



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINA DIAS CARLOS

**ENGENHARIA DE LINFÓCITOS T PARA O
RECONHECIMENTO DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

CAMPINAS
2020

CAROLINA DIAS CARLOS

**ENGENHARIA DE LINFÓCITOS T PARA O RECONHECIMENTO DA
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em Biologia Funcional e Molecular na
área de Fisiologia.*

Orientador: PEDRO OTAVIO DE CAMPOS LIMA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA CAROLINA DIAS CARLOS,
ORIENTADA PELO PROF. DR. PEDRO
OTAVIO DE CAMPOS LIMA

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D543e Dias-Carlos, Carolina, 1983-
Engenharia de linfócitos T para o reconhecimento da leucemia linfóide aguda / Carolina Dias Carlos. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Pedro Otavio de Campos Lima.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Leucemia. 2. Imunoterapia. 3. Receptores de antígenos quiméricos. I. de Campos-Lima, Pedro Otavio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: T lymphocyte engineering for the recognition of acute lymphoid leukemia

Palavras-chave em inglês:

Leukemia

Immunotherapy

Receptors, Chimeric antigen

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Pedro Otavio de Campos Lima [Orientador]

José Andrés Yunes

Sang Won Han

Fabio Cesar Gozzo

Jane Zveiter de Moraes

Data de defesa: 29-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0491-6254>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6312167103693738>

Campinas, 29/ 01/ 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Otavio de Campos Lima

Prof. Dr. José Andrés Yunes

Prof. Dr. Sang Won Han

Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo

Prof. Dra. Jane Zveiter de Moraes

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Funcional Molecular da Unidade do Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), pelo suporte técnico-científico;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a qual proporcionou o financiamento deste projeto (processo nº 2015/03009-4) de quatro anos de bolsa de estudos e reserva técnica, contribuindo muito para minha formação acadêmica, para a ciência brasileira e para os pacientes com leucemia;

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, pela oportunidade de realização do meu Doutorado;

Aos professores credenciados pelo curso que ministraram as disciplinas as quais pude participar e que muito contribuíram para minha formação;

Ao meu orientador Dr. Pedro Otávio de Campos Lima, pela oportunidade oferecida de crescimento profissional, pessoal, pelas orientações essenciais a esse trabalho e à minha formação.

A todos os amigos do Centro de Pesquisa Boldrini que foram tão companheiros em momentos felizes, tristes, de desabafos, de happy hour, de café, trocando idéias profissionais, crescemos juntos e com certeza tornaram minha caminhada mais leve possível. Aninha, Mônica, Patrícia Jotta, Bruna, Seleny, Lílían, Carol Lopes, Mariana, Priscila, Livia, Natacha, Nathália Cury, Juliana, Mayara, Natália Paiva, Leo, Pedro Zeni, Juan, Diego, Zé, Rafael, Lisandra e Juliana Ruas.

Agradeço ao Dr. Andrés Yunes que disponibilizou por três anos e meio seu laboratório ao nosso grupo de pesquisa, para conseguirmos desenvolver o projeto, e de quebra ainda ganhamos o seu companheirismo, bom humor e amizade de seus “filhos”.

Agradeço à direção do Centro Infantil Boldrini, principalmente à Dra. Silvia, que proporciona e disponibiliza toda a estrutura necessária, acreditando na importância do desenvolvimento da pesquisa brasileira e nos dá a oportunidade de desenvolvermos uma ciência séria que tem por objetivo comum tentarmos melhorar a qualidade de vida dos pacientes com leucemia.

À equipe de enfermagem do Centro Infantil Boldrini, em especial Carina e Hislã, por suas habilidades, atenção e me aguentarem na coleta de sangue que precisei inúmeras vezes.

Aos meus pais, que sempre fizeram o possível e impossível para me ajudarem nesta longa jornada, desde a ajuda financeira, mudança de cidade e principalmente o suporte com meu filho Arthur, nas inúmeras vezes que precisei trabalhar nos finais de semana, feriado, de noite...e abdicaram muitas vezes dos seus confortos, para me ajudar!! Sem vocês a realização deste Doutorado não seria possível. Posso agradecer a vida toda e não poderei retribuir tudo isto...muuuuuuito obrigada por tuuuudo!!

Agradeço ao meu filho Arthur por ter aguentado a rotina doida de uma mãe cientista, e mesmo assim poucas vezes ouvi você reclamar, sempre tem um sorriso alegre, contagiante que me dá forças para seguir em frente, mesmo quando tudo parecia ser impossível! E com a sabedoria de um menino de 4 anos, à época, me disse uma vez..."tenta outra vez mamãe, você vai conseguir!!" Muito obrigada filho, seguiremos juntos sempre!

Agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram e conviverem comigo, meus sinceros agradecimentos!!!!

À Deus por ter me permitido chegar até aqui, sem me desamparar, me dando forças para vencer os obstáculos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito Obrigada!!!!

“Quando os nossos dias se tornarem obscurecidos por nuvens negras e baixas, quando as nossas noites forem mais negras do que mil noites. Lembremo-nos, que no universo a um grande e benigno poder, que é capaz de abrir caminho onde não há caminho, e de transformar o ontem sombrio num luminoso amanhã”

Martin Luther King

RESUMO

Introdução: A leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer mais comum em crianças, representando 31% de todos os tumores. O tratamento convencional em crianças com LLA baseia-se em regimes quimioterapêuticos que vêm apresentando bons resultados com taxas de cura em torno de 80 a 90%. Apesar disto, 10-20% das crianças apresentam falha da resposta à terapia de primeira linha, bem como a ocorrência de recidiva da doença. A imunoterapia com linfócitos T geneticamente modificados tem mostrado resultados promissores para o tratamento das recidivas. Nesta abordagem, um receptor quimérico (CAR) é expresso nos linfócitos T para reprogramar sua especificidade. Todavia, existem alguns aspectos limitantes para incorporá-la à conduta terapêutica regular, como: a grande quantidade de cada vetor a ser produzida, o número elevado de células a serem transduzidas, não obstante a expansão *in vivo*, o custo elevado da produção/purificação de vetores e transdução de linfócitos e susceptibilidade a apoptose dos linfócitos injetados, principalmente em um microambiente tumoral. **Objetivo:** Diante disso, propusemos otimizar a utilização da via glicolítica dos linfócitos usados em imunoterapia (CAR anti-CD19), de forma a uniformizar e melhorar o perfil bioenergético, tornando estes linfócitos mais eficazes na resposta e vida efetora útil. **Métodos:** Em nossa estratégia, linfócitos T foram modificados geneticamente *ex vivo* com vetores lentivirais para induzir a expressão simultânea de um receptor quimérico (CAR) anti-CD19 e do transportador de glicose GLUT1. Estas células reprogramadas foram estudadas em testes de função efetora *in vitro*. **Resultados:** Obtivemos sucesso na expressão do CAR anti-CD19 na superfície dos linfócitos T, com boas taxas de transdução entre 40 e 70%. A população de linfócitos T modificada com o CAR anti-CD19-GLUT1 possui uma expressão aumentada do transgene GLUT1 na membrana, gerando uma maior internalização de glicose. Estes linfócitos também apresentaram maior utilização da via glicolítica, maior respiração basal, capacidade máxima de respiração e reserva respiratória aumentadas. Há um aumento na produção de INF- γ e uma atividade efetora citotóxica específica capaz de reconhecer e eliminar o alvo leucêmico CD19⁺. Observou-se também uma maior resistência a apoptose em condições limitantes de glicose e uma maior vantagem proliferativa em resposta ao estímulo com a célula-alvo Nalm-6. **Conclusões:** A análise global dos resultados indica que a coexpressão do transportador de glicose GLUT1 com o receptor quimérico anti-CD19, promove uma vantagem bioenergética, produzindo um perfil de atividade efetora mais eficaz e talvez torne esta imunoterapia celular mais acessível aos pacientes com leucemia. No entanto, esta abordagem deve ser testada primeiramente *in vivo*, antes de considerada sua relevância clínica.

ABSTRACT

Introduction: Acute lymphoid leukemia (ALL) is the most common form of childhood cancer, representing 31% of all tumors. The conventional treatment in children with ALL is based on chemotherapeutic regimens which have been presenting good results with cure rates around 80% to 90%. Despite this, 10-20% of the children present failure of response to the first category therapy, as well as the occurrence of disease relapse. The immunotherapy with genetically modified T-cells has been shown promising results to the relapse treatment. However, there are some limiting aspects to incorporate it to the regular therapeutic conduct, such as: the great amount of vector to be produced, the elevated number of cells to be transduced, notwithstanding the *in vivo* expansion, the elevated cost of the vectors production/purification and lymphocytes transduction and susceptibility to apoptosis of the injected lymphocytes, specially in a tumoral microenvironment. **Objective:** Before that, we proposed to optimize the use of the glycolytic pathway of these anti-CD19 CAR T-cells, in order to standardize and improve the bioenergetic profile, making these lymphocytes more effective in responding and effector useful life. **Methods:** In our strategy, T-cells were genetically modified *ex vivo* with lentivirals to induce CAR anti-CD19 expression and the glucose transport Glut-1. Those reprogrammed cells were studied in effector function tests *in vitro*. **Results:** We succeeded in the CAR anti-CD19 expression in the T-cells surface, with good transduction rates between 40 and 70%. The T-cells population modified with CAR anti-CD19-GLUT1 owns an increased expression of the GLUT1 transgene in the membrane, generating a bigger internalization of the glucose. These lymphocytes also exhibited increased utilization of the glycolytic pathway, increased basal respiration, maximum respiration capacity and respiratory reserve. There was increase in INF- γ production and proved to be with a specific cytotoxic effector activity acknowledging and eliminating the leukemic target CD19⁺. They also showed a bigger apoptosis resistance in glucose limiting conditions and a bigger proliferative advantage in response to stimulus with the target cell Nalm-6. **Conclusions:** A global analysis of the results indicates that the coexpression of the glucose conveyor GLUT1 with the chimeric receptor anti-CD19, promotes a bioenergetic advantage, producing a more efficient effector activity profile and may make this cellular immunotherapy more accessible to leukemia patients. However, this approach should be tested *in vivo* its clinical relevance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	12
1.2 Sistema imunológico de defesa e o Câncer	13
1.3. Bioenergética da imunovigilância antitumoral	15
1.4 Sucesso e limitações das estratégias terapêuticas para a LLA	18
1.5 Imunoterapia Tumoral	20
1.5.1 Imunoterapia com anticorpos monoclonais	20
1.5.2 Imunoterapia Celular	21
1.5.2.1 Linfócitos infiltrates de tumor (TIL)	21
1.5.2.2 Receptores quiméricos de antígenos (CARs)	22
1.6 Antígeno Alvo	26
1.7 Justificativa do projeto	27
1.8 Hipótese	27
2. OBJETIVO GERAL	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Engenharia de linfócitos T – desenho e produção de vetores de transferência gênica	29
3.2 Transformação bacteriana e recuperação do DNA plasmidial	32
3.3 Sequenciamento dos plasmídeos vetoriais	32
3.4 Linhagens celulares	33
3.5 Transfecção transiente e concentração lentiviral	34
3. 6 Titulação viral	35
3.7 Produção e titulação das partículas lentivirais	35
3.8 Isolamento e ativação de linfócitos T primários	38
3.9 Transdução da linhagem leucêmica Jurkat e células T primárias com vetores lentivirais	39
3.10 Detecção dos transgenes por citometria de fluxo	40
3.11 Perfil expressão do receptor quimérico por imunofluorescência	40
3.12 Análise por Western Blot	40
3.13 Ensaio de internalização de glicose	41
3.14 Ensaio de formação de sinapses imunológicas	42
3.15 Ensaio da atividade metabólica	42

3.16 Avaliação da produção de INF- γ	45
3.17 Ensaio de citotoxicidade dos linfócitos T <i>in vitro</i>	45
3.18 Ensaio de apoptose celular	46
3.19 Ensaio de proliferação de linfócitos T primários	46
3.20 Análises estatísticas	47
4. RESULTADOS	48
4.1 Otimização e caracterização da expressão do CAR anti-CD19.....	48
4.2 Caracterização da expressão do CAR anti-CD19 por microscopia confocal	51
4.3 Nível de expressão diferencial de Glut-1 nos linfócitos T modificados por citometria de fluxo e western blot	51
4.4 Efeito da expressão aumentada de Glut-1 sob a internalização de glicose em linfócitos T modificados	54
4.5 Ensaio funcional para avaliar a formação de sinapses	55
4.6 Bioenergética dos linfócitos T CAR modificados	56
4.7 Avaliação da função efetora antineoplásica dos linfócitos T modificados <i>in vitro</i> ...	59
4.7.1 Linfócitos T que expressam o CAR anti-CD19-Glut potencializam a liberação de INF- γ em resposta ao antígeno	59
4.7.2 Efeito antineoplásico de linfócitos T primários humanos CAR anti-CD19 ⁺ <i>in vitro</i>	60
4.7.3 A expressão transgênica de Glut-1 aumenta a sobrevivência dos linfócitos T CAR em condições de stress metabólico	63
4.7.4 Avaliação da proliferação celular de linfócitos T primários modificados <i>in vitro</i>	64
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8. ANEXOS	93
8.1 Anexo I: Termo de Sigilo	93
8.2 Anexo II: Parecer da Comissão Interna de Biossegurança	95
8.3 Anexo III: Declaração de direitos autorais	96

1. Introdução

1.1. Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de doenças neoplásicas do sistema hematopoiético que estão associadas a importante morbidade e mortalidade em pacientes de até 18 anos (Tower e Spector, 2007). A leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer mais comum em crianças, representando 31% de todos os tumores (Pui *et al.*, 2011). E é responsável por mais de três quartos de todas as leucemias infantis (Siegel *et al.*, 2013). Seu pico de incidência se apresenta em torno de 2 a 5 anos (Inaba *et al.*, 2013). A LLA se caracteriza por uma proliferação desregulada de células sanguíneas precursoras de origem linfóide (Han *et al.*, 2010), levando a um acúmulo de células imaturas na medula óssea, no sangue periférico e em alguns casos no sistema nervoso central, resultando em anemia, neutropenia, trombocitopenia, sangramento e infecções (Loh e Mullighan, 2012).

A leucemia infantil, assim como outros cânceres, é produto de múltiplas alterações moleculares ativadoras de oncogenes e/ou inativadoras de genes supressores tumorais. Estas células transformadas adquirem vantagens seletivas sobre as células normais e possuem capacidade de proliferação ilimitada e de evadir os mecanismos de apoptose, além de serem insensíveis aos sinais antiproliferativos fisiológicos (Hanahan e Weinberg, 2011). Sabe-se que a proliferação desregulada das células leucêmicas possui causas multifatoriais exógenas ou endógenas (Inaba *et al.*, 2013). São exemplos de estímulos leucemogênicos a radiação ionizante, a quimioterapia e as condições que produzem anormalidades cromossômicas (Roman e Beral, 1991). A susceptibilidade genética intrínseca de cada paciente pode também ser fator determinante para a instauração da doença (Inaba *et al.*, 2013).

No caso da LLA, essas alterações moleculares ocorrem predominantemente no estado imaturo linfocítico pré-B, em crianças de 2 a 10 anos. Os principais defeitos cromossômicos observados em blastos leucêmicos são ganhos ou perdas de cromossomos e/ou translocações (Lo Nigro, 2013). Todavia, estudos realizados com sangue de cordão umbilical de crianças saudáveis mostraram que as translocações TEL-AML1 podem ocorrer em 1% ou mais das células normais (Wiemels, 2012). Isto sugere que uma significativa proporção da população carrega clones pré-leucêmicos e a vasta maioria destes clones não produz nenhuma doença (Lo Nigro, 2013). Este paradoxo pode ser explicado pela imunovigilância antitumoral.

1.2 Sistema imunológico de defesa e o Câncer

O sistema imune é composto por dois componentes primários interdependentes e interconectados – a imunidade inata e adaptativa (Delves e Roitt, 2000; Mackall e Sondel 2010). Ambas são responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de células portadoras de defeitos genéticos que produzem o fenótipo do câncer (Wayne, Capitini e Mackall, 2010). O sistema imune inato inclui elementos celulares, (monócitos, macrófagos, granulócitos, células *Natural Killer* (NK), células T NK, linfócitos $\gamma\delta$ e barreiras epiteliais) bem como seus produtos solúveis de ação efetora e/ou moduladora como quimio/citocinas. Este braço ancestral do sistema imune exerce uma função primária na defesa do organismo contra infecções e câncer (Hahn e Liewehr, 2007), sem requerer uma exposição prévia ao antígeno-alvo (Wayne, Capitini e Mackall, 2010). A disfunção do sistema imune inato, como exemplo pelas células NK, pode favorecer a leucemogênese (Ureshino et al., 2020).

Uma vez que o sistema imune inato falhe, uma segunda linha de defesa entra em ação. O sistema imune adaptativo representa uma complexa rede de sinais eferentes, aferentes e efetores responsáveis pela manutenção da imunidade em longo prazo contra patógenos infecciosos e antígenos estranhos. O braço da resposta adaptativa humoral é constituído por linfócitos-B, que são responsáveis pela produção de anticorpos, enquanto a imunidade adaptativa celular é mediada primariamente por células T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. Estes últimos são especialmente importantes na imunovigilância antitumoral (Wayne, Capitini e Mackall, 2010).

Os linfócitos T CD8⁺ efetores são células com função citotóxica, sendo diretamente responsáveis pela eliminação da célula-alvo, através da liberação de perforinas e granzimas. Estes linfócitos, após encontro com o antígeno, podem gerar duas populações de células de memória capazes de responder rapidamente ao reestímulo (Chang, Wherry e Goldrath, 2014). Os linfócitos de memória central são definidos pela presença na membrana das moléculas CD45RO, CD62L e CCR7 e, apesar de possuírem uma grande capacidade de proliferação e migração para o linfonodo, não possuem capacidade efetora imediata. Os linfócitos de memória efetora são CD45RO⁺ e negativos para CD62L e CCR7. Apresentam atividade efetora imediata, mas pouca capacidade de proliferação. Os linfócitos T CD4⁺, após reconhecimento do antígeno e ativação, produzem citocinas que são capazes de modular a atividade de outras células, como linfócitos T CD8⁺, macrófagos e células B. Além disso, estas células podem se diferenciar em quatro subpopulações principais com diferentes fenótipos e funções (De Obaldia e Bhandoola, 2015).

