, bem como sua proliferação e persistência (FABRIZIO & CURRAN, 2021). Pacientes que não respondem ao tratamento com tocilizumab devem ser conduzidos a um tratamento curto com corticosteróides, e pacientes com CRS severo devem ser monitorados em uma unidade de cuidado intensivo (ICU) (GRAHAM et al., 2018).

Outra toxicidade comum é mediada pela síndrome linfocitocitária hemofagocítica (HLH) / síndrome de ativação macrofágica (MAS) e causa sintomas muito similares à CRS, incluindo febre, hipofibrinogenemia e elevado níveis de IL-2R (CD25). No entanto, HLH/MAS não respondem ao tratamento com inibição da IL-6, como observado nas toxicidades por CRS (LEICK; MAUS, 2018) e devem requerer quimioterapia (STERNER & STERNER., 2021; RAFIQ; HACKETT; BRENTJENS., 2020). Embora a incidência de HLH/MAS não esteja tão elucidada na terapia com CAR-T, devido à sobreposição com alta grau de CRS, esta tem sido observada em 1% dos pacientes submetidos à terapia celular de CAR-Ts (STERNER & STERNER., 2021). Adicionalmente, síndrome da lise tumoral (TLS) é um outro tipo de toxicidade, onde a destruição de uma quantidade massiva de células tumorais libera substâncias intracelulares e causa distúrbios metabólicos como hiperuricemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia e acidose metabólica, induzindo insuficiência renal aguda e inclusive morte (MOGHANLOO et al., 2021)

2.6.3. Escape Tumoral

O escape do antígeno das células CAR T também é responsável por causar disfunção nessas células CAR T (HEARD., 2022). Em pacientes com leucemia linfoblástica aguda recidivante ou refratária, 30-70% apresentam mecanismos de resistência às células CAR T, causados pela perda ou regulação para baixo do CD19 (STERNER & STERNER., 2021). Heard (2022) demonstrou que o processo de resistência do tumor às células CAR T pode ser causado por mudanças na expressão do gene *SPPL3*. *SPPL3* codifica uma protease responsável pela

clivagem de enzimas de glicosiltransferase, cuja função consiste em mudanças pós-traducionais no Golgi. A ausência do gene *SPPL3* nas linhas de células com deleção CRISPR/CAS9 mostrou hiperglicosilação, enquanto a superexpressão desse gene revelou uma capacidade mais baixa de alocação dessa proteína na superfície celular, resultando em perda de antígeno. Os resultados corroboram possíveis resistências tumorais à imunoterapia, pois a modificação da glicosilação do epítipo CD19 afeta seu reconhecimento e ativação das células CAR T. Além disso, as culturas celulares do câncer foram submetidas a exo e endo-glicosilases para entender o tipo de ligação glicosídica e sua origem, e a que mostrou a maior redução do peso molecular do CD19 foi a endonuclease PNG no Golgi, o local de ação do *SPPL3* (HEARD, 2022). CD19 apresenta 7 resíduos de asparagina em sua porção extracelular, dos quais 5 são glicosilados em condições normais. Para provar que o padrão de glicosilação na proteína alvo das células CAR T é importante para obter o efeito citotóxico esperado, outro receptor de células B foi analisado, cujas construções de células CAR T também são feitas. O CD22 é uma proteína de superfície celular igual ao CD19, mas não mostrou que seu padrão de peso de glicosilação é afetado pela deleção do gene *SPPL3*. Além disso, os efeitos citotóxicos realizados por células CAR T anti-CD22 não foram afetados em células de controle ou deleção de *SPPL3*, confirmando que a perda do *SPPL3* não confere resistência ao CAR T anti-CD22 (HEARD, 2022). Para superar esse mecanismo de resistência, algumas terapias têm sido estudadas, como construções de células biCAR T ou CAR T tandem que são duas scFvs de marcação múltipla presentes na construção CAR (Da via et al., 2021; STERNER & STERNER, 2021), como CD19 e CD20 ou CD19 e CD22 (STERNER & STERNER, 2021).

2.7. Os Testes Clínicos Atuais para CAR-Ts

Muitos *Clinical Trials* têm sido desenvolvidos e avaliados clinicamente para eficácia e segurança no tratamento de tumores hematológicos e sólidos. Aqui serão apresentados os 39 testes clínicos atuais (**Tabela 3**) desenvolvidos que estão em processo de recrutamento, completos ou finalizados e disponíveis no *clinicaltrials.gov*.

Tipo de Câncer	Condição	Inscrição	Status	Proteína-Alvo	Fase	Vetor	NCT
Sólido	Câncer de Pulmão Avançado	1	Encerrado	PD-L1	Fase I	Lentivírus	(NCT03330834)
Sólido	Glioblastoma Gliossarcoma	3	Encerrado	EGFRvIII	Fase I	Retrovírus	(NCT02664363)
Hematológico	Leucemia mielóide aguda Mieloma múltiplo	8	Encerrado	CD44v6	Fase I	Retrovírus	(NCT04097301)
Hematológico	Leucemia linfoblástica aguda (B-ALL) Leucemia Linfoblástica Aguda Recorrente na Infância Leucemia Linfoblástica Aguda Refratária na Infância Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B	23	Concluído		Fase I	Retrovírus	(NCT03289455)
Hematológico	Mieloma múltiplo	12	Encerrado	BCMA/TAC1	Fase I	Retrovírus	(NCT03287804)
Hematológico	Mieloma de células plasmáticas recorrente Mieloma de células plasmáticas refratário	28	Concluído	BCMA	Fase I	-	(NCT03338972)
Hematológico	Leucemia Linfoblástica Aguda	82	Encerrado	CD19	Fase II	Retrovírus	(NCT02535364)
Hematológico	Linfoma de células B Linfoma não-Hodgkin Leucemia linfocítica crônica Leucemia linfocítica crônica de células B	2	Encerrado	CD19/CD20	Fase I	Retrovírus	(NCT04160195)
Hematológico	Linfoma de células grandes anaplásico Linfoma de células T associado a enteropatia Linfoma difuso de células B grandes Linfoma NK-T extranodal Linfoma periférico de células T	26	Concluído	CD30	Fase I	Lentivírus	(NCT03049449)
Hematológico	Recidivante/Refratário Mieloma Múltiplo	17	Encerrado	BCMA	Fase I	Lentivírus	(NCT03318861)
Hematológico	ALL (Leucemia Linfoblástica Aguda) Linfoma/Leucemia de Células B Linfoma de Grandes Células	53	Concluído	CD19	Fase I	Retrovírus	(NCT01593696)

Tipo de Câncer	Condição	Inscrição	Status	Proteína-Alvo	Fase	Vetor	NCT
	Linfoma não-Hodgkin						
Hematológico	Linfoma B de células mediastinais primário Linfoma difuso de grandes células B Linfoma de grandes células B transformado a partir de linfoma folicular Linfoma do manto	43	Concluído	CD19	Fase I / Fase II	Retrovírus	(NCT00924326)
Sólido	Câncer de colo do útero Câncer de pâncreas Câncer de ovário Mesotelioma Câncer de pulmão	15	Encerrado	MSLN	Fase I / Fase II	Retrovírus	(NCT01583686)
Sólido	Maligno glioma Glioblastoma Câncer cerebral Gliossarcoma	18	Concluído	VEGFR2	Fase I	Retrovírus	(NCT01454596)
Sólido	Câncer Metastático Melanoma Metastático Câncer Renal	24	Encerrado	EGFRvIII	Fase I / Fase II	Retrovírus	(NCT01218867)
Hematológico	Leucemia Linfocítica Crônica Recidivada/Refratária e Linfoma Linfocítico Pequeno Recidivado/Refratário	16	Encerrado	CD19	Fase I	Retrovírus	(NCT03624036)
Hematológico	Linfoma de células do manto recidivado/refratário	105	Ativo, não recrutando	CD19	Fase II	Retrovírus	(NCT02601313)
Hematológico	Pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B, recidivante ou refratária, sem opções de tratamento curativo disponíveis.	42	Concluído	CD19	Fase II	Lentivírus	(NCT02030847)
Ambos	Neoplasia Hematopoiética e Linfóide Neoplasma Sólido Maligno Carcinoma de Pulmão Não Pequenas Células Metastático Carcinoma de Mama Triplo-Negativo Metastático Leucemia Linfoblástica Aguda Recorrente	21	Encerrado	ROR1	Fase I	Lentivírus	(NCT02706392)

Tipo de Câncer	Condição	Inscrição	Status	Proteína-Alvo	Fase	Vetor	NCT
	Linfoma de Células do Manto Recorrente Leucemia Linfocítica Crônica Refratária Câncer de Pulmão Não Pequenas Células Estágio III AJCC v7 Câncer de Pulmão Não Pequenas Células Estágio IIIA AJCC v7 Câncer de Pulmão Não Pequenas Células Estágio IIIB AJCC v7						
Hematológico	Linfoma de células B	42	Ativo, não recrutando	CD19	Fase II	Retrovírus	(NCT03761056)
Hematológico	Leucemia linfoblástica aguda de precursores B recidivante/refratária	125	Ativo, não recrutando	CD19	Fase I	Retrovírus	(NCT02614066)
Hematológico	Linfoma de células B Linfoma não-Hodgkin	27	Ativo, não recrutando	CD19	Fase I	Lentivírus	(NCT02659943)
Hematológico	Linfoma não Hodgkin Linfoma de células B Leucemia linfocítica crônica Linfoma linfocítico de células pequenas	26	Concluído	CD19/CD20	Fase I	Lentivírus	(NCT03019055)
Hematológico	Células neoplásicas CD19-positivas presentes Leucemia linfoblástica aguda recorrente em adultos Leucemia linfocítica crônica recorrente Linfoma difuso de grandes células B recorrente Linfoma de células do manto recorrente Linfoma não Hodgkin recorrente Linfoma linfocítico pequeno recorrente Leucemia linfoblástica aguda refratária Leucemia linfocítica crônica refratária Linfoma difuso de grandes células B refratário	204	Concluído	CD19	Fase I	Lentivírus	(NCT01865617)
Hematológico	Mieloma-Múltiplo Mieloma de Células Plasmáticas	13	Concluído	CD19	Fase I	Retrovírus	(NCT03958656)

Tipo de Câncer	Condição	Inscrição	Status	Proteína-Alvo	Fase	Vetor	NCT
Hematológico	Recaída do Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL) Linfoma Folicular Transformado (TFL) Linfoma de Células B Primário do Mediastino (PMBCL) Linfoma de Células B de Alto Grau (HGBCL)	307	Ativo, não recrutando	CD37 (SLAMF7)	Fase I	Retrovírus	(NCT02348216)
Hematológico	Leucemia Linfoblástica Aguda	1	Encerrado	CD19	Fase II	Lentivírus	(NCT02935543)
Hematológico	Mieloma-Múltiplo Mieloma de Células Plasmáticas	30	Concluído	BCMA	Fase I	Retrovírus	(NCT02215967)
Hematológico	Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Recorrente Linfoma Difuso de Grandes Células B Recorrente Linfoma B de Células Grandes Mediastínico Primário (Tímico) Linfoma Difuso de Grandes Células B Refratário Linfoma B de Células Grandes de Alto Grau Refratário com Rearranjos MYC, BCL2 e BCL6 Linfoma B de Células Grandes Mediastínico Primário (Tímico) Refratário	30	Encerrado	CD19	Fase I	Lentivírus	(NCT02706405)
Hematológico	Linfoma Difuso de Grandes Células B Refratário	37	Ativo, não recrutando	CD19	Fase I	Retrovírus	(NCT02926833)
Sólido	Neuroblastoma recidivante ou refratário	17	Concluído	1RG	Fase I	Retrovírus	(NCT02761915)
Hematológico	Linfoma Linfoma não-Hodgkin Linfoma de células B Linfoma difuso de grandes células B	74	Concluído	CD19	Fase II	Lentivírus	(NCT03483103)
Hematológico	Linfoma Folicular	98	Ativo, não recrutando	CD19	Fase II	Lentivírus	(NCT03568461)
Sólido	Neuroblastoma	5	Concluído	GD2	Fase I	Retrovírus	(NCT01460901)
Hematológico	Recurrente Linfoma Folicular de Grau 1 Recurrente Linfoma Folicular de Grau 2 Recurrente Linfoma Folicular de Grau 3 Recurrente Linfoma de Células do Manto	8	Ativo, não recrutando	CD19	Fase I / Fase II	Lentivírus	(NCT01318317)

Tipo de Câncer	Condição	Inscrição	Status	Proteína-Alvo	Fase	Vetor	NCT
	Recurrente Linfoma Não-Hodgkin						
Hematológico	Adultos que tiveram recaída ou que são refratários à Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) ou ao Linfoma Linfocítico Pequeno (LLP) em 3ª linha	42	Concluído	CD19	Fase II	Lentivírus	(NCT01747486)
Hematológico	Mieloma Múltiplo	6	Encerrado	CD19	Fase II	Lentivírus	(NCT02794246)
Hematológico	Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL)	5	Encerrado	CD19	Fase II	Lentivírus	(NCT04225676)
Hematológico	Patients com Linfoma não Hodgkin (NHL), com linfomas de células B CD19+	63	Concluído	CD19	Fase II	Lentivírus	(NCT02030834)

Tabela 3. Clinical Trials para CAR-Ts desenvolvidas atualmente

Legenda. Ativo, não recrutando: O estudo está em andamento, e os participantes estão recebendo uma intervenção ou sendo examinados, mas não estão sendo atualmente recrutados ou inscritos novos participantes. **Encerrado:** O estudo foi interrompido precocemente e não será retomado. Os participantes não estão mais sendo examinados ou tratados. **Concluído:** O estudo terminou normalmente, e os participantes não estão mais sendo examinados ou tratados.

Fonte: Dados retirados do *clinicaltrials.gov* (2023)

Nas tabelas abaixo, pode-se observar que a maior parte dos testes realizados consistem em CAR-Ts para tratamento de cânceres hematológicos CD19⁺ (21; 53,85%) (A), seguido de BCMA⁺ (3; 7,69%). Para produção das CAR-Ts foram usados vetores virais (B), sendo o mais comum: Retrovírus (21; 55,26%) seguido do Lentivírus (17; 44,74%). Além disso, 31 (79,49%) das CAR-Ts são para tumores hematológicos, 7 (17,95%) são para tumores sólidos e 1 (2,56%) (C) é utilizado para tratar ambos tipos de tumores, neste caso selecionando um alvo comum ROR1.

A			B		
Proteína-alvo	Quantidade	%	Vetor Usado	Quantidade	Percentual
PD-L1	1	2,56%	Lentivírus	17	44,74%
EGFRvIII	1	2,56%	Retrovírus	21	55,26%
CD44v6	1	2,56%	Não Informado	1	-
CD19/CD22	1	2,56%			
BCMA/TAC1	1	2,56%			
BCMA	3	7,69%			
CD19	21	53,85%			
CD19/CD20	2	5,13%			
CD30	1	2,56%			
MSLN	1	2,56%			
VEGFR2	1	2,56%			
(EGFRv)III	1	2,56%			
ROR1	1	2,56%			
CD37 (SLAMF7)	1	2,56%			
1RG	1	2,56%			
GD2	1	2,56%			

C		
Tipo de Tumor	Quantidade	Percentual
Sólido	7	17,95%
Hematológico	31	79,49%
Ambos	1	2,56%

Tabela 4. Alvos e vetores utilizados em CARTs e tipos de tumores.

Legenda: A. Tabela contendo os alvos marcados pelas CAR-Ts, a quantidades de estudos clínicos sendo desenvolvido para cada um deles e seu respectivo percentual. B. Os vetores de transdução usados para a fabricação de cada CAR-T, sua quantidade e seu respectivo percentual. C. Os tipos de tumores hematológicos combatidos por cada uma das construções das CAR-Ts, suas quantidades e seus respectivos percentuais.

Fonte: *clinicaltrials.gov* (2023)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar na literatura bibliográfica os benefícios e os desafios relacionados à utilização clínica da imunoterapia de células T *Chimeric Antigen Receptor* (CAR T) em tumores sólidos e líquidos entre os anos 2015 a 2021.

3.2. Objetivo Específico

- Leitura de artigos publicados entre os anos de 2015 a 2021, que abordem a utilização de células CAR T em pacientes que desenvolveram tumores sólidos ou líquidos.
- Tabelar resultados encontrados no estudo
- Analisar os tipos de tumor, construção da CAR-T, antígeno tumoral marcado, efeitos tóxicos/adversos observados.
- Utilizar ferramenta PRISMA para auxiliar na escrita do presente trabalho e de futura publicação como artigo de revisão sistemática.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A elaboração da pesquisa para esta revisão foi conduzida através das seguintes palavras-chaves: “*CAR T cells*” AND “*Immunotherapy*” e “*CAR T cells*” AND “*Solid tumor*” nas plataformas Web Of Science, Pubmed e o banco de dados da CAPES (Coordenação Brasileira e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Os critérios de inclusão foram: artigos com testes clínicos publicados entre os anos 2015 a 2021 (6 anos) que usavam CAR-Ts para o tratamento de tumores sólidos ou líquidos. A margem de 6 anos na coleta dos artigos foi proposta a fim de se obter um panorama geral dos avanços obtidos nas CAR-Ts no tratamento oncológico recentes, sendo 2021 o ano em que a coleta dos artigos foi realizada pelos autores nos bancos de dados. Os critérios de não-inclusão foram artigos de revisão ou artigos de pesquisas pré-clínicas. Embora a palavra-chave “*CAR T cells*” AND “*Liquid tumor*” tenha sido elencado a priori, obtivemos poucos números amostrais, um elevado número de artigos repetidos ou fora do escopo. Portanto, essas palavras não foram incluídas. No entanto, como “*CAR T cells*” AND “*Immunotherapy*” foi utilizado e, devido a sua abrangência, contemplou estudos clínicos de pacientes com malignidades hematológicas. O PRISMA foi usado para direcionar a escrita do presente trabalho e, futuramente, a publicação dessa revisão.

O *clinicaltrials.gov* foi consultado para elaboração de uma tabela contendo as recentes pesquisas sobre CAR-Ts. Para isso foi pesquisado “*CAR T cells*”, e os filtros usados foram para

trabalhos que estejam aceitando inscrições de convidados, ativos (e que não estivesse mais recrutando), encerrados e concluídos. Foram inclusos todos os sexos de pacientes para a busca, e especificados estudos de intervenção (teste clínico). O objetivo dessa consulta foi a construção de uma tabela para informação (detalhada) sobre as pesquisas que estão/estavam em andamento.

5. RESULTADOS

Um total de 1188 artigos foram obtidos, dentre os quais 843 foram eliminados analisando o título do trabalho e/ou resumo apresentado. Nesta fase também foram eliminados artigos que não eram casos clínicos, artigos de revisões, não estavam de acordo com o tema, que não estavam disponibilizados em inglês e documentos que não eram artigos científicos. Os 345 artigos restantes foram analisados novamente para os parâmetros de “duplicados” e “Não adequado ao tema” e, ambos apresentaram 69 e 70 artigos eliminados, respectivamente. Os 206 artigos restantes foram analisados e 41 artigos foram eliminados por serem revisões, 10 por estarem duplicados e 122 por não se adequarem ao tema. Dentre os 33 artigos restantes, foi observado que 3 eram revisões, 2 não eram adequados ao tema e 2 eram repetidos. Na última etapa de eliminação, os artigos selecionados por diferentes autores foram classificados em uma única tabela a fim de verificar o último processo de eliminação, caso fosse necessário. Um total de 26 artigos foram lidos e 2 artigos foram eliminados por serem revisões e 10 por não serem adequados ao tema. Após todas as exclusões 14 artigos foram selecionados e integraram os critérios de inclusão e não-inclusão (**Figura 5**)

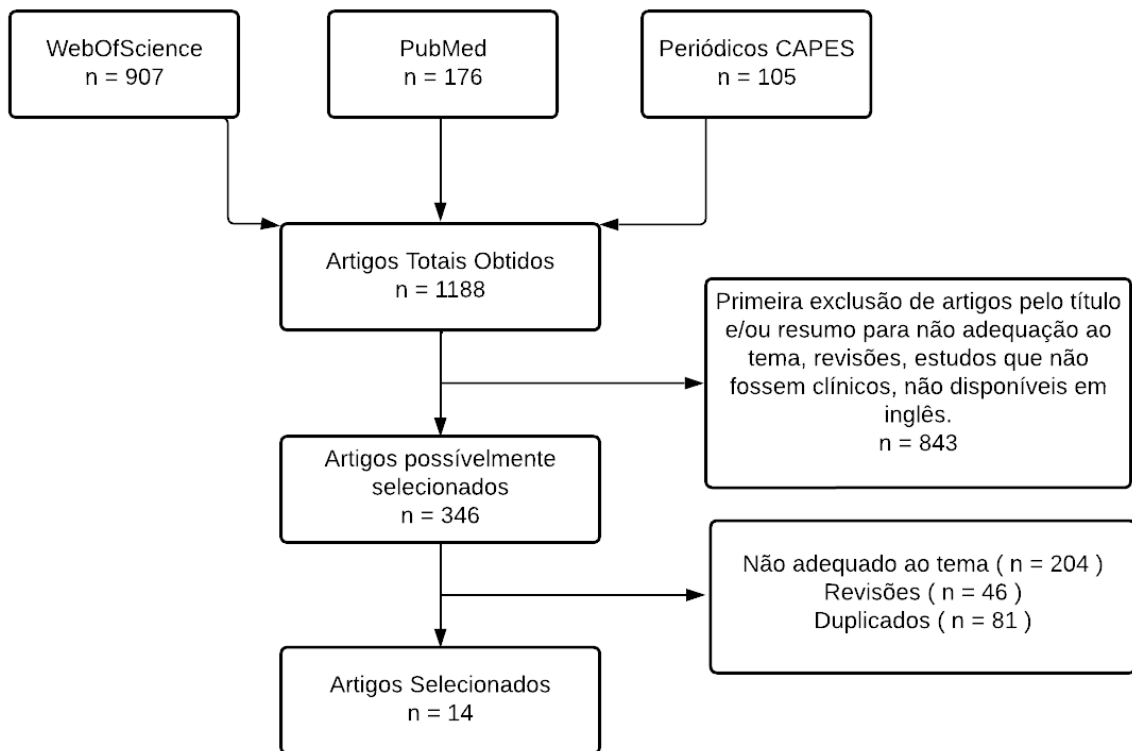


Figura 5. Fluxograma simplificado com os passos da metodologia para obtenção dos artigos.

Legenda: Fluxograma resumido com os passos executados para a obtenção dos 14 artigos elegíveis para a presente revisão

Fonte. Elaborado pelo Autor (2023)

Os 14 artigos classificados apresentaram resultados que foram tabelados (**Tabela 5**) para melhor visualização e discussão dos dados obtidos.

Autores e Data de Publicação	Tumor Sólido ou Hematológico?	Fase	Tipo de Câncer	Construção da CAR-T usada	Geração da CAR-T	Domínio Coestimulatório	Número de Participantes	Idade dos Participantes	Efeitos Adversos	O paciente apresentou CRS?	Tipo De Vetor usado para construção das CAR-Ts	(NCT)
ZHANG et al., 2020.	Hematológico.	Fase I/ Fase II	Leucemia linfoblástica de células B com cromossomo Filadélfia.	CD19/CD22 CAR-T.	-	-	Um.	21 anos.	Síndrome da liberação de citocinas, febre, hipotensão, hipóxia, alguns sintomas de síndrome de ativação de macrófagos, febre alta, aumento de ferritina, esgotamento de fibrinogênio e diminuição da atividade das células NK	Sim, grau 3	Não há informações sobre os vetores usados.	03614858
NAIR et al., 2019.	Hematológico.	Fase I/ Fase II	Leucemia linfoblástica aguda de células B com cromossomo Filadélfia	CD19-specific CAR-T e 153z-CAR-T.	Quarta	CD28-CD137 CD28-CD27 CD28-ICOS CD28-OX40 CD28-IL15Ra	Um.	25 anos.	Síndrome da liberação de citocinas, hipotensão, letargia, tremores musculares, afasia e incontinência. Apresentou rigidez muscular e um escore de Karnofsky de 10 relatado no paciente. Sua consciência retornou após 16 dias de infusão de CART com uma pontuação de Karnofsky melhorada de 40. Também havia um edema cerebral ocupando espaço	Sim, grau 3 na primeira infusão e grau 0 na segunda.	Lentivírus.	03050190 03125577
TAN et al., 2021.	Hematológico.	-	Leucemia linfoblástica aguda B refratária ou recidivada (B-LLA).	CD19 CAR-T.	Segunda	CD137	Doze.	Idade entre 1-12 anos..	A síndrome da liberação de citocinas e a síndrome da neurotoxicidade associada às células efetoras imunes foram os principais efeitos adversos. No entanto, também houve paralisia facial, paraplegia, distúrbio da visão devido a lesões ocupando o nervo óptico, lesões ocupando região do lobo temporal e occipital, dor de cabeça intensa e reflexo positivo do sinal de Babinski	Sim, grau 1, 2 e 3.	Lentivírus.	-
GAUTHIER, et al., 2021.	Hematológico.	Fase I/ Fase II	Leucemia linfoblástica aguda, linfoma não-Hodgkin e leucemia linfocítica crônica.	CD19 CAR-T.	Segunda	CD137	Quarenta e quatro.	Média de 58 anos.	Baixa gravidade da Síndrome da Liberação de Citocinas (a mediana do grau de SLC após o tratamento com CART2 foi 1, e somente 4 pacientes apresentaram grau 3-4 de SLC). Baixa gravidade da neurotoxicidade (a mediana do grau foi 0 e apenas 5 pacientes desenvolveram neurotoxicidade grau 3-4)	Sim, mas menor ou igual à primeira vez. (As células foram aplicadas duas vezes)	Retrovírus.	01865617
DA VIÁ, et al., 2021.	Hematológico.	Fase II	Mieloma múltiplo (IgG)-κ	Anti-BCMA CAR-T. (Abecma)	Segunda	CD137	Um.	71 anos.	Síndrome da Liberação de Citocina	Sim, grau 1	Lentivírus.	03361748
MOSKOP et al., 2021	Hematológico.	-	Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil (ALL)	CD19 CAR-T (Kymriah)	Segunda	CD137	Um.	2 meses.	O grau I da Síndrome de Liberação de Citocinas (SLC) ocasionado pelo tisagenlecleucel, o qual foi tratado com tocilizumabe devido à	Sim, grau 1	Lentivírus.	-

Autores e Data de Publicação	Tumor Sólido ou Hematológico?	Fase	Tipo de Câncer	Construção da CAR-T usada	Geração da CAR-T	Domínio Coestimulatório	Número de Participantes	Idade dos Participantes	Efeitos Adversos	O paciente apresentou CRS?	Tipo De Vetor usado para construção das CAR-Ts	(NCT)
									persistência dos sintomas de febre e taquicardia.			
BRETHON, et al., 2021.	Hematológico.	-	Leucemia aguda de fenótipo misto.	anti-CD19 CAR-T.	-	-	Um.	1 ano e 9 meses de idade.	Síndrome de liberação de citocinas com toxicidades hematológicas e neurológicas.	Sim, grau 2	Não há informações sobre os vetores usados.	-
KARSCHNIA et al., 2021.	Hematológico.	-	Linfoma difuso de grandes células B	CD19 CAR-T. (YESCARTA)	Segunda	CD28	Um.	65 anos.	Disgrafia leve, desorientação e agitação moderadas, progressivamente desorientado e difícil de despertar, estuporoso, coma delta, afecção cardíaca, renal e hepática. Além disso, o nível de consciência diminuiu irreversivelmente após 14 dias da infusão. Um edema cerebral infratentorial profundo foi encontrado. Houve evidência de disfunção na barreira hematoencefálica, pois houve infiltração perivascular de linfócitos CD3+/CD8+ que podem representar células CAR T. Houve também neurotoxicidade após a infusão, mediada pela interleucina. 1.	Sim, grau 2	Não há informações sobre os vetores usados.	-
FENG, et al., 2021.	Hematológico.	Fase I	Linfoma/Linfoblastoma de Células T de Recaída	CD5-IL15/IL15sushi CAR-T.	Quarta	-	Um.	22 anos.	Elevações transitórias em ferritina e Hs-CRP, e breve, aplasia de células T transitória.	Sim, grau 1	Lentivirus.	04594135
LIU et al., 2021.	Hematológico.	Fase II	Linfoma difuso de grandes células B	CD19-PD-1/CD28-CAR-T. (iCAR)	Segunda	CD28	Dezessete.	A idade foi variável. Entre 24-70 anos, a média foi 55 anos.	Síndrome de liberação de citocinas, leucopenia, trombocitopenia, anemia, febre e sintomas leves da Síndrome de Liberação de Citocinas (febre, taquicardia, tontura, hipotensão e hipóxia)	Sim, grau 0, 1 e 2.	Lentivirus.	03258047
FANG, et al., 2021.	Sólido.	Fase I/ Fase II	Câncer de ovário epitelial refratário	α PD-1-mesoCAR-T.	Quarta	CD28	Um.	54 anos.	Grade I, hipertensão e fadiga.	Não	Transposons.	03615313