A população Th1 produz citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , tendo um papel crucial

na resposta contra vírus e patógenos intracelulares, além de aumentar a função das células T CD8⁺. A população Th2 está envolvida em processos de alergia, ativação de eosinófilos e células B. A população Th17 está envolvida na defesa contra organismos extracelulares, respostas autoimunes e recrutamento de neutrófilos para os sítios de inflamação. Já as células T reguladoras (Treg) estão envolvidas na regulação e supressão de linfócitos através da produção de citocinas, como IL-10 e TGF- β (Nakayamada *et al.*, 2012).

O papel do sistema imune no desenvolvimento tumoral é se insere num processo dinâmico que segue uma linha de evolução composta de três fases: eliminação, equilíbrio e escape. A fase de eliminação é caracterizada pelo reconhecimento e destruição das células pré-neoplásicas e dos tumores iniciais. Na fase de equilíbrio, as células neoplásicas que sobreviveram à eliminação inicial ficam em estado de dormência e são ao longo do tempo moldadas pelo sistema imune, devido à constante eliminação por parte dos linfócitos dos subclones mais susceptíveis. Estudos demonstraram que a manutenção do equilíbrio é dependente de linfócitos T CD4⁺ Th1, CD8 de memória e a evolução para a fase de escape é dependente do processo de edição (Galon *et al.*, 2016; Koebel *et al.*, 2007).

O processo de transformação celular faz com que a célula tumoral tenha uma alta instabilidade genômica, possuindo uma maior propensão ao acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas. Na fase de escape, a constante pressão do sistema imune aliada a esta enorme heterogeneidade tumoral faz com que variantes ou clones tumorais capazes de evitar o reconhecimento e/ou a destruição pelos linfócitos T sejam selecionados, culminando no desenvolvimento da doença (Matsushita *et al.*, 2012). Com relação à célula tumoral, um dos mecanismos de evasão mais frequentes é a perda de antígenos-alvo reconhecidos pelo sistema imune, seja de forma direta (silenciamento epigenético, alteração do quadro de leitura devido a deleções/inserções, etc.) ou indireta (diminuição da expressão de MHC de classe I, desregulação da maquinaria de processamento e apresentação de antígenos etc.). Já no nível de microambiente, o escape geralmente é resultado de mecanismos imunossupressores induzidos pelo tumor, como a secreção dos fatores TGF- β , VEGF e IDO (Hanahan e Coussens, 2012). Com base nestes conhecimentos pode-se concluir que o sistema imune, especialmente os linfócitos T, possuem um importante papel tanto na inibição quanto na progressão do câncer através do reconhecimento direto das células tumorais.

1.3. Bioenergética da imunovigilância antitumoral

A ativação dos linfócitos T se dá classicamente por meio de dois sinais. O primeiro sinal é gerado pelo receptor de células T (TCR) através do reconhecimento de antígenos, sob o formato de peptídeos derivados da degradação de proteínas intracelulares e exibidos na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs) através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Um segundo sinal de co-estimulação pode ser transmitido através de citocinas ou através moléculas co-estimulatórias (CD28/B7) (Delves e Roitt, 2000; Berzofsky *et al.*, 2004). Esta ativação leva a um aumento da proliferação de células T e redução da morte celular (Lu e Finn 2008). Dependendo de como elas respondem à interação com o antígeno, as células T periféricas podem se dividir em três categorias: células T naïve, células T efectoras e células T de memória (MacIver, Michalek e Rathmell, 2013). Os linfócitos T naïve requerem pequenas quantidades de ATP para suportar as atividades celulares de imunovigilância antigênica (Frauworth e Thompson, 2004). Estas células compensam a reduzida captação de substratos energéticos com a eficiência do processo de oxidação de glicose, lipídios e aminoácidos para a produção de ATP (MacIver, Michalek e Rathmell, 2013). Neste processo, os intermediários metabólicos, tais como o piruvato, são inicialmente transformados em acetil-CoA, a qual é convertida no ciclo de Krebs em CO₂ e elétrons livres. Na forma de NADH e FADH₂, os elétrons livres participam das reações oxido-redutivas da cadeia respiratória, culminando com a produção de ATP. Assim, os linfócitos T naïve possuem um perfil metabólico que favorece a produção de energia sobre a biossíntese (Bental e Deutsch, 1993). É estimado que 96% do ATP gerado nestas células provêm da fosforilação oxidativa (Guppy, Grainer e Brand, 1993). Esta via é dependente de oxigênio e produz 36 moléculas de ATP por molécula de glicose (Annunziato e Romagnani, 1993), além de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Fleury, Mignotte e Vayssiere, 2002). As células T naïve requerem um sinal extrínseco para manter seu metabolismo basal, uma vez que não podem ainda contar com uma estimulação antigênica específica. Fatores tróficos do microambiente tais como a interleucina 7 (IL-7) desempenham esse papel. A IL-7 regula a entrada de glicose na célula através de uma proteína de membrana (Glut-1), a qual é modulada pela via PI3K/Akt/mTOR (Wofford *et al.*, 2008). Este processo é crítico para manter a homeostase e prevenir a apoptose (Ruppert *et al.*, 2012).

A ativação do TCR pelo epítipo antigênico leva à expansão clonal dos linfócitos que os prepara para a função efetora. Este processo é sublinhado pela transição do metabolismo energético

para um formato de geração de ATP, a glicólise aeróbica, que é compatível com a rápida proliferação celular, com um fenótipo específico e com a habilidade de erradicar as células tumorais através da produção de citocinas e citotoxicidade (MacIver, Michalek e Rathmell, 2013; Guppy, Grainer e Brand, 1993; Van Stipdonk *et al.*, 2003). A glicólise aeróbica, apesar de ser menos eficiente do que a fosforilação oxidativa, gerando somente 2 ATPs por molécula de glicose, possui a vantagem de limitar a produção de radicais livres e suas consequências sobre a integridade do ADN, senescência e apoptose (Michalek e Rathmell, 2010; Vander Heiden *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007). Outro aspecto da glicólise que favorece a biossíntese de macromoléculas e, portanto, a expansão clonal é a produção de compostos intermediários como a ribose-5-fosfato e glicina (Marelli-Berg *et al.*, 2012). O preço a pagar pela adoção desse processo metabólico menos genotóxico é o aumento da dependência da captação da glicose no microambiente para sustentar a expansão clonal, diferenciação e atividade efetora antitumoral. Portanto, se a captação da glicose não for um fator limitante, o ritmo do fluxo glicolítico produzirá ATP suficiente para a demanda energética das células efetoras (Jones e Thompson, 2007). Além disso, a glicólise não é oxigênio- dependente (Palazon *et al.*, 2012).

Do ponto de vista energético, o primeiro sinal de ativação do linfócito tem efeito pró-glicolítico (Michalek e Rathmell, 2010). O agrupamento do TCR em resposta ao reconhecimento de seu ligando antigênico leva à fosforilação da proteína LAT e à organização do complexo de sinalização proximal, que além de ativar os fatores de transcrição NFAT e NF- κ B, também ativa a cascata das MAP kinases (Van der Merwe e Dushek, 2011; Hogan *et al.*, 2010; Blonska e Lin, 2011; Wang *et al.*, 2011; Cargnello e Roux, 2011). O fator de transcrição c-Myc é um dos alvos da ativação desta cascata enzimática que promove simultaneamente o aumento do transportador de glicose Glut-1 na membrana plasmática e das atividades das enzimas glicolíticas hexoquinase, fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase (Wang *et al.*, 2011; Wise *et al.*, 2008). A perda de função de c-Myc altera o metabolismo do linfócito, comprometendo a expansão clonal das subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ (Wang *et al.*, 2011).

Já o segundo sinal de ativação do linfócito, ou co-estimulação, decorre da interação de moléculas como o CD28 com os ligandos CD80/CD86 (Smith-Garvin *et al.*, 2009). A co-estimulação do CD28 ativa a quinase lipídica PI3K, que por meio de AKT, ativa a serina-treonina proteína-quinase mTOR (Finlay, 2012; Frauwirth *et al.*, 2002; Waickman e Powell, 2012; Chi, 2012). Assim, mTOR eleva a produção de Glut-1, facilita a reciclagem à superfície celular das moléculas de Glut-1 internalizadas e aumenta a atividade da hexoquinase I (HK1), fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase (Finlay, 2012; Frauwirth *et al.*, 2002; Waickman e

Powell, 2012; Heikamp e Powell, 2012). O resultado final é a sinergia com a via de sinalização do TCR no que diz respeito à glicólise (Jacobs *et al.*, 2008; O'Brien *et al.*, 2011). Por outro lado, o estresse microambiental que ocorre na fase final de expansão clonal em resposta a um dado estímulo antigênico leva à escassez de nutrientes como a glicose e à resultante depleção de ATP em favor de AMP (Inoki *et al.*, 2012). Por sua vez, a enzima AMPK, que é ativada pelos elevados níveis de AMP, bloqueia a glicólise através do aumento da captação de ácidos graxos e da inibição de mTOR (Inoki *et al.*, 2012; Buzzai *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005). Outra causa de bloqueio do programa pró-glicolítico é a redução da disponibilidade de fatores tróficos na fase de contração clonal, como a IL-2, o que causa a internalização e degradação de Glut-1 nos lisossomos (Caro-Maldonado *et al.*, 2012; Edinger *et al.*, 2003. Pua e He, 2009; Ruppert *et al.*, 2012). Como resultado, o metabolismo basal retorna à fosforilação oxidativa, a maioria das células efetoras morrem por apoptose e as células sobreviventes se diferenciam em células de memória. A queda na captação de glicose não só afeta a proliferação celular, mas também reduz a produção de IFN- γ e a secreção autócrina de IL-2, reduzindo a função efetora e favorecendo o estabelecimento de anergia (Jacobs *et al.*, 2008; Cham e Gajewski, 2005). Tanto a disponibilidade de fatores tróficos, quanto a expressão do transportador da glicose são importantes para evitar a apoptose através de seu efeito sobre os membros da família Bcl2. Especificamente, ocorre a estabilização da proteína Mcl-1, que se liga a Bim para bloquear a ativação conformacional de Bax. Preserva-se, desta forma, a integridade da membrana mitocondrial, evitando a saída de citocromo c e a ativação das caspases (Zhao *et al.*, 2007). Pode-se concluir que a capacidade de captar glicose está intimamente ligada à proliferação celular e à susceptibilidade à apoptose. A figura 1 ilustra o processo de ativação dos linfócitos e algumas vias de sinalização envolvidas na transição metabólica entre o início e fim da expansão clonal.

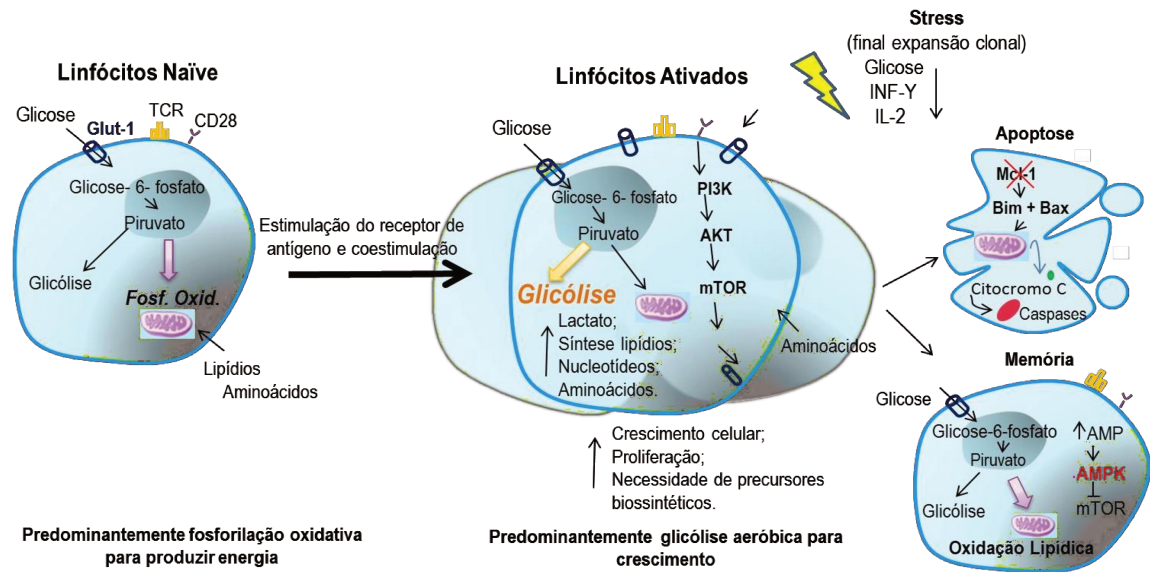


Figura 1: Processo de transição metabólica dos linfócitos T ao serem ativados e ao final da expansão clonal de acordo com a demanda funcional. Dependendo da interação com o antígeno, as células T periféricas podem se dividir em três categorias: células T naïve, células T efetoras e células T de memória. As células naïve ainda não foram expostas ao antígeno, apresentando um estado metabólico basal, com baixa expressão de Glut-1, com baixo consumo de glicose, sendo compensado pela utilização da via metabólica mais eficiente, que é a fosforilação oxidativa. A ativação se dá através de um primeiro sinal gerado pelo TCR, que reconhece os antígenos exibidos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) através do MHC e de um segundo sinal de co-estimulação que é transmitido por moléculas co-estimulatórias (CD28/B7). Estes eventos desencadeiam a ativação de cascatas metabólicas, promovendo um aumento da expressão do transportador de glicose Glut-1 na membrana celular, favorecendo a utilização da via glicolítica, preparando a célula para expansão clonal e sua atividade efetora com o objetivo de erradicarem as células tumorais. Ao final da expansão clonal, ocorre uma escassez de nutrientes, como a glicose, provocando a apoptose da maioria dos linfócitos pela ativação das caspases. As células sobreviventes têm seu metabolismo desacelerado, retornando para o estado basal e integrando a população de células imunes de memória.

1.4 Sucesso e limitações das estratégias terapêuticas para a LLA

O progresso da terapia em crianças com LLA tem sido substancial e atualmente as taxas de cura estão estimadas em torno de 90% (Carrol e Raetz, 2012; Hunger *et al.*, 2012). Vários fatores têm contribuído para esta melhoria do prognóstico da LLA pediátrica, incluindo o desenvolvimento de regimes quimioterapêuticos baseados nos resultados de estudos prospectivos dos grupos cooperativos, a intensificação da quimioterapia convencional pelo aumento do número de agentes ou ajuste de doses e a alocação da terapia baseada na predição de risco de recaída (Carrol e Raetz, 2012).

O tratamento geralmente se estende por dois anos e compreende três fases: a indução de remissão, a intensificação (ou consolidação) e a manutenção (Pui *et al.*, 2008). A maioria das drogas utilizadas foi desenvolvida antes de 1970. No entanto, as dosagens e combinações

quimioterapêuticas têm sido otimizadas com base nas características biológicas da célula leucêmica, na resposta ao tratamento e na farmacodinâmica e farmacogenômica de cada paciente, resultando em um alto índice de sobrevida (Inaba e Mullighan, 2013). A indução de remissão é alcançada com o uso de quimioterápicos por 4-6 semanas para erradicar a carga de células leucêmicas iniciais e restaurar a hematopoiese normal em 96-99% das crianças (Hunger *et al.*, 2012; Pui *et al.*, 2008). Pacientes que apresentam alto risco recebem quatro ou mais drogas combinadas (Inaba e Mullighan, 2013). A intensificação da terapia é administrada depois do tratamento de indução da remissão, para erradicar as células leucêmicas residuais (Pui *et al.*, 2008; Stanulla e Schrappe, 2009). A manutenção da terapia geralmente dura 2 anos ou mais e compreende principalmente o uso da mercaptopurina e metotrexate. Apesar das otimizações feitas, os protocolos terapêuticos não são desprovidos de efeitos colaterais. Por exemplo, a administração de glicocorticóides pode estar associada a infecções, osteonecrose, fratura, psicoses e miopatias (Inaba e Mullighan, 2013). Além disso, a administração de drogas citotóxicas convencionais pode levar a alterações genéticas de células somáticas ou germinativas (French *et al.*, 2009; Ramsey *et al.*, 2012).

Embora os resultados terapêuticos para LLA infantil tenham melhorado significativamente nas últimas décadas, alguns desafios ainda permanecem (Locatelli *et al.*, 2013; Bailey *et al.*, 2008; Bhojwani e Pui, 2013). Isto inclui a efetiva identificação dos 10-20% de crianças que apresentam falha da resposta à terapia de primeira linha, bem como a ocorrência de recidiva da doença. Uma fração próxima de 20 % dos respondedores recidiva, sobretudo nos 48 meses depois do término da terapia (Bailey *et al.*, 2008; Locatelli *et al.*, 2013; Gaynon, 2005). A sobrevida livre de eventos em cinco anos varia de 25 a 70% depois da primeira recidiva, dependendo da duração da primeira remissão, localização da doença e imunofenótipo (Locatelli *et al.*, 2013; Bhojwani e Pui, 2013; Gaynon, 2005). Menos de 10% das crianças sobrevivem 5 anos depois da terceira recidiva (Gaynon, 2005). Por esta razão, novas estratégias terapêuticas são ainda necessárias, visando a melhora da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes não respondedores e/ou recidivados.