Autores e Data de Publicação	Tumor Sólido ou Hematológico?	Fase	Tipo de Câncer	Construção da CAR-T usada	Geração da CAR-T	Domínio Coestimulatório	Número de Participantes	Idade dos Participantes	Efeitos Adversos	O paciente apresentou CRS?	Tipo De Vetor usado para construção das CAR-Ts	(NCT)
YOU et al., 2016.	Sólido	Fase I	Câncer de vesícula seminal expressando MUC1	MUC1-específico CAR-T cells: SM3-CAR-T e pSM3-CAR-T.	-	CD28-CD137	Um.	A idade do paciente não foi informada.	Síndrome de liberação de citocinas, leve dor de cabeça, dor muscular, congestão nasal, desconforto abdominal leve, aumento da relação e contagem de eosinófilos e níveis elevados de glicose.	Sim, mas o grau não foi informado.	Lentivirus.	
XU et al., 2020.	Sólido	-	Neuroblastoma com MYCN-amplificado	4SCAR-GD2	Quarta	(GD2 + /CD37 + /CD28 + /CD137+ /CD27- /Casp9).	Um.	55 meses.	Síndrome de liberação de citocinas, pressão arterial baixa nos primeiros e segundos dias após a infusão, febre entre o décimo primeiro e décimo quarto dias, erupção cutânea, hipoalbuminemia e edema entre o décimo primeiro e décimo sétimo dias. Após dezoito semanas da infusão, a ressonância magnética craniana apresentou sinais anormais significativos no temporo-occipital direito. Neste mesmo período, havia 3% de células CAR-T na medula óssea.	Sim, grau 2.	Lentivirus.	-
FENG, et al., 2017.	Sólido.	Fase I/ Fase II	Colangiocarcinoma metastático	EGFR-específico e CD133-específico CAR-T	Segunda	CD137	Um.	52 anos.	Calafrios, febre, fadiga, vômitos e dores musculares (leves e gerenciáveis); febre baixa que durou 9 dias; e erupções cutâneas durante a infusão de células CART-EGFR. Dor abdominal superior, calafrios, febre (39,1°C), hemorragias pontuais esporádicas, erupções cutâneas congestivas, prurido e diarreia durante a manhã do segundo dia após a conclusão da infusão de células CART133.	Não	Lentivirus	02541370

Tabela 5. Classificação dos 14 Artigos Obtidos

Fonte. Elaborado pelo Autor (2023)

ZHANG et al (2021) apresenta um caso de uma mulher de 22 anos de idade com uma nova mutação que leva ao desenvolvimento de um cromossomo Filadélfia positivo em leucemia de linfócitos B. Essa mutação consiste na junção de dois genes, conhecidos como: *STRBP* e *JAK2*, localizados no cromossomo 9q33 e 9p24, respectivamente. A proteína codificada pelo gene *JACK2*, em sua porção carboxi-terminal, possui uma estrutura para tirosina quinase, denominada JH1, e está intrinsecamente relacionado à ativação de proteínas chave do ciclo celular através do eixo JACK2-STAT que regula as divisões celulares (ZHANG et al.,2021; LEROY & CONSTANTINESCU; 2017). O domínio que precede JH1, chamado JH2, é uma região pseudoquinase que regula a atividade da JH1 e , na ausência dessa regulação, ocasionada pela junção ao gene *STRBP*, ocasiona ativação descontrolada que leva à progressão tumoral (ZHANG et al.,2021). Embora os autores afirmam que mutações envolvendo o gene *STRBP*, associadas à emergência do cromossomo Filadélfia, foram também observadas em tumores sólidos, como adenocarcinoma de pulmão (*STRBP-ASTN*) e câncer de mama (*STRBP-ATG14*), o caso clínico relatado por ZHANG et al (2021) foi pioneiro ao mostrar este tipo de mutação ocorrendo em um tumor hematológico.

A paciente recebeu quimioterapia convencional e administração do fármaco inibidor de ativação JACK-STAT, ritoxinib, para tratar o tumor. Como os tratamentos convencionais não foram eficazes, implementou-se a imunoterapia CAR-Ts tandem anti-CD19 e CD22. No caso, dois scFv foram usados como uma maneira de evitar resistência ao tratamento, devido a mutações ou perda de expressão de proteínas. Em algumas situações, essa estratégia pode também ser usada como uma ferramenta para evitar o efeito *on-target off-tumor*, reduzindo as chances de toxicidade e neurotoxicidade da imunoterapia (STERNER & STERNER., 2021). Efeitos adversos de CRS grau 3 foram observados, incluindo: febre alta, hipotensão, hipóxia. Sintomas relacionados à síndrome dos macrófagos ativados incluíram o aumento da ferritina, febre alta, depleção de fibrinogênio e diminuição da atividade das células NK. No entanto, esses sintomas foram aliviados com a administração do anti-inflamatório dexametasona, bolus de fluidos, vasopressores e oxigênio suplementar. No dia 28 após a infusão de células CAR T, foram observadas células neoplásicas CD19+CD22-, indicando uma "resistência parcial" ao tratamento, causada pela perda de expressão de proteína-alvo. Interessante, a paciente não apresentou sintomas típicos de células CAR T relacionadas síndrome de encefalopatia, e houve persistência das células CAR T. No dia 28 após a infusão de células CAR T CD19/CD22, nenhum blasto foi detectado em seu esfregaço, e o rearranjo de *JAK2* estava negativo. No entanto, detectou-se a presença de células neoplásicas positivas para CD10, CD19, CD33,

CD34, mas negativa para CD22 . O *haplo-identical allogenic stem cell transplantation* (allo-HSCT) foi realizado 1 mês após o tratamento com células CAR T e fármacos para prevenir a doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD) foram administrados. A paciente teve relapso hematológico 30 dias após o allo-HSCT, linfócitos de doador foram infundidos no dia 60 após o allo-HSCT. Embora remissão negativa foi obtida após a infusão de linfócitos de doador; a paciente morreu de doença do enxerto contra o hospedeiro grau IV envolvendo o intestino e fígado aos 7 meses pós- HSCT. Considerando os resultados observados, os autores sugerem que a terapia CAR T pode ser uma opção viável para o tratamento desse tipo de patologia.

No trabalho de **NAIR et al., 2019**, os autores produziram várias CAR Ts incorporando domínios de sinalização de células T de CD28 em conjunto com motivo de sinalização intracelular de 4-1BB, CD27, OX40, ICOS e IL-15R α (**Figura 6**). Inicialmente, essas novas CAR Ts foram avaliadas *in vitro* através de um ensaio simples de morte de células-alvo baseado em células T Jurkat, que foram modificadas por CAR. Considerando que as células Jurkat CART são adequadas somente para avaliação funcional de CAR à curto prazo, os autores também utilizaram células T de doadores saudáveis para avaliar a eficiência morte das CARTs. Os resultados demonstraram aumento da morte das células-alvo com a CART 153z (IL-15R α). IL-15 é um fator de crescimento das células T, tão bom quanto o IL-2. IL15Ra consiste em três subunidades que, juntas, formam o IL15R. A subunidade IL15R α é específica apenas para o IL-15, ao contrário do IL15 β (também conhecido como IL-2/15 β), que está acoplado a uma cadeia gama comum (γ C) que é compartilhada com o IL2 (NAIR et al., 2019). Essas similaridades têm o mesmo impacto sobre as células CAR T em relação ao crescimento, expansão, ativação e sobrevivência das células T, e ao contrário do IL-2, o IL-15 não causa morte celular induzida por ativação (AICD) IL2 (NAIR et al., 2019; MARKS-KONCZALIK et al., 2000; MUNGER et al., 1995). O CAR T 153z também apresentou uma maior expansão celular quando comparado aos CAR Ts 19z (com domínio co-estimulatório 4-1BB) e 273z (com domínio co-estimulatório CD27), principalmente porque o IL15R α apresenta uma grande expansão e ativação clonal rapidamente. Essa rápida expansão observada é decorrente da independência das células CAR-Ts se ligarem ao IL-15 solúvel para poderem se expandir. IL-15 também permite às células T CD8⁺ serem resistentes às T_{REGS} (NAIR et al., 2019; TAO et al., 2013). No entanto, o CAR T 153z foi correlacionado com a regulação negativa de proteína de morte celular programada-1 (PD-1). O fato de o CAR T só se expandir em contato direto com a proteína alvo do tumor em vez do IL-15 solúvel torna essa técnica muito desejável. NAIR et al., 2019 também realizaram estudos clínicos 153z CD19 CAR T em um paciente do sexo

masculino de 25 anos com leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) com cromossomo Filadélfia positivo (Ph⁺), que estava com Leucemia do Sistema Nervoso Central (*central nervous system leukemia-CNSL*), e que recidivou 4 meses após *leucemia hematopoietic stem cell transplant* (HSCT). Imediatamente após a infusão das CAR Ts, 273z, o paciente apresentou CRS de grau 3, incluindo hipotensão, letargia, tremores musculares, afasia e incontinência. Após 8 dias, foram detectadas 3% de células CAR T 273z em suas células sanguíneas periféricas. O paciente recebeu uma segunda infusão de células CAR T, construção 153z que possui o domínio IL15R α , mas desta vez não foi detectado CRS (grau 0) e, após 14 dias, 20% das células CAR T 153z foram detectadas em seu líquido cefalorraquidiano, demonstrando migração celular e expansão no sistema nervoso central. No 26º dia, o paciente estava consciente e até conseguia caminhar. Esses achados apoiam a ideia de que as células CAR T podem migrar para o sistema nervoso central e promover anormalidades neurotóxicas por meio da liberação de citocinas.

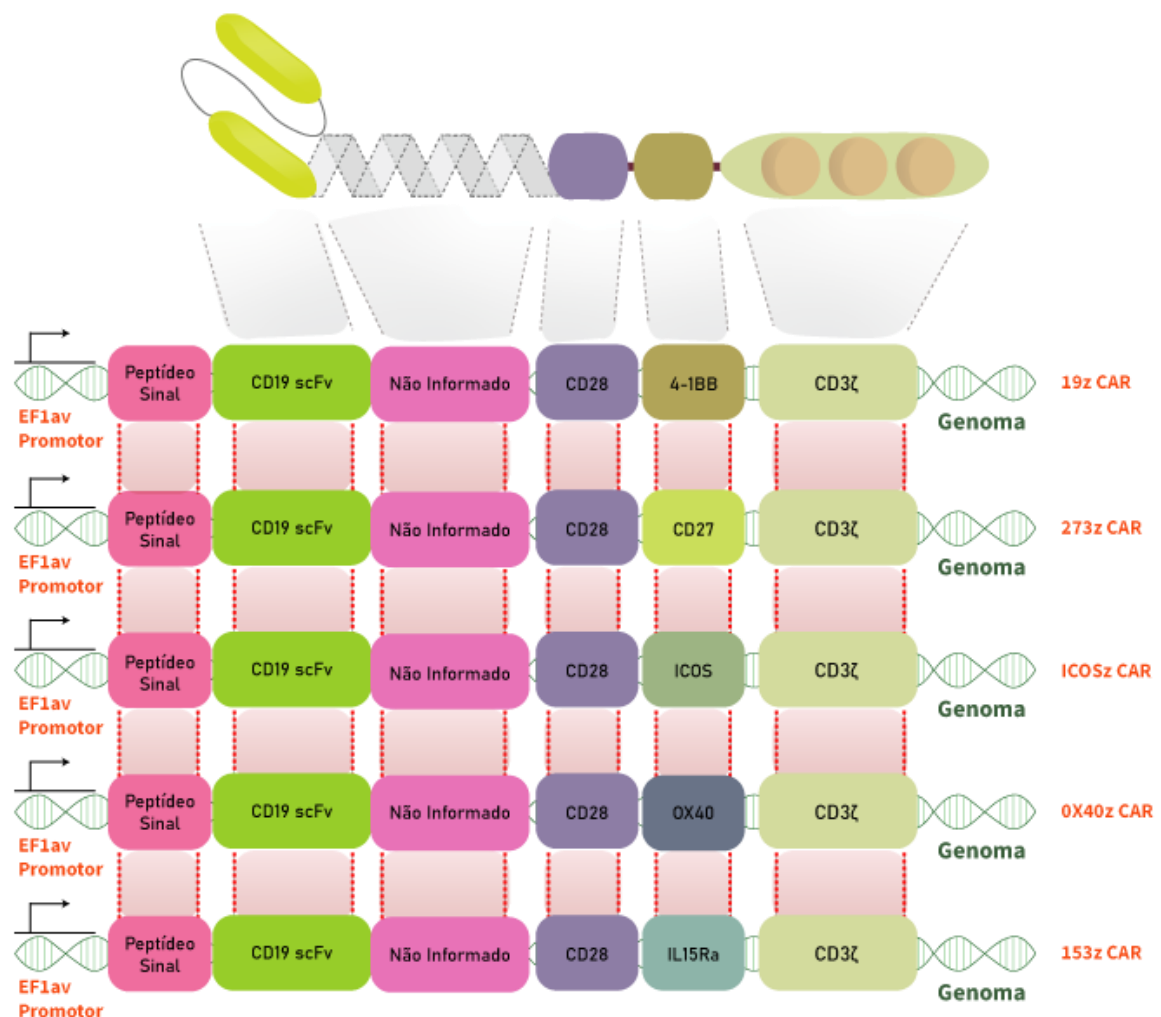


Figura 6. Esquema de Construções de CAR contendo diferentes Endodomínios.

Legenda. Esquema de construções de CAR lentivirais contendo diferentes endodomínios, acoplados com um domínio transmembrana de CD28. A construção do CAR consiste em um promotor EF1a, seguido de um scFV anti-CD19 e um domínio transmembrana/endodomínio CD28 e diferentes domínios coestimulatórios, como 4-1BB (19z), CD27 (273z), ICOS (ICOSz), OX40 (OX40z), IL15Ra (153z), respectivamente, acoplados a uma sinalização intracelular de CD3ζ.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

CNSL é incomum em pacientes pediátricos e tem um bom prognóstico com os tratamentos atuais disponíveis, todavia, para pacientes com recidiva ou refratários às terapias direcionadas ao SNC, há poucas opções de tratamento (TAN et al., 2021). CD19-CAR-Ts estão bem estabelecidas na atividade antitumoral de vários tipos de leucemia, no entanto, muitos ensaios clínicos têm estudado apenas baixa-carga CNSL em pacientes ($<20/\mu\text{L}$ in CSF) ou com pequena massa sólida (TAN et al., 2021). Isso pode ser devido ao grande potencial de toxicidade das CAR-Ts anti-CD19 em desencadear quadros como CRS e ICANS em pacientes com altas cargas de leucemia do sistema nervoso central. O trabalho de TAN et al (2021) teve como objetivo a analisar a eficiência e segurança de CAR-Ts anti-CD19 em pacientes tratados com diferentes cargas de CNSL. Os autores construíram um CAR-T anti-CD19 utilizando scFv derivado de FMC6 com um domínio coestimulatório 4-1BB (CD137) e domínio intracelular CD3ζ. O estudo apresentou uma eficiência na remissão de 12 pacientes, 7 com alta-carga de doença e 5 com baixa carga. Os blastos foram eliminados em um mês, no entanto, as massas sólidas no sistema nervoso central foram eliminadas em 2 a 3 meses. Os pacientes com alta carga de CNSL (blastos $> 5 \mu\text{L}$ in CSF) ou massa sólida apresentaram sintomas neurológicos severos e persistentes. Para manejar os sintomas ICAN, os pacientes foram tratados com manitol (2.5 mL/kg/dose) e furosemida (1mg/kg/dose). Esses achados evidenciam de que pacientes com CNSL e carga tumoral alta, antes da expansão das CAR-Ts, pode predispor à neurotoxicidade severa, que deve ser atentamente monitorada e tratada. No estudo, 9 (75% dos pacientes) permaneceram em remissão até a última avaliação feita, e 8 atingiram sobrevivência livre de leucemia (LFS) após 6 meses. Nenhum dos pacientes avaliados no estudo, apresentaram nenhum desenvolvimento ou comprometimento neuronais irreversíveis. Os autores sugerem que as CAR-Ts possam ser uma ferramenta de interesse e com baixa permanência de efeitos colaterais no CNS quando comparada a outras intervenções atualmente disponíveis. No entanto, essa estratégia não deve ser considerada diretamente para pacientes com CNSL de alta carga, pois ensaios clínicos com um maior número de pacientes são necessários para validar e otimizar essa estratégia, e para atender às necessidades de crianças com CNSL refratárias incuráveis.

GAUTHIER et al (2021) fez comparações sobre duas infusões (nomeadas CART1 e CART2, respectivamente) em 44 pacientes com malignidade de células B refratárias (14 Linfoblástica aguda B-ALL, 9 Leucemia linfocítica Crônica-CLL e 21 Linfoma não-Hodgkin-NHL). Os autores encontraram que as segundas infusões de células CD19 CAR T melhoram os resultados, em pacientes que não atingem uma resposta ótima após CART1. Apesar de 82% dos pacientes terem recebido uma dose maior de infusão de células CAR-Ts, comparada à primeira infusão, esses apresentaram uma baixa CRS. Na primeira infusão com CART, pacientes com ALL possuem um melhor desfecho quando comparados com os pacientes com CLL ou NHL. O tipo de linfodepleção antes da infusão da CART1 estava diretamente associado com o desempenho e eficácia da CART2. Pacientes previamente tratados com Ciclofosfamida e Fludarabina (Cy-flu) obtiveram melhores resultados comparados com o grupo que não recebeu esse tipo de tratamento, e isso pode ser justificado pelo fato da linfodepleção ter auxiliado a atenuar a resposta imune contra a porção transgênica da CAR. Esses achados evidenciam a importância do tratamento para linfodepleção como um fator que afeta a própria atividade das CAR-Ts. Os autores observaram que a expansão da CART2, *in vivo*, era menor do que a expansão observada na CART1, e os melhores resultados foram observados em pacientes CLL e NHL que tiveram o tratamento prévio de linfodepleção com cy-flu. Os autores sugeriram que os fatores que poderiam ter afetado a baixa expansão e persistência *in vivo* poderia ser o uso de CAR-Ts criopreservadas para a CART2. Por fim, os autores sugerem que maiores quantidades toleráveis de CART2 poderiam melhorar a resposta após a falência de respostas à CART1, sem altas toxicidades aos pacientes. A estrutura da CAR, nesse estudo, consistiu em um anticorpo monoclonal murino FMC63 acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio transmembrana CD28, 4-1BB e domínio de sinalização intracelular CD3 ζ (**Figura 7**).

(Gauthier et al., 2021)



Figura 7. Esquema de Construção do CAR apresentado por Gauthier et al (2021)

Legenda: Esquema de construção do CAR apresentado por Gauthier et al (2021) onde é possível observar um fragmento FMC63 scFv murino acoplado a uma dobradiça IgG4. Ademais, há domínios CD28 e CD137 (4-1BB), seguidos do domínio de sinalização intracelular CD3 ζ , um sítio IRES e proteína humana EGF.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

No estudo de **DA VIA et al (2021)**, os autores apresentaram um caso clínico de resistência tumoral com células CAR-T anti-BCMA (Abecma) em um paciente com mieloma múltiplo, causada pela perda de um par de genes responsáveis pela codificação da proteína alvo (BCMA). O gene *TNFRSF17* que codifica BCMA está localizado no braço curto do cromossomo 16 e é expresso quase exclusivamente no plasma e em células B. A γ -secretase cliva a BCMA ligada à membrana tornando os níveis solúveis de BCMA elevados no soro de pacientes com Mieloma Múltiplo (MM) (SHAH et al., 2020). O construto CAR consistiu em um fragmento de anticorpo único de cadeia variável (scFV) murino específico para o antígeno de maturação de células B (BCMA) acoplado a um domínio de dobradiça CD8a e de transmembrana humano fundido a um domínio de sinalização CD137 (4-1BB) e CD3 ζ , em tandem (DA VIA et al., 2021). O paciente recebeu tratamento de linfodepleção com quimioterapia Cy-Flu e apresentou CRS grau I. Cinco meses após a infusão de Ide-cel (Abecma), a proteína M aumentou e houve outras indicações diferentes de recidiva tumoral, mas a proteína BCMA permaneceu baixa. O BCMA é um marcador conhecido de carga tumoral no mieloma múltiplo e estava abaixo do limite de detecção, mesmo com a progressão. As análises demonstraram a expansão e persistência das CAR-Ts neste período. Foi realizada uma terapia de resgate com base em bortezomib, porém o paciente faleceu duas semanas após a doença refratária. Análises genéticas do genoma completo (WGS) foram realizadas para encontrar as razões pelas quais houve uma deleção/inativação do gene responsável pela codificação do marcador BCMA (*TNFRSF17*) localizado no braço curto do cromossomo 16. Foram encontradas várias trocas no genoma das células tumorais em progressão, como a inativação bialélica de TP53, entre outras. E foi observada uma grande deleção heterozigótica de 21,3 megabases (Mb) afetando o cromossomo 16 e uma deleção homozigótica de 91 kilobases (kb) (de 12.058.001 a 12.149.000), resultando na perda bialélica do gene *TNFRSF17* no cromossomo 16p13,13. A perda de ambos genes devem ter ocorrido em diferentes momentos, então o grupo de pesquisa analisou se, antes do tratamento, o paciente já apresentava uma mutação heterozigota neste gene e o resultado foi positivo. Heterozigosidade para o gene *TNFRSF17* ou monossomia do 16 em novos diagnósticos e pacientes com recidivas, consistem 6.7%. Embora o percentual seja baixo, pode ser entendido como um início da resistência à

imunoterapia, por meio da pressão seletiva para perda de antígenos, e um desafio para as CAR-Ts combaterem o tumor.

Nos estudos de **MOSKOP et al (2021)** e **BRETHON et al (2021)**, os autores apresentam CAR-Ts desenvolvidas para o tratamento de tumores hematológicos com rearranjo dos genes *KMT2A*. Tal mutação é um dos fatores que acarretam em prognósticos baixos em ALL infantis devido à resistência à quimioterapia e relapso. **MOSKOP et al (2021)** apresentaram um caso clínico de leucemia linfoblástica aguda infantil em um paciente de 2 meses de idade, que consiste em uma doença rara e agressiva causada por rearranjos em *KMT2A*. O paciente foi submetido a tratamento com tisagenlecleucel após quimioterapia de linfodepleção com cy-flu e desenvolveu CRS de grau I. Tocilizumab foi administrado devido a eventos adversos persistentes, como febre e taquicardia. Dois meses após a infusão de tisagenlecleucel, não houve evidência da doença, mas o transplante de células-tronco hematopoiéticas foi recomendado devido à recidiva de células B CD19⁺ observada comumente após terapias com alvo em CD19. Os autores descrevem que há ensaios clínicos adicionais usando terapia de células T CAR para pacientes com LLA extramedular recidivante isolada, mas não há relatos de terapia com células CAR T para o tratamento bem-sucedido de LLA extramedular recidivante infantil, conforme apresentado. Em contrapartida, **BRETHON et al (2021)** apresenta uma estratégia diferente para evitar a recidiva, através da marcação simultânea de dois antígenos presentes em células B, CD19 e CD22. BRETHON e colaboradores apresentaram um paciente pediátrico com Leucemia Aguda de Fenótipo Misto (MPAL) que foi submetido ao tratamento com dois tipos de imunoterápicos: CAR-T antiCD19 e anticorpos Blinatumomabe (BLIN), uma construção de anticorpo de células T biespecífico que direciona células T citotóxicas para células B-ALL que expressam CD19; e Gemtuzumab ozogamicina (GO) um conjugado droga-anticorpo anti-CD33. O paciente foi tratado após constatação de um relapso após HCST, e apresentou liberação de citocinas de grau 2, com toxicidades neurológicas e hematológicas. O paciente apresentou doença residual mínima (MRD) negativa após a segunda injeção de CAR-T, demonstrando que essa tecnologia foi, até o momento, suficiente para diminuir as chances de recidivas observadas em tratamentos anteriores. As CAR-Ts com capacidade de se ligar a mais de um antígeno tem sido utilizada e testadas, para segurança e eficácia, e demonstram ser ótimas ferramentas para aumentar a atividade antitumoral e **diminuir** as chances de se observar uma resistência ocasionada pela perda ou formação de neoantígeno com as proteínas alvos das CAR-Ts (SHAH & FRY; 2019). A Figura 10, mostra

uma construção em tandem da molécula CAR, que possibilitará ser ativada quando um ou dois antígenos estiverem presentes.

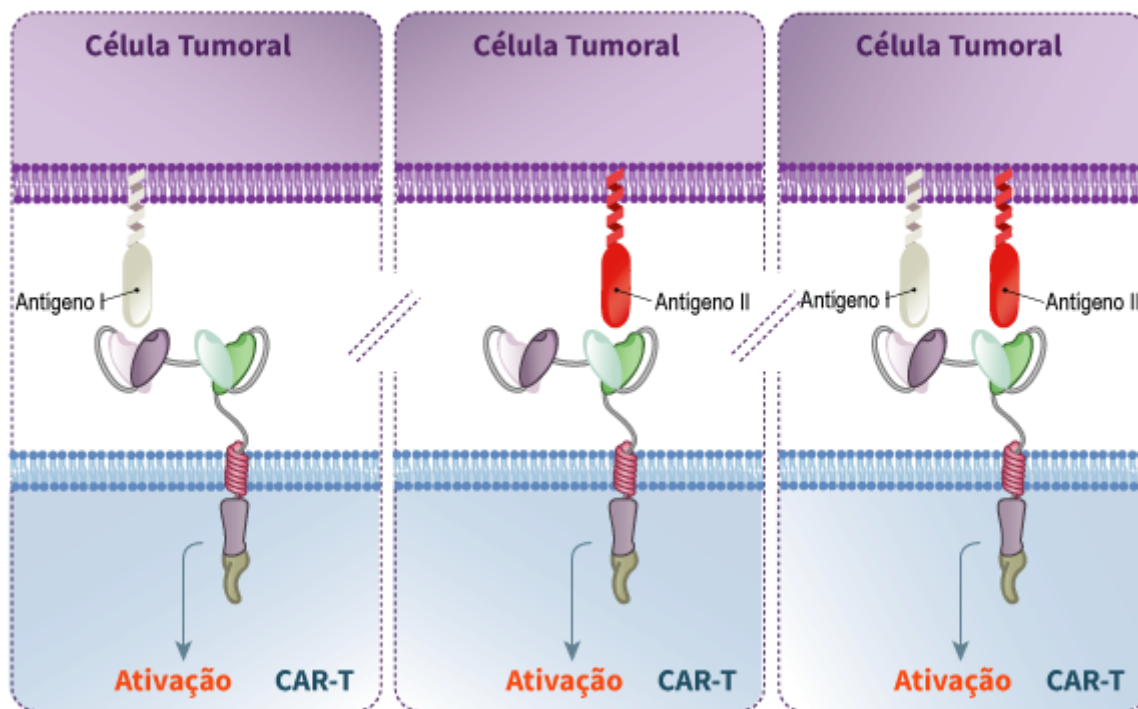


Figura 8. Construção em tandem de CAR

Legenda: Esquema de uma construção de CAR tandem interagindo com uma célula tumoral. A interação para ativação pode ocorrer de três maneiras distintas. As duas primeiras ocorrem quando cada scFV individualmente se liga a sua respectiva proteína antígeno tumoral e é suficiente para a ativação de sinalização intracelular. A terceira ocorre quando ambos os scFV se ligam ao mesmo tempo à sua respectiva proteína antígeno tumoral.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

KARSCHNIA et al (2021) apresenta um caso de uma mulher de 65 anos que morreu 53 dias após a administração intravenosa de CAR-Ts antiCD19 (axicabtagene ciloleucel), conhecida comercialmente como YESCARTA. Essa CAR-T consiste em uma tecnologia de segunda geração que possui um domínio coestimulatório CD28 com domínio de sinalização intracelular CD3 ζ , e sua produção consiste na transfecção de linfócitos T através de um retrovírus. A paciente desenvolveu ICANS grau 4 após 6 dias do início do tratamento com CAR-T, e análises concomitantes de CSF e quantificação de proteína no plasma foram consistentes com disrupção da barreira hematoencefálica (BBB). Administração de imunoglobulinas intravenosas e bloqueio de interleucina-1 pela droga anakinra foi realizado, mas foram incapazes de aliviar os sintomas. De maneira concomitante, a paciente desenvolveu grau II de CRS que foi facilmente manejado com a administração de tocilizumab. A paciente

faleceu após 53 dias da administração das CAR-Ts, devidos às toxicidades neurológicas, e a análise dos órgãos após a morte evidenciou remissão completa da leucemia.