Um dos tratamentos indicados para pacientes de alto risco ou doença persistente é o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (Balduzzi *et al.*, 2005). Protocolos contemporâneos de transplante, em que é feita a tipagem de HLA de alta resolução, mostram redução da mortalidade por recidiva, dos efeitos citotóxicos dos quimioterápicos e das infecções (Marks *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2011). Além disso, a sobrevida não é afetada pela origem das células tronco (cordão umbilical, doador haploidêntico, etc.). A indicação para o transplante deve ser continuamente reavaliada, pois a doença residual mínima igual ou maior do que 1 célula em

dez mil ou mais antes do transplante está fortemente associada com a recidiva antes e depois do procedimento (Leung *et al.*, 2011). Além disso existe o risco intrínseco do transplante, que está associado com extensa morbidade e mortalidade (Gill e Porter, 2014).

1.5 Imunoterapia Antitumoral

1.5.1 Imunoterapia com anticorpos monoclonais

Considerando os pacientes que não respondem e/ou recidivam aos tratamentos quimioterápicos e as dificuldades e riscos que envolvem um transplante, novos agentes terapêuticos foram desenvolvidos para aumentar a sobrevida deste grupo de pacientes, tendo a imunoterapia emergido como uma estratégia de tratamento eficaz neste cenário (Wyatt e Bram, 2019). Dentro do contexto delineado, a utilização de moléculas seletivas, capazes de bloquear vias específicas envolvidas na regulação do crescimento tumoral, significou um enorme progresso para o tratamento do câncer (Ribas e Wolchok, 2018).

Uma estratégia promissora tem sido o uso de anticorpos monoclonais, que reconhecem antígenos expressos na superfície das células neoplásicas. Este tratamento minimiza os efeitos colaterais generalizados produzidos pelos agentes quimioterápicos tradicionais e permite a entrega dirigida de drogas potentes com uma meia-vida circulante mais longa (Vedi e Ziegler, 2014; Scheinberg, Rosenblat e Jurcic, 2011). Novos anticorpos monoclonais estão sendo desenvolvidos com melhores propriedades, tais como imunogenicidade reduzida entre espécies pela humanização da sequência protéica, modificação da estrutura para uma melhor afinidade de ligação à molécula-alvo e conjugação com toxinas bacterianas ou drogas quimioterapêuticas para aumentar a citotoxicidade. Todavia, muitas destas estratégias de tratamento estão em fase de estudo e/ou implementação (Bhojwani e Pui, 2013), necessitando ainda da realização de estudos clínicos prospectivos randomizados para assegurar seu papel no arsenal terapêutico regular (Barrett, 2020).

Os anticorpos monoclonais não-conjugados (murinos ou quiméricos) reconhecem antígenos-alvo expressos nas células malignas, levando à morte celular por múltiplos mecanismos. Destacam-se entre eles a citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC) mediada por células efetoras possuidoras de receptores para a região constante das imunoglobulinas, tais como células NK e macrófagos (Boross e Leusen, 2012; Carter e Senter, 2008). Todavia, os anticorpos monoclonais não-conjugados possuem meia-vida curta na circulação humana (Law *et al.*, 2006)

e o risco de desenvolvimento de reações secundárias contra proteínas murinas pode limitar a sua utilização em seres humanos (Reichert e Valge-Archer). A maioria destes anticorpos é usada em combinação com quimioterapia por possuírem atividade citotóxica insuficiente (Vedi e Ziegler, 2014).

Os anticorpos conjugados combinam a especificidade dos anticorpos monoclonais com a potência de drogas citotóxicas altamente eficazes. Depois de ligado ao antígeno-alvo, este complexo é internalizado e transportado para organelas intracelulares, onde a droga citotóxica é liberada, causando a morte celular. O formato conjugado tem se mostrado mais ativo contra células tumorais do que os anticorpos não-conjugados (Vedi e Ziegler, 2014). Embora exista um número limitado de potenciais sítios de conjugação em cada anticorpo, isto pode ser compensado pelo uso de agentes altamente citotóxicos (Teicher e Chari, 2011). Para a maior eficiência deste sistema, o anticorpo e o agente citotóxico devem estar estavelmente ligados, uma vez que possuem efeitos interdependentes que determinam a atividade clínica e tolerabilidade (Davila *et al.*, 2014).

Os anticorpos bi-específicos (BiTE) foram recentemente desenvolvidos e fazem parte de uma abordagem similar ao que foi anteriormente descrito, mas ao invés de utilizarem a toxicidade adquirida de uma droga conjugada, recrutam e ativam células efetoras do sistema imune do próprio paciente para atingir as células tumorais (Vedi e Ziegler, 2014). O anticorpo BiTE funciona de uma forma não convencional, capaz de ativar diretamente as células T para procurar e destruir as células neoplásicas, apresentando uma especificidade dupla como, por exemplo, para o CD19 expresso em células B leucêmicas e para o CD3 presente na superfície de todos os linfócitos T (Bhojwani e Pui, 2013). Esta abordagem é relativamente resistente aos mecanismos de evasão à imunovigilância antitumoral, por utilizar o próprio sistema imune do paciente e independe da apresentação antigênica convencional. O desafio existe com relação a sua administração em conjunto com a quimioterapia mielosupressora, que reduz o número de células efetoras recrutáveis pelos BiTE (Vedi e Ziegler, 2014).

1.5.2 Imunoterapia Celular

1.5.2.1 Linfócitos infiltrantes de tumor (TILs)

O sistema imune é altamente relevante na prevenção do desenvolvimento tumoral pelo reconhecimento específico de antígenos, através de uma imensa diversidade de receptores, ampla gama de especificidade e uma variedade de mecanismos efetores, envolvendo ligantes Fas, ligantes

relacionados ao TNF que induzem apoptose (TRAIL), perforinas, granzimas, interferon- γ e mieloperoxidases, entre outros (Kaplan *et al.*, 1998; Shankaran *et al.*, 2001; Dunn *et al.*, 2002). Muitos estudos mostraram a eficácia da utilização de células do sistema imune com finalidades terapêuticas (Sato *et al.*, 2005; Piersma *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 1998).

Um exemplo desta utilização é a terapia celular com linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), reportada no tratamento de pacientes a mais de 20 anos atrás, que consiste do isolamento de uma população rara de células T específicas para os antígenos neoplásicos presentes nos sítios tumorais do próprio paciente. Estes linfócitos são cultivados, ativados e expandidos por várias semanas a meses *ex vivo*, para gerarem um número suficiente de células T reativas ao tumor e para finalmente serem reinfundidos no paciente (Dudley *et al.*, 2003; Kawakami *et al.*, 1994).

Diversos testes com células humanas foram realizados e puderam ser geradas culturas de TILs de pacientes com melanoma, carcinoma renal, carcinoma de cólon, glioma e câncer de mama. Porém o uso de TILs se mostrou mais eficaz para o tratamento de melanoma, isto porque este câncer produz naturalmente níveis mais altos de TILs em relação a outros tumores. (Joncker *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 1988; Besser *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2008).

Uma das maiores desvantagens da terapia com TIL é o longo tempo de cultura requerida para gerar o número de células suficiente para o tratamento (Jin *et al.*, 2012). Além disso o longo período de estimulação antigênica e cultivo com IL-2 geralmente resulta em células T terminalmente diferenciadas com limitada persistência *in vivo*. Isto pode explicar porque em muitos pacientes a terapia com TILs não apresenta nenhum efeito antitumoral (Jin *et al.*, 2012).

1.5.2.2 Receptores quiméricos de antígenos (CARs)

Como mencionado anteriormente, as estratégias imunoterapêuticas para geração e utilização de linfócitos antitumorais, possuem diversos desafios em sua aplicação clínica, como a baixa frequência de células específicas, o que resulta da limitada imunogenicidade da neoplasia e dos mecanismos de tolerância. Além disso, múltiplas estratégias de evasão tumoral dificultam a atividade das células infundidas, o que frequentemente é consequência do comprometimento do processamento e/ou apresentação antigênica do APC ou da ativação da célula efetora. Como exemplo, podem ser citados os defeitos na maquinaria de processamento de antígenos, a diminuição da expressão do MHC de classe I e a produção de fatores imunossupressores que induzem a diminuição da expressão de moléculas coestimulatórias em células dendríticas (Wang *et al.*, 2017).

Com o objetivo de superar algumas destas limitações, Eshhar e colaboradores desenvolveram, em 1993, o conceito de receptor de antígeno quimérico (CAR). Esta abordagem se baseia no redirecionamento da função citotóxica das células T ou NK (natural killer), por meio de uma modificação genética que permite o reconhecimento das células-alvo tumorais por receptores artificiais de antígeno.

O receptor sintético consiste de três segmentos principais: um ectodomínio, um domínio transmembranar e um endodomínio. O ectodomínio é a porção extracelular do receptor que inclui a região de reconhecimento do antígeno, sendo formado pelas porções variáveis da cadeia leve (VL) e pesada (VH) de um anticorpo, unidos por um linker flexível em uma única cadeia polipeptídica, chamada de scFv (fragmento variável de cadeia única). Este linker aproxima as duas cadeias, proporcionando a correta orientação, e preservando o sítio de ligação. O ectodomínio é ligado ao segmento transmembranar por um espaçador, normalmente derivado da região *hinge*-CH2-CH3 da IgG, que parece ser superior em termos de expressão e estabilidade do receptor, bem como de ativação e função efetora da célula T. A região transmembranar é essencial para a estabilidade do CAR, sendo importante para a amplificação do sinal de ativação, além de contribuir para a localização do receptor na sinapse imunológica (Figura 2). O domínio intracelular permite a transdução do sinal para ativar a célula T após o reconhecimento do antígeno (Zhang *et al.*, 2017; Ramos e Dotti, 2011; Pule, Finney e Lawson, 2003). Esta estrutura complexa permite que o CAR seja capaz de realizar ligações específicas e de promover a ativação programada das células T, para atingir seu potencial citotóxico (Tomuleasa *et al.*, 2018).

A terapia celular utilizando linfócitos T-CAR é uma abordagem emergente para uma variedade de doenças neoplásicas, incluindo linfomas e leucemias. Dentre as vantagens desta imunoterapia, está a independência da apresentação pelo complexo MHC para reconhecer o antígeno, evitando um importante mecanismo de evasão tumoral. Portanto, o tratamento se aplica a qualquer paciente cujo tumor expresse o antígeno- alvo, independente do haplótipo de HLA. Além disso, diferentemente do TCR prototípico, os CARs podem reconhecer não somente antígenos proteicos, como também antígenos derivados de carboidratos e glicolipídios, ampliando o conjunto de moléculas que podem ser utilizadas como alvo (Tomuleasa *et al.*, 2018; Davila e Brentjens, 2016). Finalmente, com uma robusta tecnologia de transferência gênica baseada em vetores gamaretrovirais derivados do vírus de Moloney ou vetores lentivirais, um número suficiente de células T reativas podem ser produzidas em períodos de tempo bem reduzidos (Hollyman *et al.* 2009).

Em condições fisiológicas, o complexo TCR endógeno é expresso na membrana celular e reconhece um fragmento antigênico ligado à molécula do MHC de uma célula apresentadora de antígeno, ativando o linfócito T a exercer suas funções efectoras. A primeira geração de CARs foi desenhada de forma similar ao complexo TCR endógeno, com a incorporação da cadeia ζ do complexo TCR-CD3 e seus três motivos de ativação baseado em tirosina do imunoreceptor (ITAM) no domínio intracelular (figura 2). Os linfócitos T modificados com esta primeira geração de CAR são mais susceptíveis à apoptose e possuem limitada expansão *in vivo* e citotoxicidade (Zhang *et al.*, 2017; Eshhar *et al.*, 2001).

Considerando estas limitações, desenvolveu-se a segunda geração do CAR, que atualmente é o formato mais utilizado nos ensaios clínicos para doenças hematológicas, por apresentar maior viabilidade e eficiência *in vivo* das células efectoras por ele modificadas (Marino *et al.*, 2015; Novosiadly e Kalos, 2016). O diferencial desta segunda geração de CAR foi a incorporação do primeiro e segundo sinais de ativação no segmento intracelular do receptor, representados pela cadeia ζ do CD3 e por um domínio coestimulatório, respectivamente (Zhang *et al.*, 2017). A coestimulação é um importante aspecto da transferência adotiva de células antígeno- específicas, visto que os sinais fornecidos são cruciais na determinação do limiar de ativação, do tipo da resposta e da sobrevivência das mesmas. Como as células tumorais geralmente não expressam moléculas coestimulatórias, o desenvolvimento de uma resposta antitumoral pode ser comprometido (MAJ *et al.*, 2013). Os domínios coestimulatórios mais comumente utilizados são o CD28 ou 4-1BB (CD137), ambos os quais estão relacionados com a expansão clonal e sobrevida de longa duração (figura 2) (Boyiadzis *et al.*, 2018).

Na tentativa de melhorar ainda mais a ativação dos linfócitos T, desenvolveu-se CARs com múltiplos domínios de sinalização coestimulatória como CD27, CD28, 4-1BB, ICOS ou OX40, que foram denominados de terceira geração (figura 2). O uso combinado destes domínios de sinalização pode aumentar a produção de citocinas, melhorando a função efetora, porém existem poucos dados clínicos disponíveis e sua utilidade está ainda sendo investigada (Pule *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2010).

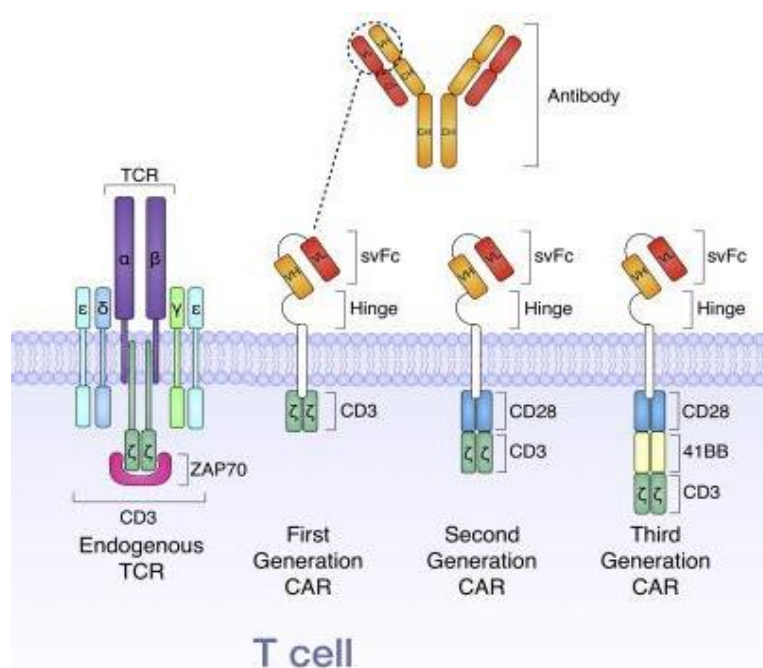


Figura 2: Estrutura básica do receptor de células T endógeno (TCR) e das três gerações de receptores quiméricos de antígeno (CARs). O scFv é derivado da cadeia variável pesada (VH) e leve (VL) do domínio de ligação de um anticorpo. A região hinge conecta o scFv à região transmembranar e ao domínio de sinalização intracelular nos CARs de primeira geração. A segunda e terceira gerações de CARs são produzidas pela adição do(s) domínio(s) de sinalização coestimulatória, incluindo CD28 e/ou 4-1BB. (Adaptado de Borrie e Vareki, 2018).

A imunoterapia com linfócitos T-CAR contra o antígeno CD19 tem se mostrado efetiva no combate a doenças hematológicas que expressam esse marcador, com uma taxa de sobrevivência de 88% em adultos com leucemia de células B refratária aos tratamentos convencionais (Davila *et al.*, 2014). Múltiplos estudos estão em andamento com resultados promissores em pacientes pediátricos com leucemia de células B e linfoma (Lee *et al.*, 2012; Magnani *et al.*, 2013; DiNofia e Maude, 2019).

Enquanto a citotoxicidade não seletiva da quimioterapia clássica está associada a eventos adversos, tais como mucosite e mielosupressão, a toxicidade potencial da terapia com T-CAR resulta da elevada eficácia do próprio sistema imune. A liberação maciça de citocinas em resposta à lise tumoral é causada principalmente pela expansão das células T infundidas e, secundariamente, também por células B, células natural-killer (NK), células dendríticas, monócitos e macrófagos. Todas estas células se tornam ativadas, liberando citocinas inflamatórias em massa, tais como IL-6, TNF- α , IL-2, IL-10 ou IL-8. A concentração aumentada destas moléculas leva ao desenvolvimento de sintomas clínicos como febre e hipotensão arterial (Tomuleasa *et al.*, 2018). A resolução dos efeitos tóxicos é feita com uso de bloqueadores de citocinas, como etanercept e

tocilizumab, além do escalonamento de doses (Grupp *et al.*, 2013). Finalmente, há também uma depleção dos linfócitos B normais que expressam CD19, levando à aplasia do compartimento de células B e consequente redução das imunoglobulinas circulantes. Todavia, não há deleção dos progenitores medulares e os linfócitos B retornam à periferia, quando o número de células T efetoras modificadas diminui (Kalos *et al.*, 2011).

1.6 Antígeno-alvo

Para balancear a eficácia imunoterapêutica com a toxicidade, o alvo antigênico deve ser restrito às células cancerosas e ser minimamente expresso ou ausente nos tecidos normais. No entanto, como os pacientes são capazes de sobreviver com aplasia de células B a longo prazo, uma vez que a reposição passiva de imunoglobulinas seja instituída (Maude *et al.*, 2014), o repertório de alvos leucêmicos pode incluir antígenos de células B normais. Por este motivo, a imunoterapia celular tem se mostrado particularmente efetiva para as malignidades de células B, em contraste a outros tipos de tumores, para os quais uma estratégia similar não pode ser adotada.