FENG et al. (2021) apresenta um caso de linfoma/leucemia linfoblástica de células T agressivo envolvendo o sistema nervoso central, cujo tratamento consistiu no uso de células T CAR anti-CD5 para secretar um complexo "sushi" IL-15/IL15R α . CD5 tem sido considerado um excelente alvo terapêutico, uma vez que é uma das principais proteínas encontradas em células T de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) e tumores de linfoma de células T periféricas (PTCL), enquanto não está presente em células-tronco hematopoiéticas e células não-hematopoiéticas, minimizando o risco de toxicidade em células saudáveis (FENG et al., 2021). Embora as células T normais também expressem CD5 em sua superfície celular, estudos clínicos indicaram que as células CAR-T têm preferência em eliminar as células tumorais CD5⁺ em vez da população normal de linfócitos T (FENG et al., 2021; MAMONKIN et al., 2015). Existe uma chance de lise das células CAR-T, mas isso não foi observado no estudo de caso, uma vez que foi possível observar que as próprias células CAR-T diminuíram a expressão do gene *CD5*.

A tecnologia utilizada neste caso clínico é muito promissora, uma vez que apresenta a capacidade de liberar citocinas, como a liberação de IL-15/IL15 α . IL-15 é uma proteína pleiotrópica que pode afetar células imunes naturais, como células adaptativas, e pode ser encontrada livre no meio extracelular ou associada ao seu receptor (IL15R α) (FENG et al., 2021; WALDMANN., 2015). IL-15R consiste em uma subunidade alfa, que pode ser encontrada em células apresentadoras de antígenos ou liberada no soro, e uma subunidade $\beta\gamma$ localizada em células-alvo. IL15R α pode se associar livremente à citocina IL-15, formando um complexo. No entanto, para funções celulares, é necessário que ela se ligue ao receptor IL-15 $\beta\gamma$ (FENG et al., 2021; WALDMANN., 2015). IL-15 tem uma meia-vida curta, mas quando associada ao IL15R α , sua meia-vida é aumentada. Dessa forma, a utilização de uma construção CAR antiCD5 com capacidade de secretar IL15/IL15R α foi pensada a fim de se obter uma resposta antitumoral mais sustentada e prolongar a tempo de sobrevivência da CAR-T (FENG et al., 2021). O tratamento causou com sucesso a remissão da doença avançada do paciente, demonstrando níveis regulados de liberação de citocinas IL-15 e linfócitos T saudáveis. Não foi observada nenhuma deficiência celular causada pela aplasia de células T curtas, que voltou ao normal no nono dia após o início do tratamento com células T CAR anti-CD5. Foi observada uma CRS grau I com uma elevação transitória de ferritina, e os sintomas envolvendo a

infiltração de células neoplásicas no nervo óptico, por exemplo, diminuíram dias após a infusão com as CAR-Ts.

LIU et al (2021) apresenta um estudo fase Ib com 17 pacientes entre 20-70 anos com linfomas de grandes células B, incluindo DLBCL, linfoma folicular transformado (tFL) e linfoma de células do manto (MCL), cujo critério de inclusão consiste em células tumorais PDL-1⁺. São apresentadas bi-CAR-Ts direcionadas à PD-L1 e CD19 para tratar cânceres hematológicos. O objetivo de construir um CAR anti-PD-L1 não é apenas bloquear o ligante PD-L1, mas alcançar uma resposta citotóxica contra o alvo (LIU et al., 2021). O CAR é construído, através da utilização de um vetor viral (lentivírus), truncando o PD-1 extracelular e acoplando-o a um promotor de vírus de célula-tronco de camundongo (MSCV), uma transmembrana CD28 e sinalização citoplasmática (**Figura 9**). O construto anti-CD19 possui o promotor EF-1a, seguido de um scFV anti-CD19, dobradiça CD28 e domínio transmembrana, estimulador 4-1BB (CD137) e domínio de sinalização intracelular CD3ζ. As células T CAR CD19-PD1 foram mais eficazes do que as células T CAR CD19 sozinhas ou mesmo combinadas com anticorpos anti-PD-1 na atividade antitumoral. Além disso, alguns genes geradores de memória de células T apresentaram aumento na expressão, o que aumentou a atividade citotóxica das células T CAR. Na presença do domínio costimulatório 4-1BB, a expressão baixa de genes de exaustão correlacionados, como TIM3/LAG3, foi reduzida. Todos os pacientes apresentaram um ou mais efeitos adversos (AE) e os maiores graus: 3 e 4 foram encontrados em 7 (41,18%) e 6 (35,9%) dos 17 pacientes, respectivamente. Ademais, não foram observados AE grau 5. 15 dos 17 pacientes (88,24%) apresentaram CRS leve, no entanto nenhum recebeu tratamento com tocilizumab ou glicocorticóides (LIU et al., 2021). 1 paciente morreu por progressão do linfoma no dia 30 após a infusão da CAR-T, mas não apresentou CRS severo ou toxicidades relacionadas à administração da CAR-T. 10 (58,8%) apresentaram resposta objetiva (OR) e 7 (41,2%) remissão completa, incluindo 1 paciente com MCL e 1 com tFL. 1 paciente com DLBCL apresentou remissão completa após a administração da CAR-T, mas teve uma recidiva CD19⁺ após 5 meses, confirmada por biópsia. Um paciente com linfoma de expressão tripla, refratário para 4 linhas de imunoterapia seguida de ibrutinib, atingiu CR persistente após a administração das CAR-Ts. A proporção estimada de sobrevida livre de progressão (PFS) no 18º mês foi de 80%. Dessa forma, os autores concluíram que a CD19-PD-1/CD28-CAR-T apresentou segurança e eficácia no tratamento de linfomas de grandes células B PDL-1⁺.

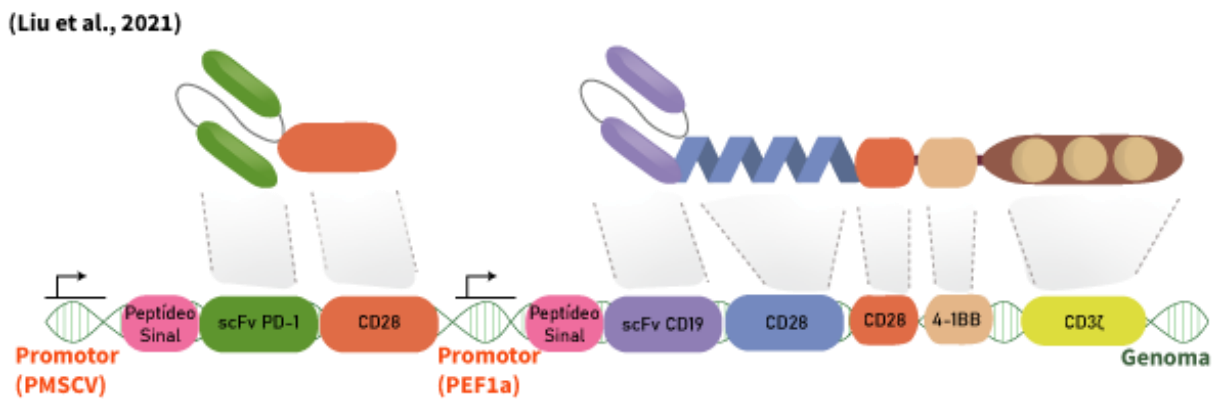


Figura 9. Esquema de construção de uma CAR-T apresentada por Liu et al (2021)

Legenda: Esquema de expressão do cassete gênico para ambas construções CARs: um cassete para uma CAR-PD-1, contendo um anti-PD1 scFv acoplado a um domínio CD28. Uma segunda construção CAR, precedida pelo promotor EF1a, que consiste em um scFv anti-CD19 acoplado a uma dobradiça CD28, domínio transmembrana CD28, domínio coestimulatório CD137 (4-1BB) e CD3 ζ .

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Mesmo com a grande expansão das células CAR-Ts, as células T modificadas foram bem toleradas, possivelmente pela baixa produção de IL-6. Outra explicação consiste na CAR-Ts PD-1/CD28 sendo ativadas apenas dentro do TME, uma vez que o paciente apresenta baixa níveis de citocinas no soro.

FANG et al (2021) relataram o caso de uma paciente de 54 anos diagnosticada com adenocarcinoma seroso ovariano avançado que foi submetida a cirurgia e quimioterapia. Posteriormente, a paciente apresentou nódulos no fígado e presença do antígeno de diferenciação Mesotelina (MSLN), que ocorre em alta expressão em câncer de ovário e níveis de expressão normal em tecidos normais. A paciente recebeu duas infusões com células anti-mesoCAR-Ts que secretam anticorpos anti-PD-1 em associação com o apatinib, uma droga anti-angiogênica. Os níveis de citocinas como IL-6, TNF- α , IL-2 and IL-4 variaram com tratamento, no entanto, não causaram nenhuma CRS, somente hipertensão e fadiga. O aumento de células CD8 $^{+}$ positivas sugerem que as CAR-Ts podem aumentar a atividade dessas células. Esses resultados mostram viabilidade e possibilidade de tratamento com células T CAR anti-mesoCAR-T.

YOU et al (2016) apresenta a construção de duas linhagens de células CAR T anti MUC, para tratar paciente com câncer de vesícula seminal metastático. Uma das linhagens de CAR T continha a sequência de fragmento variável de cadeia única (scFv) SM3 que visava especificamente o antígeno MUC1 e co-expressava interleucina 12 (IL-12) (denominada SM3-CAR). A outra linhagem celular CAR-T carregava a sequência SM3 scFv modificada para

melhorar sua ligação ao antígeno MUC1 (denominado pSM3-CAR), mas não co-expressava IL-12. As células SM3-CAR-T e as células pSM3-CAR-T foram injetadas em duas lesões tumorais separadas e simultaneamente. Os autores mostraram que pSM3-CAR-T apresentaram melhores resultados do que as células SM3-CAR-T com expressão para IL-12. Os fatores que possivelmente justificam tal observação consiste no domínio da dobradiça derivado de IgD, que confere maior flexibilidade ao scFv para ligamento ao epítipo alvo e se sobrepõe à inibição estérica, bem como a maior especificidade apresentada pela construção da pSM3-CAR-T. As células SM3-CAR-T não obtiveram êxito ao ataque tumoral *in vivo* mesmo com a coexpressão de IL-12. O sucesso da pSM3-CAR-T comparada com a anterior, reitera a importância da escolha do scFv nesta ferramenta imunoterápica. De mesmo modo, os autores não observaram nenhum efeito *on-target off-tumor* acompanhado pela infusão ou administração intratumoral das células CAR-Ts.

O aprimoramento do scFv anti-MUC-1 foi feito pela adição de 6 aminoácidos, exibindo uma afinidade 7.4 vezes maior que poderia ser robustamente ligado na presença de MUC-1 livre de glicanos ancorados (**Figura 10**).**Erro! Fonte de referência não encontrada.** Ademais, os autores tem aprimorado tecnologia de administração dessas células CAR-Ts por injeção intratumoral ao invés de injeção sistêmica, e os autores puderam observar atividade antitumoral sem tratamento prévio para linfodepleção.

(You et al., 2016)

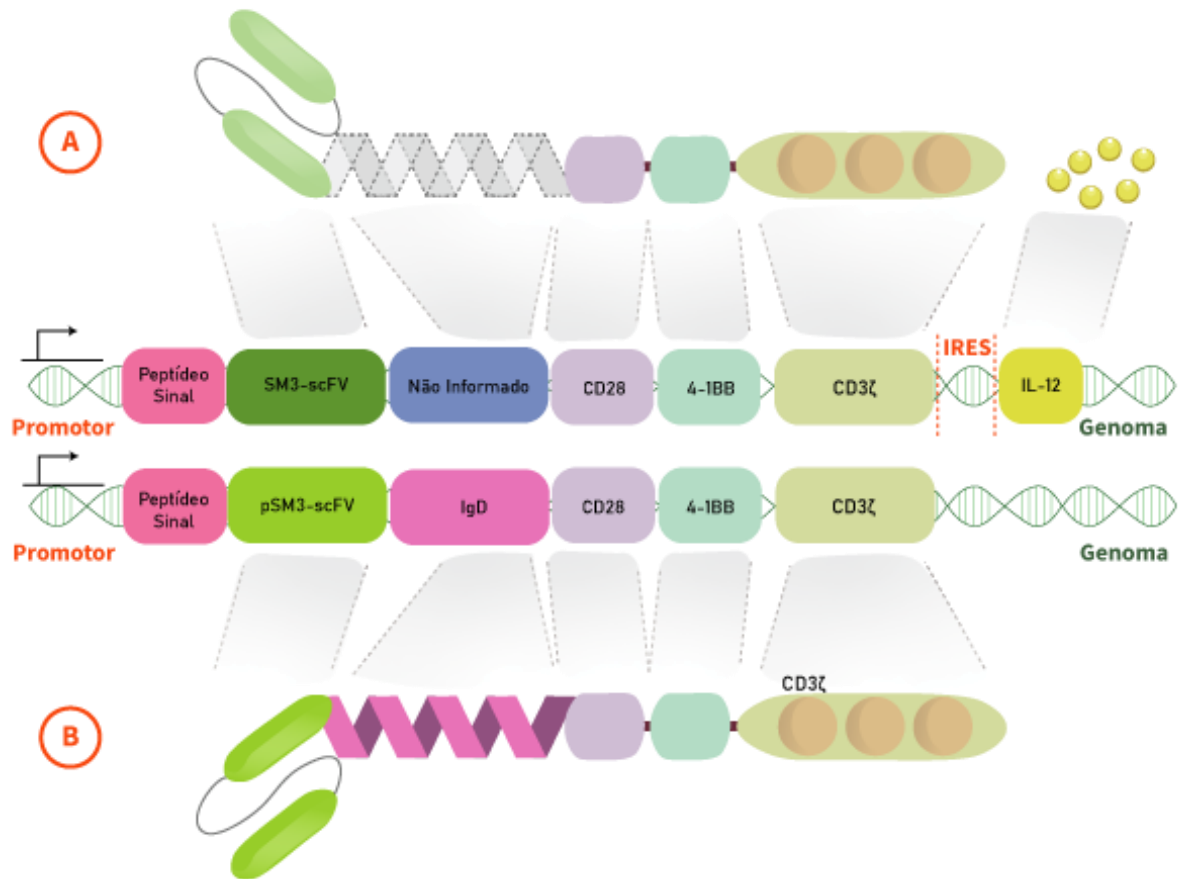


Figura 10. Construção das CAR-Ts apresentadas por YOU et al (2016).

Legenda: Esquema baseado na Figura 2 (A) e (B) presente no trabalho de YOU et al (2016). O esquema apresenta a construção de dois cassetes genéticos diferentes para a expressão da molécula CAR. **(A)** Uma representação do scFv SM3 convencional acoplado a CD28 e 4-1BB (CD137) com um domínio de sinalização intracelular CD3ζ. Ademais, é possível observar um sítio IRES, em que há a ligação do ribossomo e um sítio subsequente com o gene para a produção de IL-12. **(B)** Uma pequena diferença do cassete gênico apresentado anteriormente, consistindo em uma construção de segunda geração ao invés de TRUCK e, portanto, não há um sítio IRES ou produção de IL-12. O scFv SM3 fora substituído por uma forma mutada em seis aminoácidos, nomeada pSM3-scFv, que confere uma maior afinidade ao antígeno tumoral MUC1.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

XU et al (2021) apresenta o caso de um paciente de 55 meses de idade com alto risco de neuroblastoma (NB) em estágio IV, que recebeu quimiorradioterapia e Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (HSCT). Foi construída uma célula CAR T de quarta geração para um antígeno do NB bem caracterizado, denominado receptor de disialogangliosídeo GD2, onde foram incorporadas múltiplas moléculas coestimulatórias. Além disso, nestas células CD2 CAR T estava presente uma caspase 9 induzível (iCasp9) para garantir alta segurança e evitar CRS, que geralmente ocorre logo após a administração de anticorpos ou terapias com células T adotivas. O autor afirma que esta CAR T produziu um melhor efeito antitumoral quando comparado à terceira geração. Um lentivírus foi usado para a transdução e a taxa de

transferência gênica foi de 20,77%. A PCR foi usada para rastrear o número de células CAR T no sangue periférico. Os principais eventos adversos observados no paciente foram CRS de grau II, que consistiu em baixa pressão arterial durante as primeiras 24-48 horas após a infusão, febre durante os dias 11-14, irritação na pele, hipoalbuminemia e edema entre os dias 11-17. Exames regulares foram feitos para acompanhar a progressão tumoral e o paciente apresentou doença estável, nenhuma célula tumoral foi encontrada na sua medula óssea e MRD foi negativo.

FENG et al. (2017) apresentou o caso de uma mulher de 52 anos com colangiocarcinoma, um dos tumores mais graves e fatais que possui falta de resposta às terapias tradicionais como quimioterapia, radioterapia e terapia direcionada. Essa dificuldade no tratamento é em decorrência de grande heterogeneidade genética observada, que contribui para a resistência às terapias convencionais, causando baixa taxa de resposta geral (ORR) e sobrevida global (OS). Foi constatado a presença do receptor EGFR em mais de 90% das células tumorais da paciente. Após tentativas de tratamento com radioterapia, a paciente foi submetida a um teste clínico para CAR-T anti-EGFR. Houveram duas infusões das anti-EGFR CAR-Ts com espaçamento de dois meses entre cada, e administrados anticorpos monoclonais anti PD-1 em cada ciclo de infusão das CAR-Ts. Foi observado que a segunda injeção da CAR-T anti-EGFR não atingiu um pico maior ou igual à primeira injeção e, devido ao surgimento de metástase foi necessário pensar em outro tratamento. Como 90% das células tumorais eram CD133⁺, a paciente foi submetida a um teste clínico para uma CAR-T anti-CD133, onde houve o desaparecimento de algumas metástases, fazendo com que a paciente atingisse resposta parcial (PR).

6. DISCUSSÕES

Em nosso estudo, **TAN et al (2021)**, **NAIR et al (2019)** e **FENG et al (2021)** trabalharam com construções de CAR-Ts para tratamento de leucemias envolvendo o sistema nervoso central (CNSL). **TAN et al (2021)** e **NAIR et al (2019)** apresentaram casos clínicos envolvendo malignidades em células B, enquanto que, **FENG et al (2021)** mostrou um caso de leucemia/linfoma linfoblástica agressivo de células T. CNSL é uma condição rara que acomete 3-7% dos pacientes pediátricos com B-ALL (**TAN et al., 2021**) e ambos autores (**TAN et al., 2021**; **NAIR et al., 2019**), utilizaram de fragmentos scFv origem murina (FMC63) nas construções anti-CD19 das CAR-Ts. No entanto, gerações diferentes foram usadas por cada um dos autores; **TAN et al (2021)** usou uma construção de segunda geração com domínio

coestimulatório CD137 (4-1BB) e observou sobrevida livre de leucemia (LFS) em 9 dos 12 pacientes, os outros 3 apresentaram recidivas e 1 ainda apresentava CNSL. Durante o tratamento destes 12 pacientes não houve progressão tumoral no CNS, e foram observadas diminuição de linfoblastos no CSF. Não foram observadas toxicidades severas em pacientes com ou sem massa sólida no CNSL. Os efeitos adversos encontrados não foram correlacionados com a quantidade de dose de CAR-T administrada para cada paciente, mas com a carga tumoral encontrada em cada um deles (TAN et al., 2021). **NAIR et al (2019)** usou uma construção de quarta geração com domínios CD28 e CD137. Para alcançar uma remissão completa (CR) foi necessária de duas doses de infusão da CAR-T, no entanto, a dose administrada foi menor, provavelmente em decorrência da presença do domínio co-estimulatório IL15Ra (CAR-T 153z) que induz maior expansão e ativação dos linfócitos Ts (NAIR et al., 2019). As CAR-Ts foram observadas no CSF (20% das células) (NAIR et al., 2019), o que demonstra que a CAR-T pode ultrapassar a barreira hemato-encefálica (BBB) e servir como uma ferramenta terapêutica para essas situações (TAN et al., 2021; NAIR et al., 2019; FENG et al., 2021). Devido à construção, apresentada por NAIR et al (2019), possuir um receptor intracelular IL-15Ra, observou-se uma maior expansão, proliferação e ativação das CAR-Ts e, sua ativação, estava vinculada à uma baixa expressão da proteína PD-1. Embora ambas construções notificadas por TAN et al. (2021) e NAIR et al. (2019) apresentaram-se como ferramentas terapêuticas viáveis para o tratamento de CNSL de B-ALL, as variáveis relacionadas à construção da CAR-T e a carga tumoral são fatores que podem afetar a eficácia e toxicidade desta imunoterapia.

FENG et al (2021) usou uma construção de CAR-T anti CD5 para tratamento de leucemia de linfócitos Ts envolvendo o CNS e observou uma diminuição dos linfoblastos presentes no CSF (de 80% das células linfoblásticas para 2%) em apenas 1 semana. A quantidade de linfoblastos no CSF continuou diminuindo no decorrer dos dias até tornarem-se indetectáveis na quarta semana após o início da terapia. O paciente experimentou quadro I de CRS que, assim como os outros autores, foi facilmente manejado, tornando a técnica segura; e os sintomas do CNSL como dor de cabeça ou edema no olho devido à infiltração de células neoplásicas T no nervo óptico, melhoraram rapidamente após a infusão. Diferentemente das CAR-Ts anti-CD19 que persistem com um quadro clínico de aplasia de células B e baixa imunoglobulina G (IgG) (FENG et al., 2021), as CAR-Ts anti-CD5 apresentaram uma aplasia de linfócitos Ts rápida e que foi revertida, naturalmente, no dia 9 após a infusão. Nenhuma infecção foi observada em decorrência dessa diminuição transitória de linfócitos Ts nativos, demonstrando que é uma técnica segura e eficaz para o tratamento de CNSL.

Assim como **NAIR et al (2019)**, **ZHANG et al (2021)** apresenta um caso de ALL envolvendo cromossomo filadelfia positivo, mas diferentemente de NAIR et al (2019), sem o comprometimento do CNS. ALL Ph⁺ é um dos cânceres presentes em adultos com mais chances de falhas e possibilidades de relapsos, sendo a via JAK-STAT encontrada em 64% dos pacientes ALL Ph⁺ (ZHANG et al., 2021). Este autor apresenta uma construção CAR diferente dos demais autores, ou seja, uma construção em tandem marcando ambas proteínas comumente usadas em B-ALL, a CD19 e CD22 em tandem. Neste caso, diferentemente de NAIR et al (2019) foi necessário a infusão de CAR-Ts em escala crescente de dosagem por cinco dias consecutivos, allo-HSCT e infusão de linfócitos doador para atingir remissão completa (ZHANG et al., 2021). Sua construção em tandem para dois marcadores de neoplasias, teve como objetivo dificultar à resistência ao tratamento por *downregulation* ou formação de neoatígeno em um dos marcadores celulares de linfócitos B (CD19 ou CD22). A fenotipagem das células tumorais, depois da infusão das CAR-Ts, demonstrou CD10⁺, CD19⁺, CD33⁺, CD34⁺, mas CD22⁻. Como o teste de FISH apresentou rearranjo *JAK2* negativo nas células tumorais, a abordagem terapêutica allo-HSCT foi utilizada. Estes achados, quanto aos apresentados por NAIR et al (2019), evidenciam a CAR-T como uma possível ferramenta para tratamento de neoplasias hematológicas com formação de cromossomo filadélfia.

BRETHON et al (2021) e **MOSKOP et al (2021)** apresentaram leucemias com rearranjo *KMT2A* em crianças, cuja incidência consiste em 75%-80% em pacientes com menos de 1 ano, geralmente associados a perfil fenotípico CD10⁻ (BRETHON et al., 2021). BRETHON et al (2021) apresentando uma leucemia aguda de fenótipo misto que atingiu persistência negativa após a infusão de CAR-Ts anti-CD19. MOSKOP et al (2021) mostra que em 2 meses após a infusão das CAR-Ts anti-CD19 não houve evidências B-ALL no paciente pediátrico, ambos atingindo remissão. Em ambos estudos foram observados desenvolvimento de quadros CRS como grau II (BRETHON et al., 2021) e grau I (MOSKOP et al., 2021), cuja administração de tocilizumab foi suficiente para reverter essa toxicidade. A CAR-T apresentada no trabalho de MOSKOP et al (2021) é tisagenlecleucel (Kymriah), uma droga aprovada pelo FDA para tratamento de ALL.

KARSCHNIA et al (2021) e **DA VIA et al (2021)** também apresentaram estudos envolvendo CAR-Ts aprovadas pelo FDA; YESCARTA e ABECMA, respectivamente. O paciente apresentado por KARSCHNIA et al (2021) possui um câncer hematológico não-Hodgkin DLBCL e apresentou ICANS 1-4 após a administração de CAR-Ts anti-CD19. CRS grau II também foi observado, no entanto, a administração de tocilizumab foi suficiente para

reverter essa toxicidade, assim como observado em outros trabalhos (MOSKOP et al., 2021; TAN et al., 2020; GAUTHIER et al., 2021). Houve a ruptura da BBB, evidenciada pelo aumento de proteínas (90mg/dl) e a administração de anakira nesse paciente apresentou resultado de diminuição da neurotoxicidade. O paciente morreu 53 dias após à administração das CAR-Ts e a examinação de outros órgãos demonstrou remissão completa de leucemia. Esse resultado obtido foi classificado pelo autor como sendo um caso específico de seu estudo, e sugere que as células murais do cérebro são importantes para a integridade da BBB e expressam a isoforma da proteína CD19, que pode ser reconhecida pelas CAR-Ts (PARKER et al., 2020) e podem migrar para o sistema nervoso central (MULAZZANI et al., 2019). **DA VIA et al (2021)** utilizou ABECMA, uma CAR-T anti-BCMA para tratamento de múltiplo mieloma, e apresenta um caso em que houve a perda da proteína marcada pela CAR-T, assim como parcialmente observado no estudo de ZHANG et al (2021), que leva à resistência à imunoterapia. Seus achados evidenciam a importância da monossomia do cromossomo 16 como sendo um fator importante que pode desencadear a resistência à terapia anti-BCMA desempenhada pelas CAR-Ts. Tais fatores se devem ao fato do BCMA, alvo terapêutico da técnica, ter seu gene alocado no cromossomo 16. Portanto, a heterozigiosidade deste cromossomo deve ser considerada (DA VIA et al., 2021).