O alvo CD19 se tornou ideal para imunoterapia por muitas razões: primeiramente, este antígeno é somente expresso em células B, e não tem homologia com outras proteínas conhecidas. Portanto, sua escolha não causa uma significativa toxicidade não hematológica, enquanto a toxicidade esperada pela aplasia das células B pode ser gerenciada (Orlowski, Porter e Frey, 2017). Além disso, dentre os demais antígenos hematopoiéticos, o CD19 é altamente expresso em praticamente todas as leucemias e linfomas de linhagem B, incluindo a leucemia linfóide crônica e aguda e diversos linfomas não-Hodgkin (figura 3) (Sheuermann e Racila, 1995).

No que diz respeito a origem das células B, o primeiro alvo que surge na superfície de células precursoras iniciais pré-B é o CD19, o que difere do CD20, que é um alvo hematopoiético usado largamente em outras modalidades de imunoterapia. Outro aspecto que torna o CD19 alvo atrativo é o fato de sua expressão ser mantida durante o processo de transformação neoplásica e estar ausente em células tronco hematopoiéticas pluripotentes (Brentjens *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2003) (figura 3). Por estes motivos, o CD19 é o alvo usado na maioria dos ensaios clínicos mais bem-sucedidos com CAR-T (Barrett *et al.*, 2014).

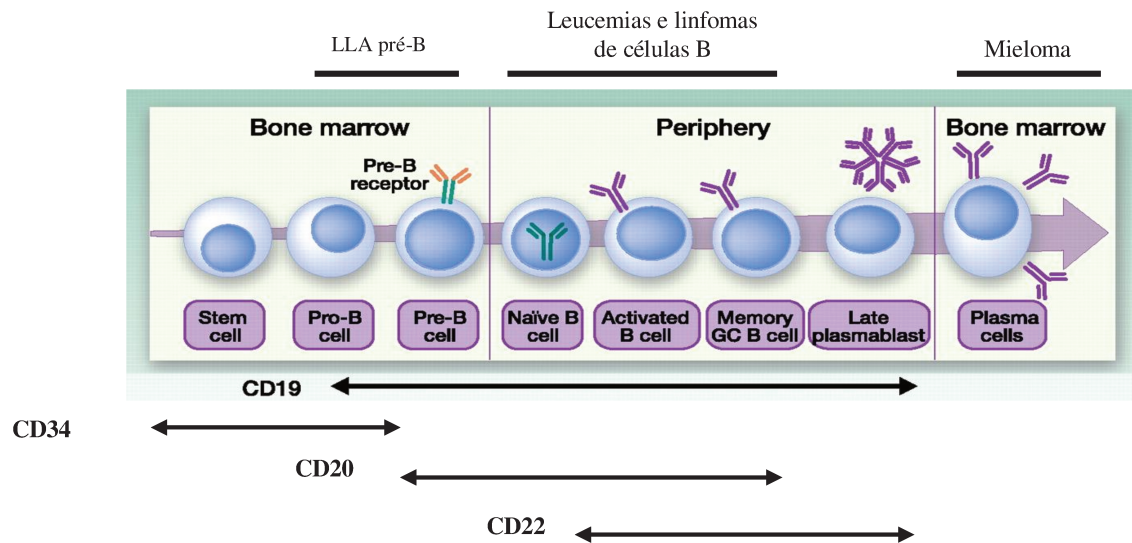


Figura 3: Padrão de expressão do antígeno CD19 durante o desenvolvimento de células B e neoplasias associadas. As células-tronco hematopoiéticas são positivas para o CD34, mas negativas para marcadores de linhagem B. O antígeno CD19 passa a ser expresso nas células pró-B e assim permanece durante todos os estágios de maturação. O CD20 aparece partir da diferenciação em células pré-B, por último, o CD22 é expresso em células já maduras. A expressão do CD19 é perdida durante a diferenciação terminal dos linfócitos B em plasmócitos. (Adaptado de Veronique Blanc *et al.* 2011).

1.7 Justificativa do projeto

Considerando a grande incidência da LLA em crianças e que ainda existe uma significativa fração de casos de recidiva ou de falha na resposta à terapia de primeira linha, novas alternativas de tratamento vêm sendo desenvolvidas, como a imunoterapia com receptores de antígenos quiméricos que reconhecem o alvo CD19 (CAR anti-CD19), as quais vêm apresentando muito sucesso no tratamento das recidivas. Todavia, existem alguns aspectos limitantes para a aplicação desta terapia à conduta terapêutica regular, como: (i) a grande quantidade de cada vetor a ser produzida para cada paciente; (ii) o número elevado de células a serem transduzidas, não obstante a expansão *in vivo*; (iii) o custo elevado da produção/purificação de vetores e transdução de linfócitos e (iv) a susceptibilidade à apoptose dos linfócitos T no microambiente tumoral. Diante disto propusemos o desenvolvimento de um modelo de linfócito geneticamente modificado *ex vivo* para induzir a expressão do CAR anti-CD19 capaz de reconhecer a proteína-alvo expressa na membrana das células de LLA e simultaneamente, ativar os mecanismos citolíticos antitumorais dos linfócitos de uma forma mais eficaz e compatível com uma prolongada vida útil efetora.

1.8 Hipótese

A expressão constitutiva do transportador de glicose GLUT1 sinergizará com os domínios de sinalização dos receptores de antígeno quiméricos nos linfócitos T, reduzindo a apoptose, aumentando a expansão clonal e produzindo uma maior eficácia efetora antineoplásica *in vitro*.

2. *Objetivos*

2. OBJETIVOS:

2.1 Geral:

Testar se as alterações metabólicas induzidas pela expressão constitutiva de GLUT1 nos linfócitos T geneticamente modificados estão associadas a uma possível redução da apoptose e a um aumento da expansão clonal, produzindo uma maior eficiência efetora antineoplásica.

2.2 Específicos:

- Construir e caracterizar um vetor de transferência gênica para induzir a expressão constitutiva de GLUT1 e de um receptor de antígeno quimérico anti-CD19 em linfócitos T;
- Caracterizar a expressão dos transgenes por citometria de fluxo em linfócitos T transduzidos com vetores lentivirais;
- Analisar a capacidade de internalização de glicose dos linfócitos T geneticamente modificados;
- Analisar o estado metabólico *in vitro* dos linfócitos T geneticamente modificados;
- Avaliar a função da produção da citocina pró-inflamatória INF- γ ;
- Avaliar a função citotóxica dos linfócitos T modificados;
- Quantificar o nível de apoptose em situações de cultivo fisiológicas e limitantes de glicose durante a expansão *in vitro*;
- Mensurar a proliferação dos linfócitos modificados *in vitro* em situações fisiológicas e limitantes de glicose.

3. Materiais e Métodos

3.1. Engenharia de linfócitos T – desenho e produção de vetores de transferência gênica

Neste projeto, utilizamos uma nova estratégia desenhando um receptor quimérico de segunda geração e adicionamos um gene de controle metabólico ao pacote transgênico a ser expresso nos linfócitos T modificados. Produzimos um receptor quimérico formado consecutivamente dos seguintes elementos: (i) peptídeo líder do CD8 α , (ii) fusão das cadeias leve e pesada de um anticorpo monoclonal anti-CD19 unidas por um espaçador (Gly₄-Ser₁)₃ (Huston *et al.*, 1988), (iii) região “hinge” e transmembrana do CD8 α , (iv) segmento intracelular de sinalização do 4-1BB e (v) cadeia ζ do CD3. O transgene codificador do receptor quimérico integra uma unidade multicistônica que permite sua co-expressão com o transportador de glicose GLUT1. A coexpressão foi alcançada pelo uso de sequências dentro da mesma fase de leitura que codificam o peptídeo T2A de betatetravírus para separar o transgene do receptor quimérico de GLUT1. Esse curto peptídeo age como hidrolase para induzir o “salto” da ligação covalente entre a última glicina C-terminal da primeira proteína e a prolina N-terminal da proteína subsequente (ribosomal- skipping) (Figura 4) (Donnelly *et al.*, 2001; Demidenko *et al.*, 2013).

Esta unidade multicistônica anti-CD19-GLUT1 foi clonada numa versão derivada do vetor lentiviral autoinativador pRRL-5pme (Dull *et al.*, 1998) sob o controle transcricional do promotor do gene da phosphoglycerate quinase humana (hPGK) (Dull *et al.*, 1998).

Este vetor lentiviral é derivado do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2) e o seu genoma é composto por genes estruturais que controlam a formação das partículas virais e empacotamento do RNA genômico viral como o gene *gag*. Além do gene *env* que é responsável pela formação do envelope viral, que irá se ligar e permitir a entrada na célula hospedeira. O gene *pol* codifica a transcriptase reversa, que transcreve o RNA em DNA, a integrase que catalisa a integração do DNA no genoma celular, e a protease está envolvida na maturação do vírion (Escors e Breckpot, 2010).

A regulação da transcrição dos genes virais e a posterior integração do material genético no genoma da célula hospedeira é controlada por sequências de atuação *cis*, como as duas repetições terminais longas (LTR). Além disso o genoma viral contém ainda um sinal de empacotamento Ψ , responsável pelo empacotamento do RNA nos vírions recém-formados (Escors e Breckpot, 2010; Watanabe e Temin, 1982).

Nós utilizamos a terceira geração de vetor lentiviral, que possui diversas modificações que evitam a potencial geração de vírus competentes em replicação, sem que a eficiência de transdução fosse afetada (Figura 5). Os genes *gag-pol* e *rev* são expressos em dois cassetes separados, refinando o sistema de empacotamento (Dull *et al.*, 1998; Ramezani e Hawley, 2002). Uma modificação importante desta geração é a deleção da região *enhancer* e do promotor na região U3 do LTR 3' que levou à criação dos vetores autoinativantes (SIN) (Myoshi *et al.*, 1998). Esta modificação leva a inativação transcricional do LTR, impedindo a expressão do RNA do vetor, minimizando a possibilidade de se gerar vírus competente em replicação.

Nesta geração também se adicionou a sequência cPPT (central polypurine tract) que facilita a entrada do DNA viral no núcleo, aumentando a eficiência de transdução tanto de células em divisão quanto estacionárias (Zennou *et al.*, 2000).

A expressão dos diferentes elementos incluídos no vetor foi estabilizada pela sequência reguladora pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota (WPRE), que foi posicionada à extremidade não traduzida da região 3'.

O envelope original do HIV foi substituído pelo VSV-G que é o mais amplamente utilizado devido a sua capacidade de infectar diversos tipos celulares (Burns *et al.*, 1993) e também torna a partícula viral mais resistente ao congelamento e métodos de concentração (Kutner, Zhang e Reiser, 2009).

O epítipo marcador, derivado do fator de transcrição c-Myc, foi posicionado na extremidade N-terminal do receptor quimérico anti-CD19, permitindo o reconhecimento por anticorpos já caracterizados. Vale ressaltar que os vários elementos integrantes da unidade multicistônica têm um tamanho compatível com a capacidade de clonagem do vetor.

Duas construções gênicas adicionais foram geradas a partir da unidade multicistônica original, através do uso de sítios de clivagem de enzimas de restrição, estrategicamente posicionados. Além do vetor de transferência vazio, foi produzido o vetor que carrega o receptor quimérico sozinho, sem GLUT1 (CAR anti-CD19). Na figura 4 é possível visualizar o desenho da unidade multicistônica, com seus respectivos sítios enzimáticos de clivagem no contexto do vetor lentiviral.

Nós realizamos a transfecção transitória das partículas virais nas células empacotadoras HEK293T com o vetor do transgene multicistônico bem como com plasmídeos adicionais com os cassetes de empacotamento que contêm informações estruturais e enzimáticas para produção viral, conforme detalhada pela figura 5.

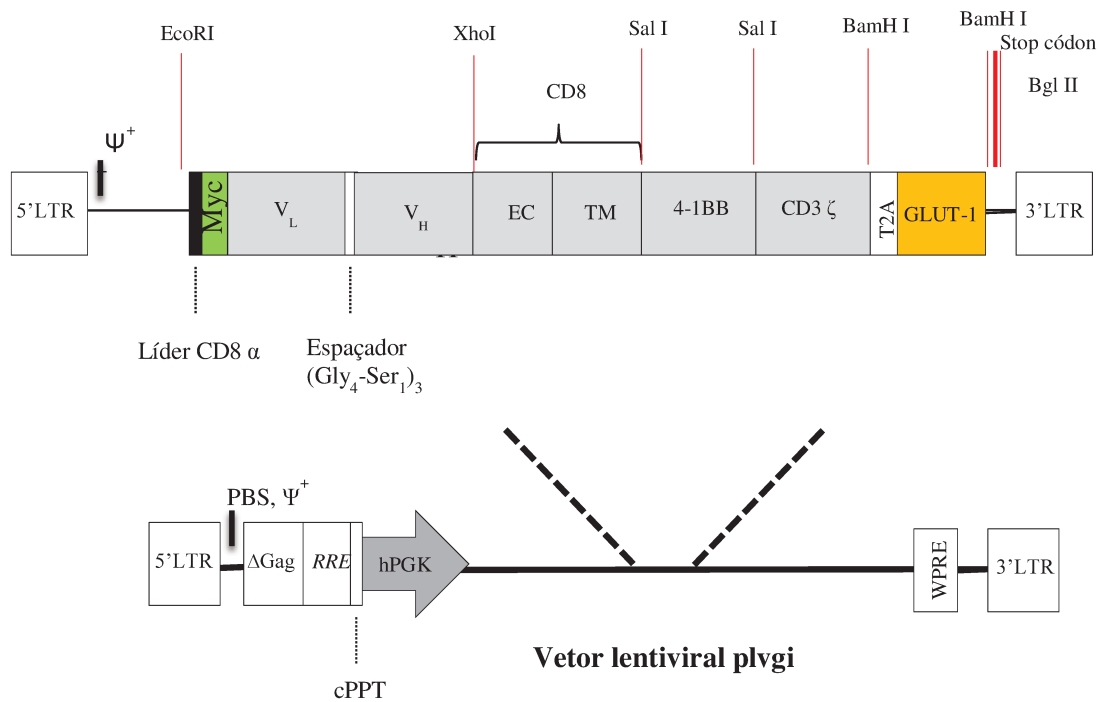


Figura 4: Diagrama esquemático do vetor lentiviral com os transgenes e os respectivos sítios enzimáticos utilizados para obtenção dos linfócitos T modificados CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19 e vetor vazio. A estrutura do vetor lentiviral é ilustrada no painel inferior. **VL**, cadeia variável leve; **VH**, cadeia variável pesada; **EC**, região extracelular do CD8; **TM**, região transmembranar do CD8; **4-1BB**, região citoplasmática do 4-1BB; **CD3ζ**, porção intracelular da cadeia ζ. **LTR**, Long Terminal Repeat; **Ψ**: sequência de empacotamento. **PBS**, primer-binding site; **ΔGag**, fragmento da região Gag; **RRE**, Rev-responsive element; **cPPT**, central polypurine tract.

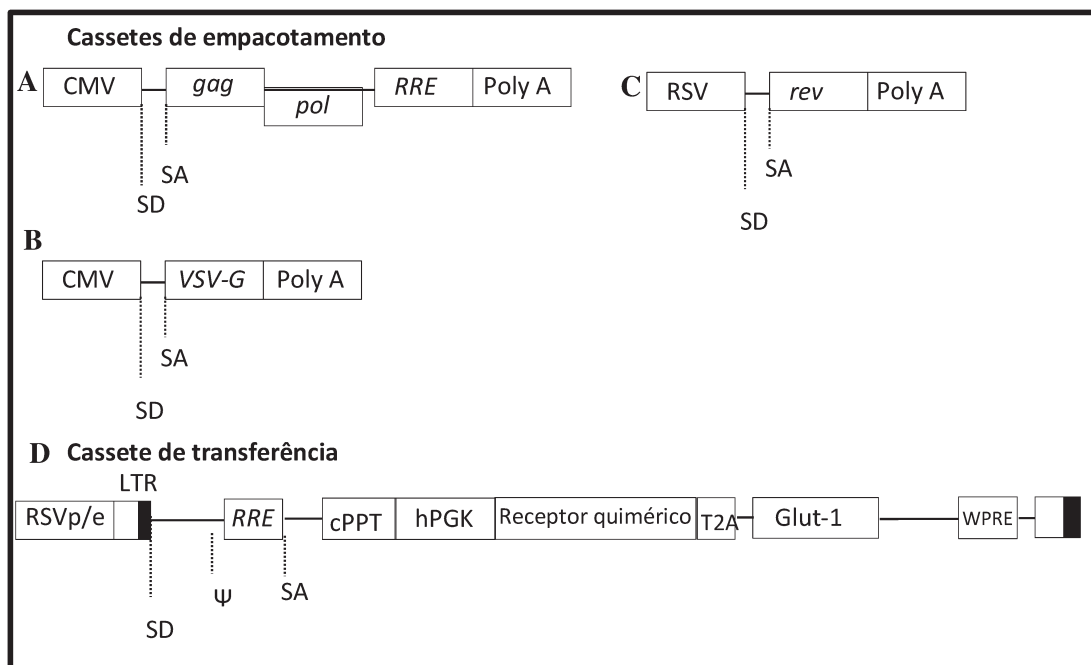


Figura 5: Sistema de terceira geração do vetor lentiviral derivado do HIV-1 utilizado para a produção viral através de co-transfecção. (A) Plasmídeo gag-pol; (B) Plasmídeo do envelope viral; (C) Plasmídeo REV; (D) Vetor de expressão. **RSVp/e**, promotor/enhancer do Virus do Sarcoma de Rous; **CMV**, promotor do cytomegalovírus; **VSV-G**, glicoproteína G do Virus da Estomatite Vesicular; **SD**, sítio doador de splice; **SA**, sítio receptor de splice; **Gag**, deleted gag region; **RRE**, Rev-responsive element; **LTR**, long terminal repeat; **cPPT**, central polypurine tract.

3.2 Transformação bacteriana e recuperação do DNA plasmidial

Inicialmente, bactérias DH5- α quimicamente competentes foram transformadas com os produtos de ligação correspondentes ao CAR anti-CD19-GLUT1/plvgi e semeadas em placas de petri para seleção antibiótica. Colônias resistentes individuais foram então semeadas em meio LB de cultura líquido, para expansão e ulterior extração de plasmídeos amplificados por miniprep. A caracterização por digestão enzimática permitiu verificar os pesos moleculares de cada fragmento gerado e identificar os clones positivos.

Para realizar a recuperação do DNA plasmidial fizemos uma raspagem com alça do estoque de colônias de bactérias selecionadas contendo os plasmídeos de transferência congelado em solução de glicerol 70% a -80 °C, e incubamos a 37°C *overnight* em 3 ml de meio LB contendo ampicilina (100ug/ml) para a seleção das colônias transformadas. O meio condicionado com as bactérias foi transferido para 100 mL de meio LB com ampicilina (100ug/ml) para uma nova expansão em maior escala com incubação a 37°C *overnight*. A recuperação dos plasmídeos dos vetores foi obtida utilizando o QIAGEN® Plasmid Midi Kit, seguindo o protocolo do fabricante.

Para se avaliar a qualidade e integridade do DNA, realizamos a quantificação por espectrofotometria no Nanovue (GE Healthcare), levando em consideração as relações entre as leituras obtidas nos comprimentos de ondas A260 e A280, que fornece uma estimativa da pureza do ácido nucléico, que devem ficar entre 1,8 e 2,0. Estes plasmídeos foram armazenados a -20 °C até a sua utilização na transfecção.

3.3 Sequenciamento dos plasmídeos vetoriais

Para confirmar a correta sequência das unidades de transgene inseridas no vetor obtido, o sequenciamento foi realizado pela empresa Helixxa serviços genômicos SA, utilizando os seguintes pares de primers que anelam numa região comum a todos os vetores construídos, primer forward: 5'cggtgaccgaatcaccga 3' e primer reverse: 5'agcgtatccacatagcgt 3'. Estes iniciadores foram obtidos utilizando o software Primer 3 Plus, o qual está disponível na internet (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Todos os plasmídeos que carregavam os vetores de transferência de expressão o CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19, vetor Δ plvgi vazio e vetor controle GFP foram sequenciados, tanto a sequência direta, quanto reversa, para confirmar a sequência das unidades

de transgene inseridas no vetor obtido. Este serviço foi realizado pela empresa Helixxa serviços genômicos SA, utilizando os seguintes pares de primers: primer forward: 5'cggtgaccgaatcaccga 3' e primer reverse: 5'agcgatccacatagcgt 3'. Estes iniciadores anelam em uma região comum a todos os vetores construídos e foram obtidos utilizando o software Primer 3 Plus, o qual está disponível na internet (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Verificamos a inexistência de dímeros formado pelos pares de primers e ausência de anelamento dentro do mesmo (Selfdimer). Foram considerados a porcentagem de GC menor que 60 %, a temperatura de anelamento (Tm) dos pares de primers próximas e tamanho do amplicon gerado para o sequenciamento dentro de 800 pb, para se obter uma sequência de boa qualidade, sem perda de informação confiável.

Todas as amostras analisadas apresentaram um correto alinhamento com a sequência referência desenhada para cada vetor de transferência (figura 6)

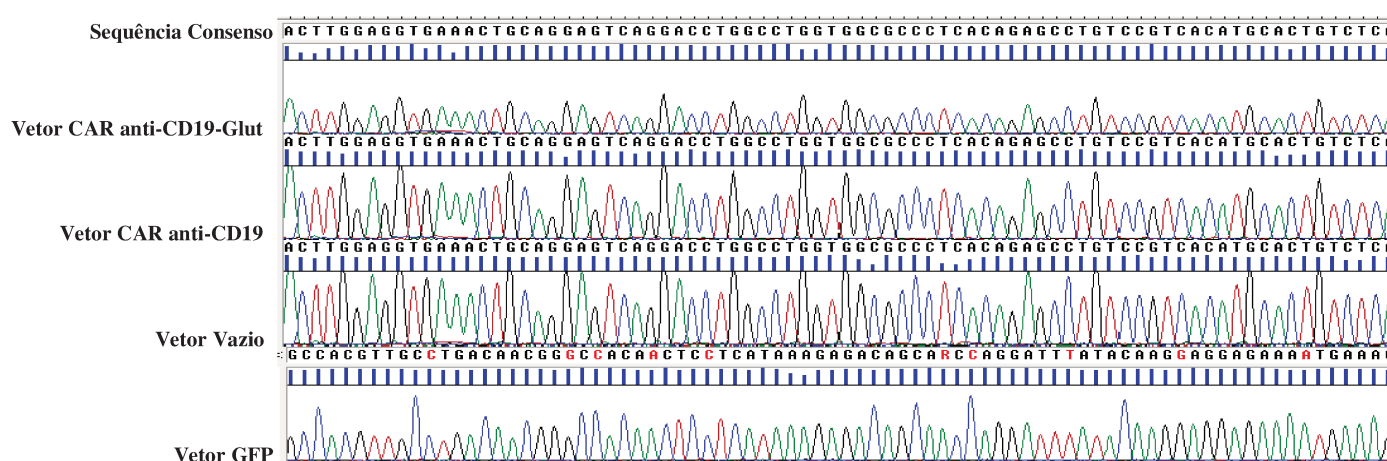


Figura 6: Cromatograma do sequenciamento dos plasmídeos de vetores de transferência de expressão. As sequências dos vetores CAR anti-CD19-GLUT1; CAR anti-CD19; vetor Δ pIvgi vazio e vetor controle GFP foram sequenciados e alinhados com a sequência consenso de referência utilizando o software GeneStudio Professional Edition.

3.4 Linhagens celulares

Utilizamos as seguintes linhagens celulares, Jurkat célula T derivada de leucemia aguda humana e HEK293T, derivada de rim embrionário humano, fornecido por Dr. Angelo Cardoso, Indiana University School of Medicine, I.U. Simon Cancer Center (Indianapolis, IN); L388 é um linfócito B humano transformado com o vírus Epstein-Barr (EBV) e Nalm-6 é uma linhagem de LLA de precursores B que expressa a proteína CD19, ambas foram fornecidas por Dr.

Alexandre Eduardo Nowill, Centro Integrado de Pesquisas Onco-Hematológicas da Infância (CIPOI) e K562 uma linhagem celular CD19- derivada de leucemia mielóide crônica, fornecido por Dr. Sheila A. Shurtleff, St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN). Todas as células foram cultivadas em meio RPMI (Vitrocell) completo (10% soro fetal bovino (Vitrocell), 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina) e no caso específico da HEK293T usamos DMEN (Vitrocell) suplementado com 10% de SFB (Vitrocell), em estufa úmida a 37 °C e 5% CO₂.

3.5 Transfecção transiente e concentração lentiviral

Os vetores lentivirais foram produzidos com a linhagem celular aderente humana HEK-293T que foi cultivada para ser transfectada e funcionar como empacotadora de partículas lentivirais. As células HEK-293T foram cotransfectadas com os plasmídeos que codificam para proteínas virais de empacotamento (gag/pol, RRE e Rev) e plasmídeo que codifica para o envelope (VSV-G), bem como os vetores de transferência de expressão (CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti- CD19, vetor ΔpLVGi vazio e um vetor controle GFP).

As células empacotadoras (HEK-293T) foram mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de penicilina/estreptomicina (P/S) e estiveram sob controle livre de micoplasma através do teste de PCR. O meio de cultura das placas foi trocado por um novo meio DMEM-10 sem antibiótico (Vitrocell) 2 horas antes da transfecção. A transfecção foi realizada com PEI (20µg/ml) (polietilenimina) em placas de 10 cm de diâmetro, quando atingiam aproximadamente 70% de confluência. Utilizamos uma proporção de DNA de 4,8: 1,46: 2,5: 1,2 µg, referente aos plasmídeos correspondentes ao vetor de transferência de expressão, envelope (VSV-G), gag/pol/RRE e rev, respectivamente. Estes plasmídeos foram ressuspensos em 500 µl de meio Opti-MEM (1X) (Gibco-Thermo Fisher Scientific) sem soro, juntamente com o PEI. O meio de cultivo foi renovado após 16 horas e os sobrenadantes contendo as partículas virais foram colhidos por 72 horas após a transfecção.

Após as coletas, o sobrenadante viral foi filtrado (filtro 0,45µm) para remover os corpos apoptóticos e fragmentos celulares, concentrados 100X em ultracentrífuga Avanti J-30I (Beckman Coulter) a 50.000 g por 90 minutos a 4 °C e por fim o estoque viral foi ressuspendido em meio RPMI sem soro, aliquotado e congelado a -80 °C para posterior uso na transdução.

3.6 Titulação viral

Para fazer a titulação do vírus, foram usadas as linhagens celulares HEK 293T e NIH-3T3. Estas células foram previamente semeadas em placas de 6 poços com 3 ml de meio DMEM-10% soro. No dia seguinte, após terem atingido uma confluência próxima de 70%, trocamos o meio de cultivo 2 horas antes de iniciar a transdução. Preparamos 5 diluições seriadas do vírus que contém o transgene codificador da GFP inserido no vetor lentiviral. A transdução foi realizada com o vírus diluído na presença de polibreno a 8 µg/ml e sem *spinoculation*, ou seja, sem centrifugação das células com o sobrenadante viral em baixa velocidade durante a fase precoce da transdução. Após 48 horas, as células foram coletadas, marcadas com o anticorpo anti-Myc-Alexa-Fluor 488 (clone:9B11, Cell Signaling Technology) para detectar o CAR anti-CD19 e analisadas por citometria de fluxo. O cálculo do título viral foi realizado segundo a equação abaixo, sendo que priorizamos para a análise os pontos associados com um percentual de transdução entre 1- 10% para evitar múltipla infecção e ou saturação da curva.

$$\text{Título } \frac{\text{TU}}{\text{mL}} = \frac{(\% \text{ CAR}^+ \times \text{N}^\circ \text{ células} \times \text{Fator de diluição})}{\text{Volume de vírus transdução}}$$

Alternativamente utilizamos também o kit Lenti-X GoStix Plus (Takara Bio USA, Inc), que mede a quantidade das proteínas do capsídeo p24 presente no sobrenadante lentiviral. Este teste consiste na coleta de 20 µl do sobrenadante viral e carregamento no cassete do kit. Após um período de 10 minutos, fazemos a leitura das bandas que aparecem na janela do cassete GoStix com a câmera do celular auxiliado pelo aplicativo Lenti-X GoStix desenvolvido pelo próprio fabricante. O título é calculado baseado na intensidade da banda, relativa a banda controle e os valores são gerados em GoStix Value (GV).

3.7 Produção e titulação das partículas lentivirais

Historicamente, a ferramenta mais eficiente para a modificação genética de linfócitos T são os vetores virais, principalmente os derivados dos retrovírus (MLV) e lentivírus (HIV), que permitem a expressão estável do transgene através da integração no genoma da célula-alvo (Suerth, Schambach e Baum, 2012). Neste trabalho a produção viral foi alcançada pela transfecção transiente em células empacotadoras HEK293T, mediada pela utilização de PEI (polietilenimina). O PEI é um polímero catiônico que forma um complexo com o DNA e neutraliza suas cargas negativas, facilitando a fusão com a membrana celular permitindo a entrada do DNA exógeno na célula (Boussif *et al.*, 1995)

O nosso vetor lentiviral foi pseudotipado com a proteína de envelope anfotrópica VSV- G, derivada do plasmídeo pVG da célula empacotadora. Portanto, as partículas virais produzidas possuem amplo espectro de infectabilidade, podendo transduzir tanto células de roedores quanto de outros mamíferos, como seres humanos.

Existem inúmeros fatores que influenciam a eficiência de transfecção, dentre eles a saúde e viabilidade da linhagem celular, número de passagens, confluência, qualidade e proporção dos plasmídeos utilizados, bem como a quantidade de soro no meio (Yang *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2015). Por estes motivos, otimizamos o processo da transfecção, com especial atenção para o uso de antibióticos.

Uma confluência de aproximadamente 70% foi considerada a ideal, uma vez que não temos uma placa muito confluenta, o que dificultaria a entrada dos plasmídeos no momento da transfecção, mas temos um bom número de células que serão transfectadas e ainda possuem um espaço para proliferarem. Uma confluência muito mais baixa pode resultar na diminuição da proliferação pela ausência do contato celular. Utilizamos uma proporção de DNA de 1,46: 2,5: 1,2 µg, referente aos plasmídeos correspondentes ao vetor de transferência, envelope (pVG) e gag/pol (RREi, Revi), respectivamente. Estes plasmídeos foram ressuspensos em 500 µl de meio Opti-MEM (1X) (Gibco-Thermo Fisher Scientific) sem SFB, juntamente com o PEI. Algumas proteínas do soro interferem com a formação do complexo DNA-PEI, impedindo a entrada do DNA plasmidial no interior da célula (Yang *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2015). Para a transfecção utilizamos meio DMEM-10 sem antibiótico (Vitrocell), que se mostrou mais eficiente no rendimento do título viral quando comparamos com a utilização do meio DMEM 10% com antibiótico (Figura 8B). Isto devido a característica de reagentes lipídicos catiônicos (PEI) aumentarem a permeabilidade da membrana celular, aumentando a quantidade de antibióticos que entram na célula, resultando em citotoxicidade e baixa eficiência de transfecção.

É possível a obtenção de altos títulos virais utilizando células empacotadoras adicionando novo meio às células, sem que haja uma perda significativa do título viral até o tempo de 96 horas (Nolan, 2001). Entretanto, o cultivo prolongado das células empacotadoras após a transfecção inevitavelmente acarreta em um aumento da população celular, o que faz com o que meio de cultura se torne ácido, dificultando a sua utilização para a transdução das células- alvo. Dessa forma, escolhemos realizar a coleta do sobrenadante viral duas vezes ao dia por 72 horas após a transfecção.

A quantificação da produção viral foi realizada através da transdução das linhagens celulares HEK-293T e NIH3T3 com cinco diluições seriadas do vetor lentiviral que contém o transgene codificador da GFP. Este processo foi realizado num único ciclo, sem *spinoculation*. Após 48 horas da transdução, fizemos a análise por citometria de fluxo das células e obtivemos um título viral médio para os dois tipos celulares de 1.10^6 partículas infecciosas por ml de sobrenadante colhido (Figura 7). O cálculo foi baseado no percentual de infecção em relação ao número de células transduzidas.

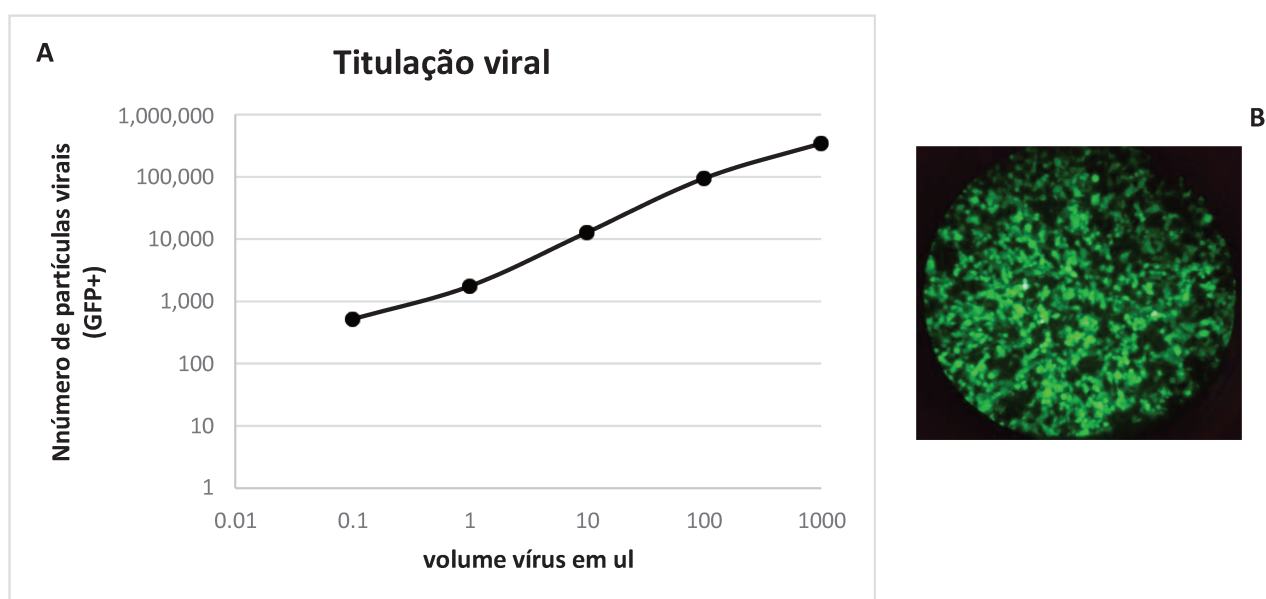
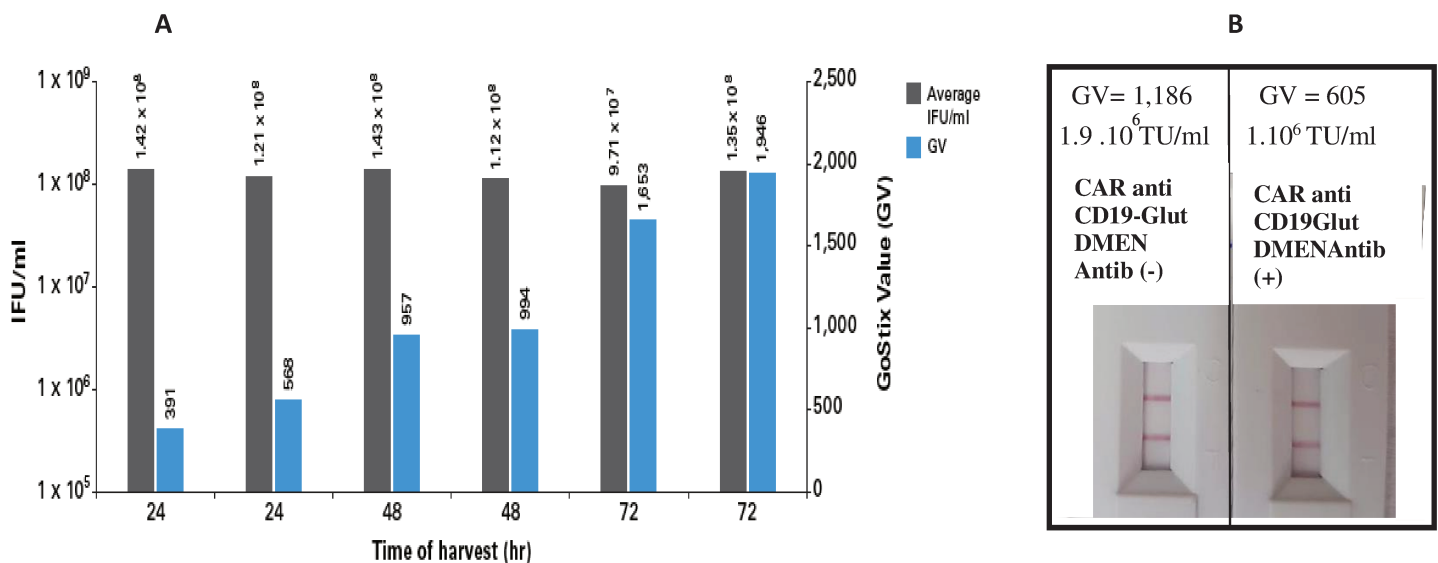


Figura 7: **A.** Titulação do sobrenadante viral em células HEK-293T transduzidas com o vetor GFP e analisadas por citometria de fluxo. **B.** Expressão de GFP em células HEK-293T observadas em microscópio óptico de fluorescência após 72 horas da transfecção com o vírus.