A CAR-T apresentada por **LIU et al (2021)**, CD19-PD-1/CD28-CAR-T, possui capacidade de ativação para resposta antitumoral quando ligada ao antígeno CD19 pelo scFv anti-CD19 ou quando o seu receptor PD-1 se ligar ao PDL-1 de células tumorais, uma vez que a subunidade intracelular fusionada ao receptor PD-1 da CAR-T é um domínio co-estimulatório de ativação CD28 (LIU et al., 2021). O objetivo desta construção consiste tanto na ativação das CAR-Ts através da ligação do scFv das CAR-Ts aos CD19 das células tumorais, como tornar uma molécula antes inibitória (PDL-1), imunogênica para a ativação das CAR-Ts, fazendo-as desempenhar uma atividade citotóxica e antitumoral (LIU et al., 2021). Quando há contato entre o PDL-1 e o receptor PD-1 presente nos linfócitos, o efeito inibitório supera o contato entre a célula T e as proteínas de superfície CD28 e do domínio coestimulador de linfócitos T, prevenindo a fosforilação de proteínas intracelulares próximas a esses receptores, como zap70 e PI3k, respectivamente, levando a um estado de anergia e apoptose por meio da prevenção da ativação celular, produção de citocinas e promoção da expressão de moléculas apoptóticas dos linfócitos T (HUDSON et al., 2020). Assim, moléculas que interfiram ou previnam a ligação do eixo PD1/PDL-1 são altamente desejadas (WU et al., 2021; HUDSON et al., 2020) e atualmente 20-30 medicamentos direcionados a essa via de sinalização estão em

desenvolvimento (WU et al., 2021; WANG et al., 2022). Outras moléculas, como CTLA-4, também têm efeito imunossupressor nos linfócitos T e há medicamentos que visam inibir sua ação, mas ao contrário do PD-1, que é expresso em linfócitos T ativados, linfócitos B e monócitos, sua expressão é restrita aos linfócitos T. O PDL-1 pode ser encontrado tanto em células apresentadoras de antígeno quanto em tumores (HUDSON et al., 2020). No estudo, o autor demonstrou uma CRS leve em 88,24%, e não foi necessária administração de tocilizumab. No estudo, 7 dos 17 pacientes (41,2%) apresentaram remissão completa, incluindo um paciente com linfoma de células do manto e 1 com linfoma folicular transformador (LIU et al., 2021). A incidência de CR atingida neste estudo demonstra que CAR-Ts que inibam a ligação do eixo PD-1/PDL-1 possuem uma grande vantagem em tumores que sejam PD-L1⁺ (FANG et al., 2021; LIU et al., 2021).

FANG et al (2021), FENG et al (2017), YOU et al (2016), apresentam tumores sólidos que foram tratados com CAR-Ts em adultos e, **XU et al (2021)** apresenta um caso relacionado a uma criança. **FANG et al (2021)** reporta um caso de tratamento com CAR-Ts com capacidade de secretar scFv anti-PD-1 e tratamento com um anti-angiogênico denominado apatinib para auxiliar na terapia oncológica. Esses medicamentos, sobretudo os imunoterápicos, são bastante comuns de serem administrados conjuntamente às CAR-Ts, como modo de aprimoramento de suas funções citotóxicas, como reportado por FENG et al (2017) através da administração intravenosa de anticorpo monoclonal anti-PD1. YOU et al (2016), FENG et al (2017) e FANG et al (2021) administraram duas doses de CAR-Ts aos pacientes. **FENG et al (2017)** observou um caso de resistência após a segunda infusão de CAR-Ts, onde não foi observado um pico, destas células, maior ou igual à primeira infusão. Essa resistência poderia ser explicada provavelmente pelo scFv murino incorporado que poderia ser determinante no desenvolvimento da imunidade das células T CD8⁺, causando enfraquecimento da expansão das células CAR-T *in vivo* e perda dessas células (FENG et al., 2017). Estudos devem ser feitos a fim de averiguar se um regimento de linfodepleção mais intensivo poderia melhorar o desempenho da segunda infusão de CAR-T contra os tumores, incluindo diminuição da rejeição pela CAR-T, como observado em malignidades hematológicas (GAUTHIER et al., 2021). No caso, a resistência foi observada pelo avanço da metástase e foi necessário a administração de uma nova construção de CAR-T anti-CD133, uma vez que 90% das células tumorais eram CD133⁺ (FENG et al., 2017). **FANG et al (2021)** não observou um efeito sinérgico da CAR-T com administração concomitante de anticorpos anti-PD-1, uma vez que o tumor não era acessível para biópsia e o autor propõe a hipótese de que o tumor poderia ter baixa ou nenhuma

expressão de PD-1 (FENG et al., 2017). O autor reporta um aumento de IL-6 e proteína reativa C (CRP) sem ocasionar um quadro de CRS. FANG et al (2021) observa 46% de linfócitos infiltrantes no milieu tumoral do paciente com câncer de ovário r/r, e baixa expressão de PDL-1 (cerca de 9% das células tumorais), indicando de que era um TME do tipo infiltrante. Foi observado um pico de IL-6 no paciente após a primeira infusão, e dois dias após a segunda infusão, mas assim como FENG et al (2021) não foi observado quadro de CRS. Os sintomas adversos comuns foram fadiga e hipertensão, e o paciente apresentou remissão parcial (PR) e sobrevida livre de progressão (PFS) maior que 5 meses, e sobreviveu 17 meses. Os achados de FANG et al (2021) e FENG et al (2021) demonstram a importância das CAR-Ts com associação a outros medicamentos, inclusive anti-PD1/PDL-1 em tumores PDL-1⁺, como formas de aumentar a sobrevida do paciente. YOU et al (2016) utilizou uma construção anti-MUC1 para tratar um câncer de vesícula seminal metastático MUC-1⁺. MUC1 tem expressão em vários tumores sólidos e líquidos, o que o torna um possível alvo para a imunoterapia (YOU et al., 2016). Embora o MUC1 tenha expressão em células tumorais e saudáveis, essa proteína é um antígeno associado ao tumor (TAA) e tem um padrão de glicosilação diferente nas expressões tumorais correlatas (YOU et al., 2016). Essa glicosilação desregulada, observada em células cancerosas, inclui a presença de glicanos mais curtos do que a forma nativa expressa em tecidos saudáveis e, portanto, é capaz de mostrar epítomos críticos no domínio extracelular, apresentando um número variável de repetições em tandem (VNTR) capaz de induzir uma ligação específica por vários anticorpos (YOU et al., 2016). A discriminação entre a forma da proteína tumoral e a nativa em células saudáveis é fundamental para evitar o efeito *on-target off-tumor* e de grande interesse para o desenvolvimento de imunoterapias no geral (YOU et al., 2016). As duas construções de CAR-Ts que foram aplicadas em sítios tumorais diferentes, apresentaram atividades antitumorais divergentes; SM3-CAR-T não reconheceu de maneira satisfatória as células tumorais, mesmo na presença de IL-12, ao passo que a construção de segunda geração de CAR-T com scFv com maior afinidade para a proteína MUC-1 tumoral, desempenhou uma atividade citotóxica maior. Os achados mostram a importância da escolha de um scFv adequado (YOU et al., 2016). O paciente apresentou uma CRS transitória com aumentos de IL-6 e CRP. Citocinas como IL-6 e TNF- α mantiveram-se elevadas no dia 21 após a infusão das CAR-Ts, mas não foi possível identificar se esse aumento das citocinas foi ocasionado pela construção SM3-CAR-T ou pSM3-CAR-T (YOU et al., 2016), mas sabe-se que uma das construções foi suficiente para estimular a resposta imune do paciente (YOU et al., 2016). A maior parte das células tumorais onde foram injetados pSM3-CAR-Ts perderam a expressão do antígeno MUC1, indicando um processo de apoptose das células tumorais (YOU

et al., 2016). Com esses achados, a construção pSM3-CAR-Ts apresentou melhor atividade antitumoral do que a SM3-CAR-T (YOU et al., 2016). XU et al (2020) apresenta um caso de neuroblastoma com amplificação *MYCN* em um paciente de 55 meses de idade, cuja administração de uma única dose de CAR-T anti GD2 de quarta geração foi suficiente para observar condição de doença estacionária, onde não foram encontradas células tumorais na sua medula óssea e apresentou MRD negativo. O paciente sobreviveu por mais de 4 anos, indicando que a construção CD2-CAR-T é uma opção viável para o tratamento e sobrevida de pacientes com neuroblastoma com expressão aumentada do gene *MYCN*. *MYCN* é um gene da família de proto-oncogenes, denominada *MYC*, que codifica um fator de transcrição N-MYC (LIU et al., 2021) A amplificação deste gene foi identificada em 20%-25% dos neuroblastomas, e ocorre por instabilidade genética (LIU et al., 2021). N-MYC é capaz de ativar genes importantes para a tumorigênese de neuroblastoma, mas os efeitos oncogênicos deste fator de transcrição também foram relatados em glioblastoma, meduloblastoma, astrocitomas, entre outros (LIU et al., 2021).

No presente trabalho, foi observado que, os maiores desafios no tratamento de CAR-Ts em tumores consistem, ainda, nos efeitos adversos e possíveis toxicidades observadas após a infusão das CAR-Ts, sobretudo em tumores sólidos. Nestes tumores, vale ressaltar os grandes desafios atuais como: efeito *on-target off-tumor*, CRS e ICANS e a dificuldade do tratamento quando levados em consideração fatores presentes no milieu tumoral como: heterogeneidade celular (em alguns casos), microambiente tumoral altamente imunossupressivo, barreiras físicas que impedem ou dificultam a infiltração linfocitária das CAR-Ts, baixa quantidade de moléculas de adesão para linfócitos T, condições como hipóxia, presença de macrófagos associados a tumores (TAMs), T_{regs}, dentre outras.

Desta forma, como observado nos testes *in vitro* e *in vivo*, o presente trabalho mostrou o grande potencial das CAR-Ts para o tratamento de tumores, e reitera a importância de estudos mais aprofundados para garantir uma maior ativação, segurança e eficácia das CARTs e resolver integralmente ou parcialmente os desafios encontrados nessa nova terapia.

7. CONCLUSÃO

Todos os pacientes que apresentavam B-ALL eram crianças e foram tratadas com CD19-CAR-T, o que sugere um alvo promissor para o tratamento de malignidades hematológicas. Ademais, construções que marcavam receptores CD19 e/ou CD22 apresentaram

resultados promissores, indicando que scFv construídos *in tandem* podem evitar ou dificultar o surgimento de recidivas ocasionadas pela perda da expressão de um dos alvos.

Para tratamento de mieloma múltiplo, CAR-Ts anti-BCMA tem demonstrado bastante eficácia e segurança e apresentam-se como uma ferramenta terapêutica de grande interesse. Mais estudos devem ser feitos para desenvolvimento e aprimoramento de CAR-Ts anti-BCMA.

As construções de CAR-Ts para tratamento de tumores sólidos marcando proteínas tumorais MUC-1, EGFR, GD2, MSLN apresentaram resultados positivos nos respectivos tumores sólidos tratados. Devido à MUC-1 possuir um padrão de glicosilação diferente em células tumorais; e ser expressa tanto em tumores sólidos quanto hematológicos, tornam este alvo bastante promissor. No entanto, mais estudos devem ser realizados para desenvolvimento de CAR-Ts anti-MUC-1.

Para evitar a rejeição por CAR-Ts contendo fragmentos de origem murina, scFv humanizados devem ser escolhidos primeiramente. Novos estudos devem ser realizados para verificar a importância de um regime de linfodepleção mais intensivo antes da administração da primeira dose de CAR-Ts contendo fragmentos murinos como meio de garantir pouca rejeição às CAR-Ts em segundas doses.

A associação de imunoterápicos como bloqueadores de *checkpoint* imunológico, anti-PD-1 ou anti-PDL-1, administrados concomitantemente às CAR-Ts ou secretado pelas CAR-Ts, apresentam-se como ferramentas bastante promissoras para o tratamento de tumores hematológicos e sólidos que sejam PD-1⁺.

A maioria dos tratamentos de tumores dos tumores sólido (3/4) foram reportados em adultos e somente um único caso infantil (1/4) foi reportado. No caso infantil apenas uma dose foi necessária para atingir remissão completa no neuroblastoma, esses dados sugerem que são necessários mais estudos com células CAR-T em crianças que apresentam tumores sólidos.

Apesar dos desafios, a CARTs são uma terapia promissora e inovadora para o tratamento de malignidades.

8. BIBLIOGRAFIA

ABBOTT, Maura; USTOYEV, Yelena. Cancer and the immune system: the history and background of immunotherapy. In: Seminars in oncology nursing. WB Saunders, 2019. p. 150923.

ALNEFAIE, Alaa et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cells: An Overview of Concepts, Applications, Limitations, and Proposed Solutions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, p. 976, 2022.

ARMITAGE, James O. et al. Non-hodgkin lymphoma. *The lancet*, v. 390, n. 10091, p. 298-310, 2017.

AVANZI, Mauro P. et al. Engineered tumor-targeted T cells mediate enhanced anti-tumor efficacy both directly and through activation of the endogenous immune system. *Cell reports*, v. 23, n. 7, p. 2130-2141, 2018.

BABAK, Moghimi; BARRETT, David. CAR T Cells for Solid Tumors. *Current Stem Cell Reports*, v. 3, n. 4, p. 269-278, 2017.

BONIFANT, Challice L. et al. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy-Oncolytics*, v. 3, p. 16011, 2016.