De forma alternativa, para os vetores que não carregam um transgene fluorescente, realizamos titulação com o kit Lenti-X GoStix Plus (Takara Bio USA, Inc.), que mede a quantidade das proteínas do capsídeo p24 presente no sobrenadante lentiviral produzido e possui a vantagem de ser um método simples, eficaz e rápido, uma vez que na titulação viral por citometria de fluxo precisamos aguardar 48 horas após a transdução e com o kit Lenti-X GoStix conseguimos quantificar o sobrenadante viral em apenas 10 minutos. Além disso também possui a vantagem da utilização imediata do vírus fresco, uma vez que após o congelamento há uma perda do título viral. O título é calculado baseado na intensidade da banda relativa à banda controle e os valores são fornecidos em GoStix Value (GV). O GV é correlacionado com o título infeccioso, onde a intensidade da banda de teste no cassete aumenta com a quantidade de proteína p24 no

sobrenadante lentiviral que, por sua vez, se correlaciona com o aumento de unidades infecciosas (IFU) (Figura 8A). Na figura 8B é possível observar a quantificação de uma produção do vetor CAR anti-CD19-GLUT1 utilizando este kit, na qual comparamos a transfecção realizada com meio DMEN 10% SFB sem antibiótico e DMEN 10% SFB com antibiótico. Observamos um aumento de quase 2 vezes da quantidade de p24 solúvel por ml na produção sem antibiótico ($1.9 \times 10^6/\text{ml}$) em relação à produção realizada na presença de antibiótico ($1 \times 10^6/\text{ml}$).



Fonte: Takara Bio Inc.

Figura 8: Titulação viral com o kit Lenti-X GoStix. A: Gráfico representativo da correlação do título infeccioso com o GV (GoStix Value). **B:** Comparação do título viral gerado a partir de uma transfecção produzida com meio DMEN 10% SFB sem antibiótico e DMEN 10% SFB com antibiótico utilizando o kit Lenti-X GoStix.

3.8 Isolamento e ativação de linfócitos T primários

Para cada evento de transdução e realização dos experimentos fizemos uma coleta de aproximadamente 15 ml de sangue periférico em tubo estéril tipo *Vacutainer* contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O isolamento dos linfócitos se deu por separação de diferença de gradiente de densidade com Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare) a uma velocidade de 583g por 20 minutos sem freio. Após esse período, o anel de células mononucleares (PBMCs) foi recolhido e lavado com PBS 1X a 200 g por 15 minutos e ressuspensas em 4 ml de meio de cultura RPMI 10% SFB (Vitrocell). Estas células isoladas foram incubadas a 37 °C em placa de cultura de 10 cm para a adesão de monócitos por 4 horas.

Finalmente estas células são recolhidas da placa e são cultivadas com 30 U/ml de IL-2 (PeproTech, USA) em uma concentração de 1.10^6 /ml, trocando o meio e a interleucina a cada dois dias até o momento de serem ativadas para a transdução.

Para termos uma melhor eficiência de transdução, fizemos ativação dos linfócitos T primários utilizando microesferas recobertas de anticorpos anti-CD3/CD28 (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 Gibco- Thermo Fischer Scientific) capazes de induzir os sinais 1 e 2 do TCR e da coestimulação em uma proporção de 1:1 microesfera:célula. O cultivo subsequente foi realizado numa densidade de 1×10^6 células/ml/poço e complementamos com doses de 50 U/ml de IL-2. As células foram incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 72 horas, quando ocorre o pico de divisão celular após ativação.

3.9 Transdução da linhagem leucêmica Jurkat e células T primárias com vetores lentivirais

Efetuamos a transdução de células da linhagem leucêmica T Jurkat., cultivando em placas de 24 poços a uma concentração de 700.000 células /ml. Uma hora antes da transdução renovamos o meio RPMI 10% SFB. Após este período de incubação adicionamos o vírus (MOI de 2), polibreno (8 µg/mL) e centrifugamos as placas a 1.800 g por 90 minutos a 32 °C. Após o *spinoculation* as células foram incubadas a 37 °C, 5% CO₂ *overnight*.

Após o período de incubação *overnight*, trocamos 3/4 do meio tóxico com polibreno, para meio RPMI-10 novo e cultivamos estas células mantendo uma passagem a cada dois dias. Após um período de 48-72 horas da transdução analisamos a expressão do CAR anti-CD19 por citometria de fluxo.

Para realizar a transdução dos linfócitos T primários, retiramos as microesferas anti-CD3/CD28 dos linfócitos T ativados depois de 72 horas, com auxílio de uma rack magnética. Carregamos o volume de vírus concentrado 100x (1.10^8) para se obter um MOI aproximado de 6, em placa de 24 poços tratada com RetroNectin® (Takara Bio Inc) centrifugamos a uma velocidade de 1.800 g por 90 minutos a 32 °C. Após este carregamento viral, adicionamos delicadamente os linfócitos T, a uma densidade de 1.10^6 células/ml, juntamente com o polibreno (8 µg/ml) e 50 UI/ml de IL-2, centrifugamos novamente a 1.000 g por 10 min e por fim incubamos a 37 °C *overnight*. Para este protocolo também renovamos 3/4 do meio RPMI- 10% SFB 2 horas antes da transdução.

Posteriormente ao período de incubação, trocamos 3/4 do meio tóxico com polibreno,

para meio RPMI-10% SFB novo e cultivamos estas células mantendo a densidade de 800.000 células/ml com uma passagem a cada dois dias, repondo o meio e IL-2 (50 U/ml).

3.10 Detecção dos transgenes por citometria de fluxo

Após 48-72 horas da transdução, prosseguimos com a análise fenotípica por citometria de fluxo das células Jurkat e linfócitos T primários, analisando a expressão do CAR anti-CD19 e do GLUT1.

As células foram colhidas, lavadas, ressuspensas em PBS 1x e incubadas com os diversos anticorpos específicos ou controles de isotipo. Os anticorpos utilizados foram: anti-Myc-Alexa-Flúor 488 (clone:9B11, Cell Signaling Technology) (anticorpo que reconhece um epítipo de c-myc localizado na extremidade aminoterminal do receptor quimérico anti-CD19), anti-GLUT1-PE (clone 202915 R&D system), isotipo controles IgG_{2A} Alexa Flúor 488 (BioLegend®) e isotipo IgG_{2b} PE (ImmunoTools). A aquisição das células foi realizada no FACSVerse™ (BD Biosciences, San Jose, CA) e analisadas com o FlowJo (Treestar, Ashland, OR, USA)

3.11 Perfil expressão do receptor quimérico por imunofluorescência

De forma complementar a informação obtida pela citometria, a expressão do receptor quimérico anti-CD19 na superfície celular dos linfócitos T transduzidos como CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19 e com vetor vazio também foram analisadas por imunofluorescência. Utilizamos placas de cultivo com fundo de vidro de 15 mm (NEST® Biotechnology) e tratamos com PDL 0.001% por 3 horas. Os linfócitos foram lavados, fixados com paraformaldeído 4%, dispostos na placa tratada e centrifugados a 1.200 RPM por 5 minutos. Após a fixação de 1 hora, incubamos com o anticorpo monoclonal anti-Myc-Alexa-Flúor 488 (clone:9B11, Cell Signaling Technology) overnight a 4 °C. Após a incubação, lavamos com PBS 1x e marcamos com DAPI (1µg/ml) por 10 min para a marcação dos núcleos. Finalmente, as amostras foram lavadas, fotografadas no microscópio confocal LSM 800 (ZEISS) e analisadas com o software Zen 3.0

3.12 Análise por Western Blot

A expressão da proteína GLUT1 foi quantificada entre as diferentes populações de linfócitos T e da linhagem T Jurkat transduzidas por Western Blot. As células foram lavadas em PBS 1x e as proteínas totais foram extraídas utilizando o tampão RIPA-like por 5 minutos (50mM Tris-HCl [pH 7,5-7,7], 150 mM NaCl, 1% NP-40; 0.5% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS)

suplementado com 1% do inibidor de fosfatase I, 1% do inibidor de fosfatase II, 1% do inibidor de protease e 1mM de PMSF (todos da Sigma Aldrich). Estas proteínas foram quantificadas pela metodologia de Bradford. As proteínas desnaturadas foram aplicadas em um gel de SDS-poliacrilamida (concentração de 10%) e submetidas à eletroforese.

As proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS e 20% de metanol). Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários anti-GLUT1 (clone D3J3A, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000). Como controles endógenos utilizamos os anticorpos anti- β -tubulina (clone 2146, Cell Signaling Technology, 1:10,000) e GAPDH (Cusabio, diluição 1: 5000). Todos os anticorpos primários foram diluídos em solução tampão TBS-T (20 mM Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20) com 2% de albumina de soro bovino (BSA). A imunodeteção foi realizada por incubação da membrana com anticorpo secundário anti- IgG de coelho (clone 7074, Cell Signaling Technology, diluição de 1: 10,000) conjugado com enzima HRP em uma solução de 5% de leite em pó desnatado diluído com TBS-T. Após 2 h de incubação, a membrana foi revelada usando o reagente para detecção de substrato Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo-Scientific) e visualizado através do sistema de imagem do ChemiDocTM MP (BIO-RAD).

3.13 Ensaio de internalização de glicose

Para verificar se o linfócito modificado com o CAR anti-CD19-Glut1 aumentaria a captação de glicose, nós utilizamos um análogo de glicose fluorescente o 2NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl Amino)-2-Deoxyglucose) (Thermo Fischer Scientific), que tem sido utilizado para monitorar o *uptake* de glicose. Primeiramente, as células foram lavadas, ressuspensas em meio RPMI sem glicose e glutamina (Vitrocell) e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após este período, adicionamos 100 μ M 2NBDG por uma hora e meia aos linfócitos T primários e 30 minutos para a linhagem T Jurkat e incubamos a 37 °C. Por último, lavamos as células 2 vezes com PBS gelado e analisamos a fluorescência emitida no histograma em FL-1 das células transduzidas no citômetro FACS VerseTM (BD Biosciences, San Jose, CA).

3.14 Ensaio de formação de sinapses imunológicas

Para realizar este ensaio de formação de sinapses, células leucêmicas B que expressam CD19 (Nalm-6) foram marcadas com CFSE (Thermo Fischer Scientific) e colocadas em cocultivo com células Jurkat transduzidas com o vírus CAR anti-CD19-GLUT1 ou vírus CAR-anti-CD19 ou vetor vazio em uma proporção de 1:4 (Jurkat:Nalm) por 1 hora a 37 °C. Depois, fixamos com paraformaldeído (PFA) por 20 minutos e analisamos a formação das sinapses no material disposto em lâmina no microscópio.

3.15 Ensaios da atividade metabólica

Para avaliação da bioenergética das células modificadas, utilizamos o equipamento Seahorse Analyser XF24 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Este aparelho utiliza um sistema de detecção que mede a concentração extracelular de oxigênio e portanto a taxa do seu consumo em pmol/seg/mL (OCR). Primeiramente, ele detecta o consumo de oxigênio (respiração) sob as condições do meio de partida (fenótipo de linha de base) e, depois, com a injeção de uma mistura de drogas estressoras, que induzem uma demanda de energia na mitocôndria (fenótipo de stress) das células vivas em tempo real. Desta forma, foi possível determinar a taxa de consumo de oxigênio (OCR) basal, a fração do consumo de oxigênio relacionado com a síntese de ATP, a respiração máxima (OCR máx) e reserva respiratória (SRC).

Para que os linfócitos pudessem aderir nas placas de cultivo celular (XF24 V7 cell culture) do Seahorse, os poços foram tratados previamente com o Cell-Tak™ Cell and Tissue Adhesive (Corning) diluído em bicarbonato de sódio 0.1 M, pH 8. Em seguida, foram incubados por 20 minutos e lavados com PBS.

As células modificadas foram contadas, lavadas e ressuspensas no meio DMEN (D5030; Sigma Aldrich) sem vermelho de fenol, pH 7,4 e suplementado com glicose 10 mM, piruvato 1 mM, glutamina 2 mM e Hepes 20 mM, a uma densidade de 200.000 células/poço. Por fim centrifugamos a 1.200 RPM por 5 minutos para os linfócitos aderirem a placa tratada. Esta placa preparada com a células foi incubada a 37 °C, sem CO₂, por uma hora, para permitir a estabilização antes do experimento.

Durante o experimento foram feitas quatro injeções das drogas estressoras (CCCP, oligomicina, antimicina, rotenona e, como controle, o DMSO).

Na primeira injeção, foi carregado 1 µg/ml de oligomicina ou DMSO. Na segunda e terceira injeções foram carregados 750 nM e 250 nM de CCCP por poço, respectivamente. Finalmente, foram carregados 1µM de antimicina A e 1µM de rotenona por poço na quarta injeção.

As drogas inibidoras dos complexos respiratórios têm diferentes mecanismos de ação. A Oligomicina, por exemplo, age como inibidor da ATP sintase, bloqueando o fluxo de H⁺ para a matriz mitocondrial, com consequente parada da respiração pela fosforilação oxidativa. O CCCP age como um carreador hidrofóbico de prótons (H⁺) na membrana mitocondrial interna, restaurando o fluxo de H⁺ da respiração mitocondrial. Por fim, as drogas Antimicina A e Rotenona agem respectivamente nos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial, bloqueando o transporte de elétrons, diminuindo a respiração.

A respiração basal (Figura 9a) resulta do gradiente quimiosmótico de prótons, que permite a fosforilação do ADP em ATP (fluxo de prótons através da ATP sintase) (Brand e Nicholls, 2011). A inibição da ATP sintase com oligomicina possibilita a determinação da fração da respiração acoplada à síntese de ATP. Essa taxa é calculada pela diferença da respiração basal e da respiração obtida na presença deste inibidor (Figura 9c = a-b) (Dranka *et al.*, 2011)

Para o cálculo da respiração máxima (OCR_{max}) (Figura 9d), titulamos o desacoplador CCCP, adicionando apenas o suficiente para estimular ao máximo a cadeia transportadora de elétrons, mas evitando a dissipação total do potencial de membrana mitocondrial. Os desacopladores agem como protonóforos, criando um circuito de prótons através da membrana mitocondrial interna, diminuindo assim a força próton motriz-transmembranar, permitindo que a respiração aumente (Connolly *et al.*, 2018; Resta e Gnaiger, 2012).

Quando subtraímos a respiração máxima da respiração basal, obtemos a capacidade de reserva respiratória (SRC) (Figura 9e = d-a). É um valor que retrata a capacidade de suprimento de substratos e da transferência de elétrons para responder a um aumento na demanda energética celular e tem a vantagem de indicar quão próximo do seu limite bioenergético uma célula está operando (Connolly *et al.*, 2018; Dranka *et al.*, 2011).

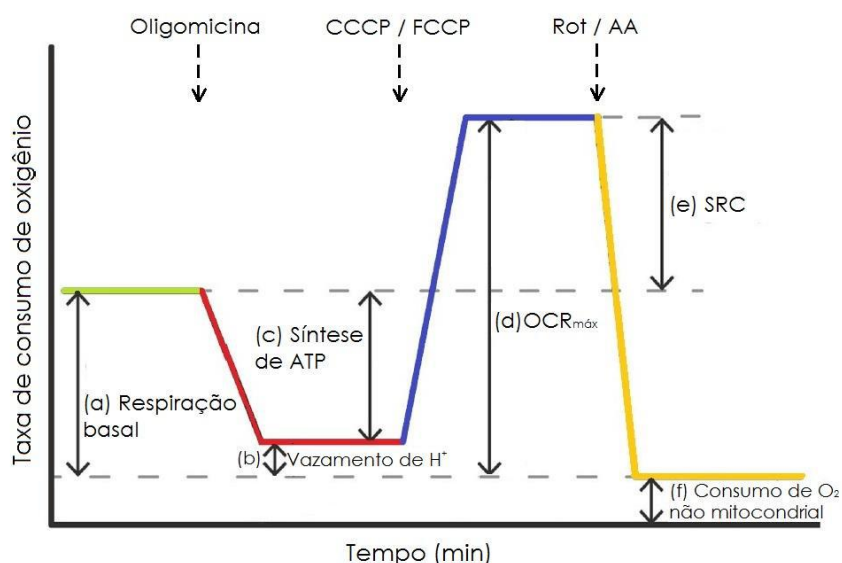
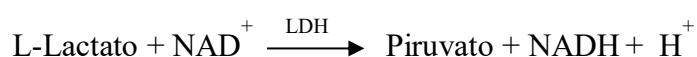


Figura 9: Esquema de protocolo experimental padrão para se avaliar a função mitocondrial em células, medindo-se a taxa do consumo de oxigênio mediante a adição sequencial de inibidores mitocondriais e do protonóforo CCCP (Adaptado de Connolly *et al.*, 2018).

Ao final da análise realizada pelo equipamento, os valores foram normalizados pela quantificação do DNA, sendo proporcional ao número de células. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 5 minutos, coradas com cristal de violeta 0,05% durante 10 minutos, lavadas em água e, em seguida, solubilizadas com ácido acético 10%. Em seguida, a absorbância foi mensurada utilizando o leitor de placas Power Wave XS2 (BioTek) através do comprimento de onda de 590 nm. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e em três experimentos independentes.

Para analisar o perfil glicolítico celular foram realizadas medidas da produção de lactato através do kit enzimático colorimétrico comercializado pela empresa Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brasil), cuja referência é K084. As mensurações foram feitas no sobrenadante de linfócitos T primários modificados, cultivados por 48 horas em condições fisiológicas com meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 U/mL de IL-2 em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^6 células/mL ou sob condições de estresse utilizando inibidores mitocondriais, como a oligomicina 1 µg/mL e antimicina A 1 µM. As células foram mantidas em estufas humidificadas de CO₂ 5%, a 37°C.

O kit que avalia a produção de lactato pelas células tem como princípio catalisar a conversão do lactato presente no meio a piruvato, pela atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) e a consequente redução do NAD⁺ a NADH, conforme apresentado na reação abaixo:



A concentração de lactato foi determinada colorimetricamente pelo aumento da absorbância a 340 nm dada pela formação de NADH e as amostras foram comparadas com um padrão de lactato de 10 mg/dL.

3.16 Avaliação da produção de INF- γ

A quantificação da produção de citocina INF- γ foi realizada por meio do ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Os linfócitos T primários transduzidos foram cocultivados em placa de 24 poços com as células-alvo Nalm-6 numa proporção de 1:1 e após um período de 16 horas recolhemos o sobrenadante deste cocultivo para realizar a dosagem desta citocina, seguindo o protocolo do fabricante do kit Human IFN gamma ELISA (ImmunoTools). Este experimento foi realizado em triplicata em pelo menos 3 experimentos independentes e por fim, procedemos a leitura da placa em 450 nm no equipamento *Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek).

3.17 Ensaio de citotoxicidade dos linfócitos T in vitro

A análise de citotoxicidade foi realizada por duas metodologias complementares. Primeiramente fizemos um ensaio de depleção do alvo marcado com CFSE (Thermo Fisher Scientific) onde fizemos o cocultivo de linfócitos T primários efetores modificados com uma linhagem leucêmica B Nalm-6, que expressa o marcador de superfície CD19, bem como a linhagem K562, sensível a atividade NK e que funciona como um controle negativo por não expressar o alvo CD19. Estas células foram cocultivadas em placa de 24 poços a 1×10^6 células/ml em meio RPMI-10% SFB com 50 U/ml de IL-2 (Peprotech), numa proporção de 5:1 (efetor:alvo). A porcentagem de células vivas positivamente marcadas com CFSE foi verificada depois de um período de 24 horas no canal de FL-1 por citometria de fluxo no FACSVerseTM (BD Biosciences, San Jose, CA).

Em uma segunda análise, a atividade citolítica das células T modificadas foi determinada 6 dias após a ativação, utilizando um ensaio padrão de liberação de Cr⁵¹ de 4 horas de duração. As células-alvo foram marcadas com Cr⁵¹ e incubadas com as células T modificadas em diversas proporções. Após incubação, o sobrenadante do cultivo foi colhido e a radioatividade mensurada

num contador gama 1470 Wizard (PerkinElmer). Dentre as células-alvo, utilizamos a linhagem leucêmica Nalm-6, que expressa o antígeno-alvo CD19, bem como a linhagem K562, como um controle. A descrição deste ensaio pode ser encontrada em Lalonde *et al* 2007.

3.18 Ensaio de apoptose celular

Nós analisamos a viabilidade celular dos linfócitos T primários modificados cultivados em um meio com concentrações limitadas de glicose. Os linfócitos transduzidos foram lavados com PBS 1X para retirar o excesso de glicose e ressuspensos em meio RPMI sem glicose e glutamina, suplementado com 10% SFB, produzindo uma concentração final de 2.4 mM de glicose proveniente do soro. Em paralelo, os linfócitos também foram cultivados em condições normais de glicose, para determinar a apoptose basal.

Por fim, incubamos estas células a 37 °C por 24 horas com uma densidade de 1×10^6 células/ml, suplementado com 50 U/ml de IL -2. Após o período de incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em 100 μ l do buffer Annexin V-Binding Buffer 1x (BD Bioscience), marcadas com Anexina-V PE (Immunotools) por 15 minutos a temperatura ambiente e analisadas para a porcentagem de apoptose por citometria de fluxo com o equipamento FACS Calibur e FACS Verse™ (BD Biosciences, San Jose, CA). Os dados foram expressos pela porcentagem gerada da população marcada com a anexina no dot plot, os quais foram realizados em pelo menos três experimentos independentes.

3.19 Ensaio de proliferação de linfócitos T primários

Para medir as divisões celulares dos linfócitos T em resposta a uma estimulação antigênica, nós realizamos o ensaio de proliferação marcando com CFSE os linfócitos T efetores modificados após sete dias da ativação e cocultivamos com a célula-alvo Nalm-6 em placa de 24 poços a 1.10^6 células/ml em meio RPMI-10% SFB (Vitrocell) numa proporção de 2:1 (efetor:alvo) por 5 dias, trocando meio e repondo IL-2 (50U/ml) a cada dois dias. A detecção dos linfócitos T marcados foi realizada por citometria de fluxo, em fluxo lento (low), no FACS Verse™ (BD Biosciences, San Jose, CA)

Para ajudar na interpretação destes resultados, nos servimos do software ModFit LT 5.0 (Verity Software House). Este algoritmo usa modelos matemáticos que permitem distinguir com precisão os picos de gerações das divisões celulares.

3.20 Análise estatística:

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Para realizar múltiplas comparações, utilizamos o teste *One-way* ANOVA seguido do teste post hoc de Bonferroni. Para comparação das médias entre dois grupos experimentais utilizamos o teste *t* Student. Em todas as análises, realizamos a equalização prévia das amostras com relação a porcentagem da expressão do receptor quimérico anti-CD19. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

4.RESULTADOS

4.1 Otimização e caracterização da expressão do CAR anti-CD19

Como prova de princípio de que podíamos expressar os transgenes quiméricos na membrana celular de linfócitos T humanos, escolhemos inicialmente as células da linhagem leucêmica T Jurkat para os testes de transferência gênica, otimizando a quantidade de partículas virais utilizada e o processo de transdução. Nas condições escolhidas, a transdução foi realizada em apenas um ciclo de *spinoculation*, na presença de polibreno. Este último é um polímero carregado positivamente, capaz de reduzir os efeitos eletrostáticos repulsivos, o que aumenta a adsorção produtiva das partículas vetoriais, uma vez que a membrana celular e o envelope viral possuem carga negativa (Davis *et al.*, 2002). Deve ser ressaltado que não foi utilizada nenhuma estratégia adicional para aumentar a eficiência de transdução, como a concentração de partículas virais ou o pré-carregamento dos vetores em retronectina.

Como a Jurkat é uma linhagem leucêmica com alto índice proliferativo e metabólico, torna-se mais fácil o acesso ao núcleo e consequentemente a integração genômica da sequência viral. Baseado nesta premissa, testamos MOIs (multiplicidade de infecção) de 5:1, 3:1 e 2:1. As duas primeiras razões foram muito tóxicas para a Jurkat, levando à morte celular progressiva. Concluímos que o MOI ideal foi de 2:1, pela melhor taxa de infecção e reduzida apoptose. Assim, após 72 horas da transdução com o MOI otimizado (2:1), conduzimos a análise fenotípica por citometria de fluxo e obtivemos uma eficiência de transdução em torno de 70%, como indicado pela expressão do receptor quimérico na superfície das células Jurkat expostas aos vírus CAR anti-CD19-GLUT1 e CAR anti-CD19 (Figura 10). Nestas condições, a viabilidade celular pós-transdução se manteve acima de 90% (dados não apresentados).

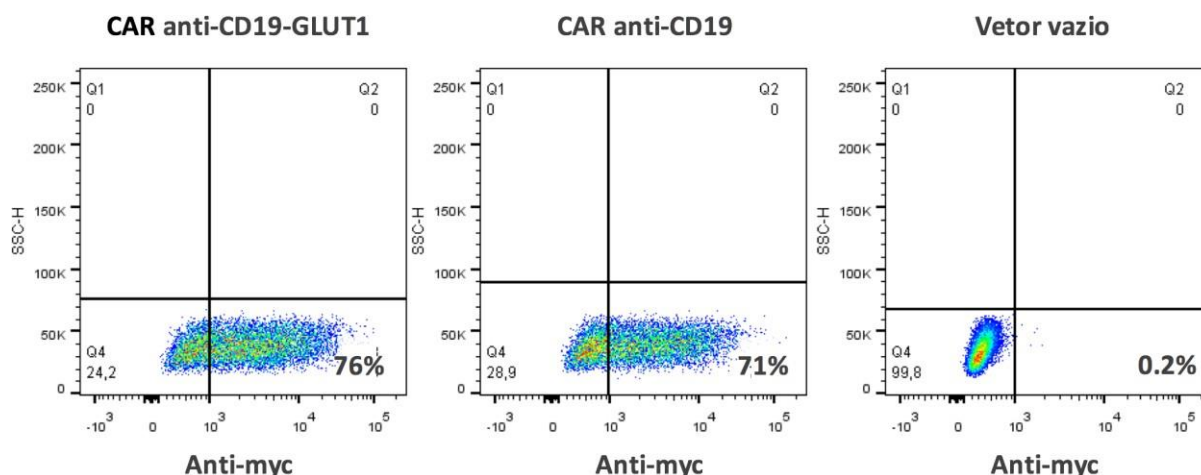


Figura 10: Expressão do receptor quimérico anti-CD19 em Jurkat transduzidas com o vetor lentiviral por citometria de fluxo. Os três diagramas (dot plot) correspondem respectivamente da esquerda para a direita aos linfócitos transduzidos com os vetores CAR GLUT 1, CAR CD19 e vazio, incubados com o anticorpo anti-Myc-Alexa-Fluor 488.

Os linfócitos T primários possuem características específicas que os diferem de uma linhagem leucêmica. Em uma situação fisiológica, os linfócitos T primários possuem um perfil metabólico basal não ativado, com baixa taxa de divisão celular, contrariamente ao que se observa em linhagens como a Jurkat (Hanazono *et al.*, 2000). Portanto, o próximo passo foi realizar a transposição e otimização dos protocolos de transdução para linfócitos T primários. Foi necessário testar as condições básicas de transdução no que diz respeito: à ativação dos linfócitos, ao uso de retronectina, à concentração do sobrenadante viral e ao MOI ideal para as células T primárias.

Inicialmente, ativamos os linfócitos T com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 recobertos em microesferas magnéticas por 48 e 72 horas. Em experimentos preliminares realizados pela equipe, verificamos que a partir de 72 horas ocorre o pico de divisão celular; portanto, escolhemos este período para realizar as transduções de linfócitos primários.

Em um primeiro teste, fizemos uso apenas do polibreno (8µg/ml) e 50 UI/ml de IL2, sem retronectina e sem concentração viral. Efetuamos dois ciclos de transdução, incorporando no primeiro deles 90 min de *spinoculation* das células-alvo e sobrenadante viral. Este protocolo se mostrou física e quimicamente mais agressivo para os linfócitos T primários pela centrifugação em alta velocidade e exposição prolongada ao agente catiônico. Em uma segunda condição, utilizamos os linfócitos ativados por 72 horas e realizamos apenas 1 ciclo de transdução, no qual lotes de vírus concentrados 100x (1×10^8 partículas/ml) foram previamente carregados em placas tratadas com retronectina. A retronectina é um fragmento de fibronectina humana recombinante que interage com alvos celulares e com as partículas virais, aproximando-os de forma a facilitar

a transdução. Após o carregamento do vírus na placa, adicionamos delicadamente os linfócitos T juntamente com polibreno e IL-2. Este protocolo tem a duração de 16 h e se revelou mais vantajoso, sobretudo por não submeter os linfócitos ao estresse de uma alta força *g*.

Nas duas condições testada utilizamos um MOI estimado de 6 e após 72 horas de transdução, observamos uma boa eficiência de transdução nas duas condições testadas, com aproximadamente 60% de positividade da expressão do receptor quimérico anti-CD19 (figura 11). Concluimos que cada protocolo tem suas vantagens e desvantagens em relação a custo, tempo necessário e estresse físico e químico imposto aos linfócitos T. Adotamos o segundos protocolos para os experimentos ulteriores.

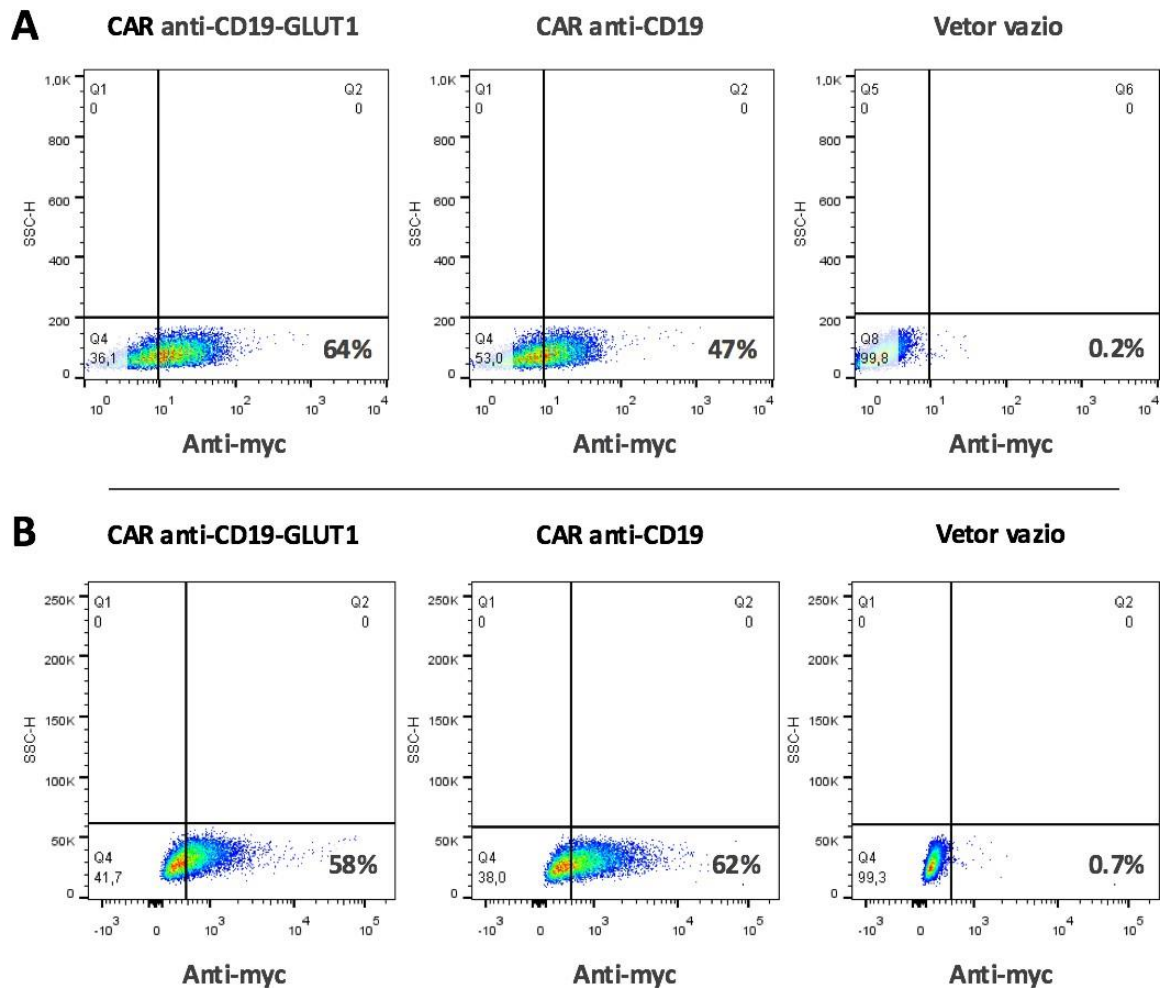


Figura 11: Expressão por citometria de fluxo do receptor quimérico anti-CD19 em linfócitos T primários transduzidos com os vetores lentivirais. A: Os diagramas (dot plot) correspondem aos linfócitos transduzidos respectivamente com os vetores CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19 e vetor vazio, em dois ciclos, sem concentração viral nem retronectina. **B:** Os diagramas (dot plot) são apresentados na mesma ordem descrita acima e correspondem aos linfócitos transduzidos em placas tratadas com retronectina e submetidas a apenas um ciclo de transdução com vírus concentrado.