BRETHON, Benoît et al. Case Report: Targeting 2 Antigens as a Promising Strategy in Mixed Phenotype Acute Leukemia: Combination of Blinatumomab With Gemtuzumab Ozogamicin in an Infant With a KMT2A-Rearranged Leukemia. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 255, 2021.

BRUDNO, Jennifer N.; KOCHENDERFER, James N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management. *Blood reviews*, v. 34, p. 45-55, 2019.

CAMICIA, Rosalba; WINKLER, Hans C.; HASSA, Paul O. Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review. *Molecular cancer*, v. 14, p. 1-62, 2015.

CARLSON, Robert D.; FLICKINGER JR, John C.; SNOOK, Adam E. Talkin'toxins: from Coley's to modern cancer immunotherapy. *Toxins*, v. 12, n. 4, p. 241, 2020.

CARUANA, Ignazio et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirectioned T lymphocytes. *Nature medicine*, v. 21, n. 5, p. 524-529, 2015.

CHMIELEWSKI, Markus; ABKEN, Hinrich. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert opinion on biological therapy*, v. 15, n. 8, p. 1145-1154, 2015.

COPPOLA, Canaan et al. Investigation of the Impact from IL-2, IL-7, and IL-15 on the Growth and Signaling of Activated CD4⁺ T Cells. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 21, p. 7814, 2020.

CRUZ-RAMOS, Marlid; GARCÍA-FONCILLAS, Jesús. CAR-T cell and Personalized Medicine. *Translational Research and Onco-Omics Applications in the Era of Cancer Personal Genomics*, p. 131-145, 2019.

DA VIÀ, Matteo C. et al. Homozygous BCMA gene deletion in response to anti-BCMA CAR T cells in a patient with multiple myeloma. *Nature medicine*, v. 27, n. 4, p. 616-619, 2021.

DAI, Hanren et al. Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 108, n. 7, p. djv439, 2016.

DHANI, Neesha et al. The clinical significance of hypoxia in human cancers. In: *Seminars in nuclear medicine*. WB Saunders, 2015. p. 110-121.

EL CHAER, Firas et al. Relapsed Philadelphia chromosome-positive pre-B-ALL after CD19-directed CAR-T cell therapy successfully treated with combination of blinatumomab and ponatinib. *Acta Haematologica*, v. 141, n. 2, p. 107-110, 2019.

FABRIZIO, Vanessa A.; CURRAN, Kevin J. Clinical experience of CAR T cells for B cell acute lymphoblastic leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, p. 101305, 2021.

FANG, Juemin et al. α PD-1-mesoCAR-T cells partially inhibit the growth of advanced/refractory ovarian cancer in a patient along with daily apatinib. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, v. 9, n. 2, 2021.

FENG, Jia et al. Treatment of aggressive t cell lymphoblastic lymphoma/leukemia using anti-CD5 CAR T cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, p. 1-10, 2021.

FENG, Kai-chao et al. Cocktail treatment with EGFR-specific and CD133-specific chimeric antigen receptor-modified T cells in a patient with advanced cholangiocarcinoma. *Journal of hematology & oncology*, v. 10, p. 1-11, 2017.

FRAIETTA, Joseph A. et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nature medicine*, v. 24, n. 5, p. 563-571, 2018.

GARGETT, Tessa; BROWN, Michael P. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Frontiers in pharmacology*, v. 5, p. 235, 2014.

GAUTHIER, Jordan et al. Factors associated with outcomes after a second CD19-targeted CAR T-cell infusion for refractory B-cell malignancies. *Blood*, v. 137, n. 3, p. 323-335, 2021.

GRAHAM, Charlotte et al. Cancer immunotherapy with CAR-T cells—behold the future. *Clinical Medicine*, v. 18, n. 4, p. 324, 2018.

GREAVES, Mel. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 8, p. 471-484, 2018.

HANSEN, Doris; DAM, Marian; FARAMAND, Rawan G. Toxicities associated with adoptive cellular therapies. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, p. 101287, 2021.

HARADHVALA, Nicholas J. et al. Distinct cellular dynamics associated with response to CAR-T therapy for refractory B-cell lymphoma. *medRxiv*, 2022.

HASLAUER, Theresa et al. CAR T-cell therapy in hematological malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 16, p. 8996, 2021.

HEARD, Amanda et al. Antigen glycosylation regulates efficacy of CAR T cells targeting CD19. *Nature communications*, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2022.

HIRAYAMA, Alexandre V.; TURTLE, Cameron J. Toxicities of CD19 CAR-T cell immunotherapy. *American Journal of Hematology*, v. 94, n. S1, p. S42-S49, 2019.

HOU, Bin et al. Efficiency of CAR-T therapy for treatment of solid tumor in clinical trials: a meta-analysis. *Disease markers*, v. 2019, 2019.

HUANG, Jiawen; HUANG, Xiaobing; HUANG, Juan. CAR-T cell therapy for hematological malignancies: Limitations and optimization strategies. *Frontiers in immunology*, p. 5799, 2022.

HUDSON, Katie et al. The extrinsic and intrinsic roles of PD-L1 and its receptor PD-1: implications for immunotherapy treatment. *Frontiers in immunology*, p. 2362, 2020.

INABA, Hiroto; MULLIGHAN, Charles G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, v. 105, n. 11, p. 2524, 2020.

IRVINE, Darrell J. et al. The future of engineered immune cell therapies. *Science*, v. 378, n. 6622, p. 853-858, 2022.

KAGOYA, Yuki et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK–STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nature medicine*, v. 24, n. 3, p. 352-359, 2018.

KALAITSIDOU, Milena et al. CAR T-cell therapy: toxicity and the relevance of preclinical models. *Immunotherapy*, v. 7, n. 5, p. 487-497, 2015.

KANG, Chung Hyo et al. Identification of potent CD19 scFv for CAR T cells through scFv screening with NK/T-cell line. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 23, p. 9163, 2020.

KARSCHNIA, Philipp et al. Clinicopathologic findings in fatal neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19-directed CAR T-cells. *Hemasphere*, v. 5, n. 3, 2021.

LARSON, Rebecca C.; MAUS, Marcela V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 21, n. 3, p. 145-161, 2021.

LEE, Daniel W. et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 25, n. 4, p. 625-638, 2019.

LEICK, Mark B.; MAUS, Marcela V. Toxicities associated with immunotherapies for hematologic malignancies. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 31, n. 2, p. 158-165, 2018.

LEROY, Emilie; CONSTANTINESCU, Stefan N. Rethinking JAK2 inhibition: towards novel strategies of more specific and versatile janus kinase inhibition. *Leukemia*, v. 31, n. 5, p. 1023-1038, 2017.

LI, Xinghuo et al. Cytokine IL-36 γ improves CAR T-cell functionality and induces endogenous antitumor response. *Leukemia*, v. 35, n. 2, p. 506-521, 2021.

LIU, Hui et al. CD19-specific CAR T Cells that Express a PD-1/CD28 Chimeric Switch-Receptor are Effective in Patients with PD-L1-positive B-Cell Lymphoma A Novel CD19 CAR T Therapy for B-Cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, v. 27, n. 2, p. 473-484, 2021.

LIU, Ruochen et al. Molecular mechanisms of MYCN dysregulation in cancers. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 625332, 2021.

MAMONKIN, Maksim et al. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 126, n. 8, p. 983-992, 2015.

MARKS-KONCZALIK, Joanna et al. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 21, p. 11445-11450, 2000.

MOGHANLOO, Ehsan et al. Remote controlling of CAR-T cells and toxicity management: Molecular switches and next generation CARs. *Translational Oncology*, v. 14, n. 6, p. 101070, 2021.

MOHANTY, Rimjhim et al. CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment. *Oncology reports*, v. 42, n. 6, p. 2183-2195, 2019.

MOSKOP, Amy et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for marrow and extramedullary relapse of infant acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 68, n. 1, p. e28739, 2021.

MULAZZANI, Matthias et al. Long-term in vivo microscopy of CAR T cell dynamics during eradication of CNS lymphoma in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 48, p. 24275-24284, 2019.

MUNGER, William et al. Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cellular immunology*, v. 165, n. 2, p. 289-293, 1995.

NAIR, Ranjit; WESTIN, Jason. Car T-cells. *Immunotherapy*, p. 215-233, 2020.

NAIR, Sushmita et al. Functional improvement of chimeric antigen receptor through intrinsic interleukin-15R α signaling. *Current Gene Therapy*, v. 19, n. 1, p. 40-53, 2019.

NEELAPU, Sattva S. et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy—assessment and management of toxicities. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 15, n. 1, p. 47-62, 2018.

PAN, Kevin et al. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2022.

PARKER, Kevin R. et al. Single-cell analyses identify brain mural cells expressing CD19 as potential off-tumor targets for CAR-T immunotherapies. *Cell*, v. 183, n. 1, p. 126-142. e17, 2020.

PEGGRAM, Hollie J. et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 119, n. 18, p. 4133-4141, 2012.

PICANÇO-CASTRO, Virginia et al. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Consensus on genetically modified cells. VIII: CAR-T cells: preclinical development-Safety and efficacy evaluation. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 43, p. 54-63, 2021.

RAFIQ, Sarwish; HACKETT, Christopher S.; BRENTJENS, Renier J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 17, n. 3, p. 147-167, 2020.

RAMOS, Rodrigo Nalio et al. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Consensus on genetically modified cells. VII. Present and future of technologies for

production of CAR cell therapies. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 43, p. 46-53, 2021.

RAZAVI, Azadeh Sadat et al. The signaling and the metabolic differences of various CAR T cell designs. *International Immunopharmacology*, v. 114, p. 109593, 2023.

RUBIN, Daniel B. et al. Neurological toxicities associated with chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Brain*, v. 142, n. 5, p. 1334-1348, 2019.

RUBIN, Daniel B.; VAITKEVICIUS, Henrikas. Neurological complications of cancer immunotherapy (CAR T cells). *Journal of the Neurological Sciences*, p. 117405, 2021.

SANTOMASSO, Bianca et al. The other side of CAR T-cell therapy: cytokine release syndrome, neurologic toxicity, and financial burden. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, v. 39, p. 433-444, 2019.

SHAFER, Paul; KELLY, Lauren M.; HOYOS, Valentina. Cancer therapy with TCR-engineered T cells: Current strategies, challenges, and prospects. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 2022.

SHAH, Nina et al. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*, v. 34, n. 4, p. 985-1005, 2020.

SHAH, Nirali N.; FRY, Terry J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 16, n. 6, p. 372-385, 2019.

SILVA, Estela Vieira de Souza et al. Elucidando a imunovigilância e imunoedição tumoral: uma revisão abrangente. *Ciência Animal Brasileira*, v. 22, 2021.

SINGH, Anurag K.; MCGUIRK, Joseph P. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy. *The Lancet Oncology*, v. 21, n. 3, p. e168-e178, 2020.

SMITH, Eric L. et al. Development and evaluation of an optimal human single-chain variable fragment-derived BCMA-targeted CAR T cell vector. *Molecular Therapy*, v. 26, n. 6, p. 1447-1456, 2018.

STERNER, Robert C.; STERNER, Rosalie M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood cancer journal*, v. 11, n. 4, p. 1-11, 2021.

SUN, Yimo et al. Evolution of CD8⁺ T cell receptor (TCR) engineered therapies for the treatment of cancer. *Cells*, v. 10, n. 9, p. 2379, 2021.

TAN, Yue et al. Toxicity and effectiveness of CD19 CAR T therapy in children with high-burden central nervous system refractory B-ALL. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 70, p. 1979-1993, 2021.

TAO, Qianshan et al. IL-15 improves the cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against leukemia cells by upregulating CD3⁺ CD56⁺ cells and downregulating regulatory T cells as well as IL-35. *Journal of immunotherapy*, v. 36, n. 9, p. 462-467, 2013.

THANDRA, Krishna C. et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Medical Sciences*, v. 9, n. 1, p. 5, 2021.

TURTLE, Cameron J. et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8⁺ and CD4⁺ CD19-specific chimeric antigen receptor–modified T cells. *Science translational medicine*, v. 8, n. 355, p. 355ra116-355ra116, 2016

VANDGHANOONI, Somayeh et al. Recent advances in the production, reprogramming, and application of CAR-T cells for treating hematological malignancies. *Life Sciences*, p. 121016, 2022.

WALDMANN, Thomas A. The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy. *Cancer immunology research*, v. 3, n. 3, p. 219-227, 2015.

WANG, Yeying et al. Mesothelin CAR-T cells secreting PD-L1 blocking scFv for pancreatic cancer treatment. *Cancer Genetics*, v. 268, p. 103-110, 2022.

WEINKOVE, Robert et al. Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. *Clinical & translational immunology*, v. 8, n. 5, p. e1049, 2019.

WU, Qian et al. Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 42, n. 1, p. 1-9, 2021.

XU, Xiao et al. 4SCAR-GD2-modified T-cell therapy in neuroblastoma with MYCN amplification: A case report with over 4-year follow-up data. *Pediatric Investigation*, v. 4, n. 01, p. 55-58, 2020.

YANG, Fei-Fei et al. Histone deacetylases (HDACs) as the promising immunotherapeutic targets for hematologic cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 245, p. 114920, 2023.

YÁÑEZ, Lucrecia; SÁNCHEZ-ESCAMILLA, Miriam; PERALES, Miguel-Angel. CAR T cell toxicity: current management and future directions. *Hemasphere*, v. 3, n. 2, 2019.

YEKU, Oladapo O. et al. Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

YOU, Fengtao et al. Phase 1 clinical trial demonstrated that MUC1 positive metastatic seminal vesicle cancer can be effectively eradicated by modified Anti-MUC1 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Science China Life Sciences*, v. 59, p. 386-397, 2016.

ZHANG, Jiqin et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL. *Nature*, v. 609, n. 7926, p. 369-374, 2022.

ZHANG, Xin-Yue et al. Identification of STRBP as a Novel JAK2 Fusion Partner Gene in a Young Adult With Philadelphia Chromosome-Like B-Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 611467, 2021.

ZHU, Yang-min et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for adult Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: two case reports. *Medicine*, v. 95, n. 51, 2016.