4.2 Caracterização da expressão do CAR anti-CD19 por microscopia confocal

De forma complementar à mensuração da expressão do CAR anti-CD19 por citometria de fluxo, realizamos o ensaio de imunofluorescência, marcando os linfócitos modificados com o anticorpo monoclonal anti-Myc-Alexa-Flúor 488 (verde) e os núcleos com DAPI (azul). Como esperado, confirmamos os resultados obtidos no experimento anterior. Observamos que os linfócitos transduzidos com o vetor vazio (controle) não expressam nenhuma molécula com um Myc tag (CAR) na membrana, ao passo que os linfócitos transduzidos com os vetores que contém os transgenes codificadores dos receptores quiméricos exibem um sinal fluorescente forte de membrana (Figura 12).

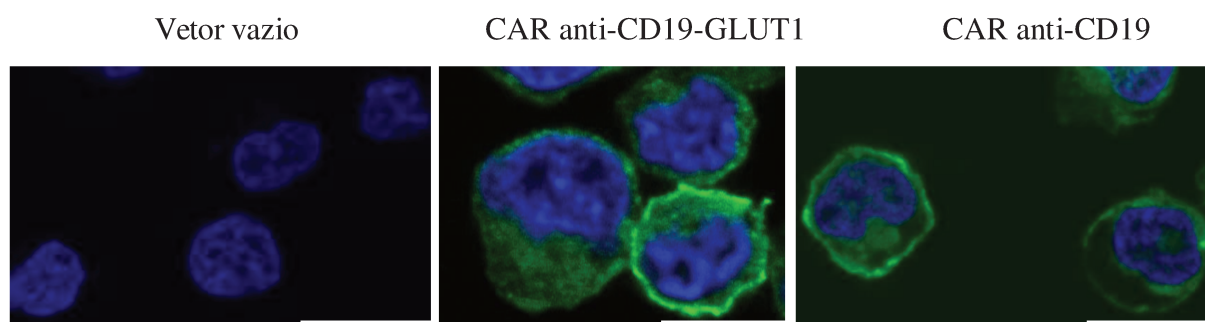


Figura 12: Expressão por microscopia confocal dos receptores quiméricos nos linfócitos modificados. Os linfócitos foram transduzidos com os vetores CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19 e vazio e incubados com o anticorpo-anti-Myc-Alexa-Flúor 488 (verde) e o fluoróforo DAPI (azul), para identificar o receptor quimérico e o DNA do núcleo, respectivamente. Foi utilizada a objetiva de 63x1.4 oil. Escala da barra = 10 μ m

4.3 Nível de expressão diferencial de GLUT1 nos linfócitos T modificados por citometria de fluxo e western blot

Tendo como foco do projeto o controle metabólico, através da expressão adicional do transgene GLUT1 inserido no vetor lentiviral, nós avaliamos se realmente existia uma expressão diferencial do transportador de glicose nos linfócitos modificados por duas metodologias complementares.

A primeira delas foi a citometria de fluxo, na qual marcamos os linfócitos transduzidos com dois anticorpos: anti-Myc-Alexa-Flúor 488 e anti-GLUT1-PE. Desta forma, conseguimos verificar que, dentro da população transduzida, existe expressão aumentada de GLUT1 na

membrana dos linfócitos CAR anti-CD19-GLUT1 (61,6 %) em relação aos linfócitos CAR anti-CD19 (39,1%) e ao vetor vazio (40,5%) ($p < 0.05$, $n:3$). Conforme o esperado, a expressão de GLUT1 constitutivo nestes dois últimos grupos foi similar, uma vez que os vetores correspondentes não carregavam o transgene para o transportador de glicose (Figura 13).

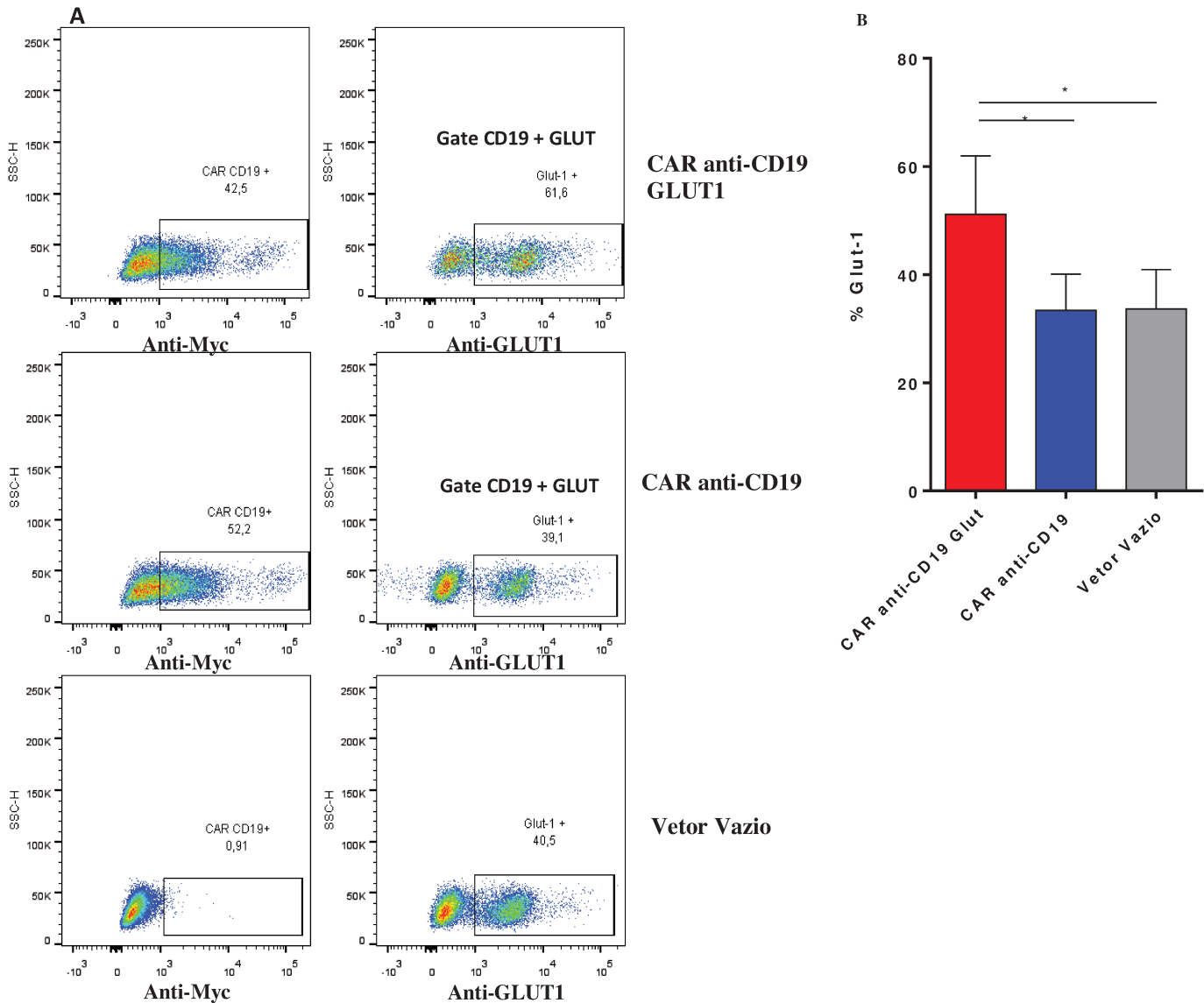


Figura 13: Análise da expressão diferencial de GLUT1 nos linfócitos T primários por citometria de fluxo. **A:** Os linfócitos transduzidos respectivamente com os vetores CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19 e vetor vazio foram incubados simultaneamente com os anticorpos anti-Myc-Alexa-Fluor 488 e anti-GLUT1 PE. A expressão diferencial de GLUT1 foi analisada dentro do gate da população positiva para o receptor quimérico (identificada pelo Myc tag). **B:** Análise estatística da expressão de GLUT1 nos linfócitos T modificados. As barras representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes analisadas por One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$.

Complementariamente nós checamos a expressão diferencial por western blot. Para este objetivo, nós incubamos os linfócitos modificados com o anticorpo primário anti-GLUT1 (clone D3J3A, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000) e como controles endógenos foram utilizados os anticorpos anti- β -tubulina (clone 2146, Cell Signaling Technology, 1: 10,000) e GAPDH (Cusabio, diluição 1: 5000).

O resultado corroborou os dados obtidos na citometria de fluxo, confirmando a expressão aumentada de GLUT1 nos linfócitos transduzidos com CAR anti-CD19-GLUT1 em relação aos demais controles, tanto para os linfócitos T primários, quanto na linhagem Jurkat. Ademais, a proteína GLUT1 foi identificada no tamanho esperado de aproximadamente 50 kDa, indicando que houve o correto funcionamento da hidrolase T2A no momento da tradução e posterior formação independente de cada proteína individual: aquela do receptor quimérico anti-CD19 e a do transportador GLUT1 (Figura 14).

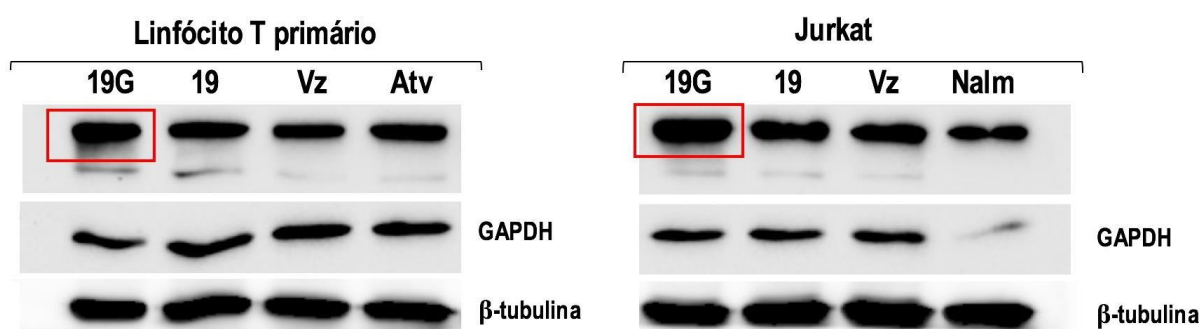


Figura 14: Nível de expressão diferencial de GLUT1 por western blot nos linfócitos T primários e Jurkat após transdução. As proteínas dos linfócitos T transduzidos foram extraídas, quantificadas e analisadas por Western blot. As membranas foram incubadas em soluções com os anticorpos anti- GLUT1 (clone D3J3A, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000) e, como controles endógenos, foram utilizados os anticorpos anti- β -tubulina (clone 2146, Cell Signaling Technology, 1: 10,000) e GAPDH (Cusabio, diluição 1: 5000). Utilizamos linfócitos T primários ativados e Nalm-6 como controle positivo da expressão de GLUT1. Os símbolos para as amostras transduzidas são: **19G**: vetor anti-CD19-GLUT1; **19**: vetor anti-CD19; **Vz**: vetor vazio; **Atv.**: linfócitos primários ativados com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 e **Nalm**: linhagem Nalm-6.

4.4 Efeito da expressão aumentada de GLUT1 sob a internalização de glicose em linfócitos T modificados

Uma vez identificada a indução de GLUT1 na membrana dos linfócitos modificados, procuramos verificar se o aumento da expressão deste transportador poderia se traduzir também num aumento na captação de glicose. Neste ensaio, incubamos linfócitos T primários com o análogo fluorescente da glicose 2-NBDG por uma hora e meia. No caso da linhagem Jurkat, a incubação se estendeu por somente 30 minutos, para compensar o *background* oriundo da ativação constitutiva do programa glicolítico nestas células tumorais.

A figura 15 mostra os resultados do teste de internalização de glicose, em que os linfócitos modificados com o CAR anti-CD19-GLUT1, apresentaram um maior *uptake* do sacarídeo, que foi estatisticamente significativo em relação aos linfócitos transduzidos com CAR anti-CD19 e vetor vazio, os quais não possuem um transgene para a indução adicional de GLUT1. A Intensidade Média de Fluorescência (MFI) foi de 1850 para versão com GLUT1, contra um MFI de 1500 para ambos os controles ($p < 0.05$, $n:3$). Esta avaliação foi realizada também em Jurkat transduzida que, apesar de apresentar níveis basais de captação de glicose substancialmente elevados, reproduziu a mesma tendência. As células Jurkat modificadas com o CAR anti-CD19-GLUT1 tiveram um aumento estatisticamente significativo no aporte de glicose, apresentando uma MFI de 1500, enquanto os valores basais das sublinhagens portadoras do CAR anti-CD19 e vetor vazio, ficaram em torno de 1340 ($p < 0.05$, $n:3$).

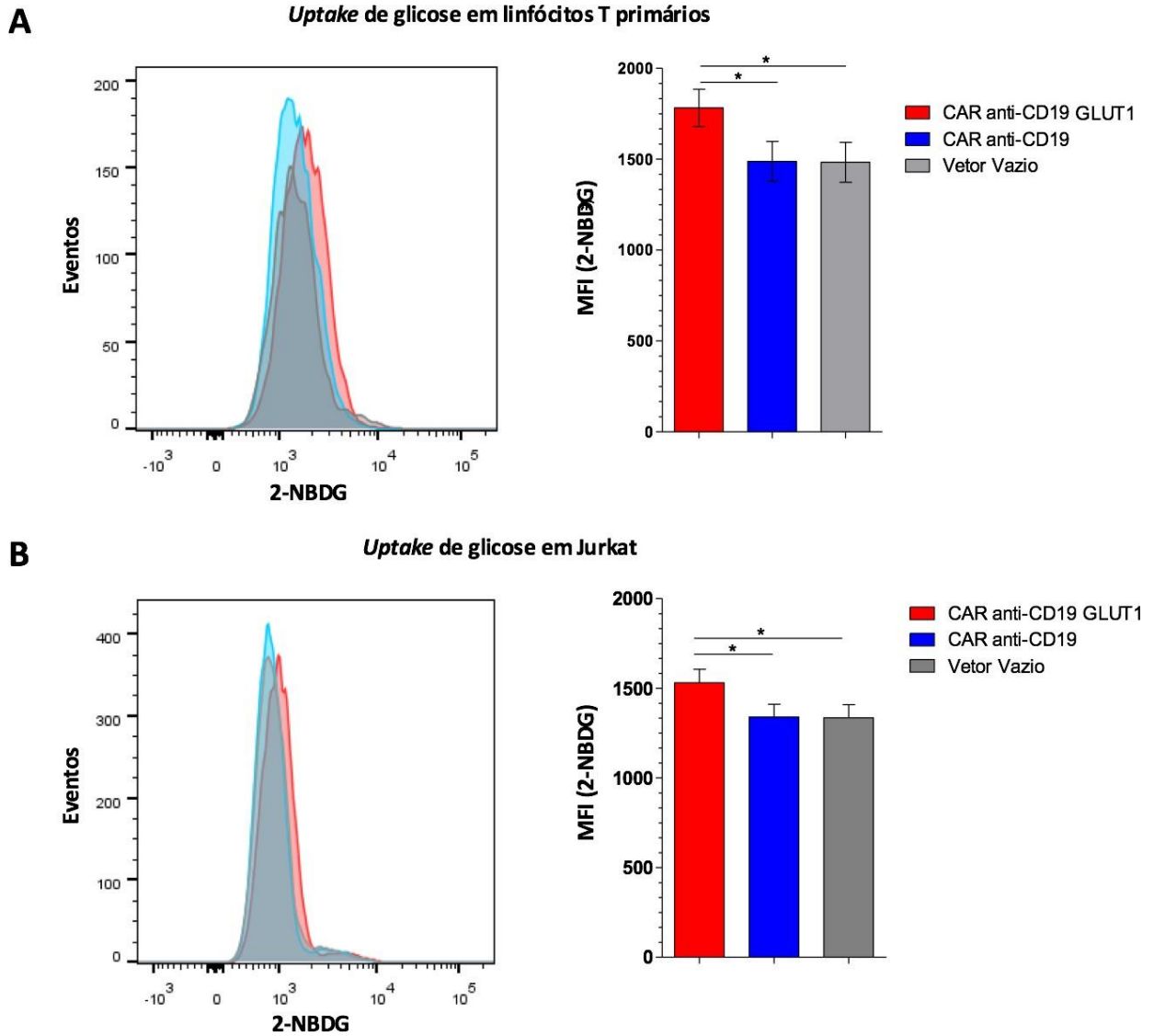


Figura 15. Teste de incorporação de 2-deoxi-D-glucose (2-NBDG) em linfócitos T. Os linfócitos T primários em **A** e Jurkat em **B** foram incubados com a glicose marcada (2-NBDG) e comparamos a internalização de glicose pelas células modificadas com os vetores CAR anti-CD19- GLUT1 (vermelho), CAR anti-CD19 (azul) e o vetor vazio (cinza) foi mensurada por citometria de fluxo. As barras representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. A Significância estatística foi determinada pelo teste One-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni. * $p < 0.05$.

4.5 Ensaio funcional para avaliar a formação de sinapses

Para avaliar o impacto funcional da expressão do receptor quimérico anti-CD19, foram realizados experimentos de formação de sinapse *in vitro*. Nestes ensaios, células leucêmicas B que expressam CD19 (Nalm-6) foram marcadas com CFSE e colocadas em cocultivo com células Jurkat transduzidas.

Observamos que as células transduzidas com CAR anti-CD19-GLUT1 e CAR-anti-CD19 formaram sinapses, indicando uma atividade de sinalização de ativação do linfócito transduzido que é produzida pelo sinal 1, através da cadeia ζ do CD3 e pelo sinal 2, através do segmento intracelular da molécula coestimulatória 4-1BB. A figura 16 ilustra um experimento representativo. Podemos então dizer que o transgene CAR anti-CD19, não só está sendo expresso na superfície celular, mas também apresenta atividades funcionais.

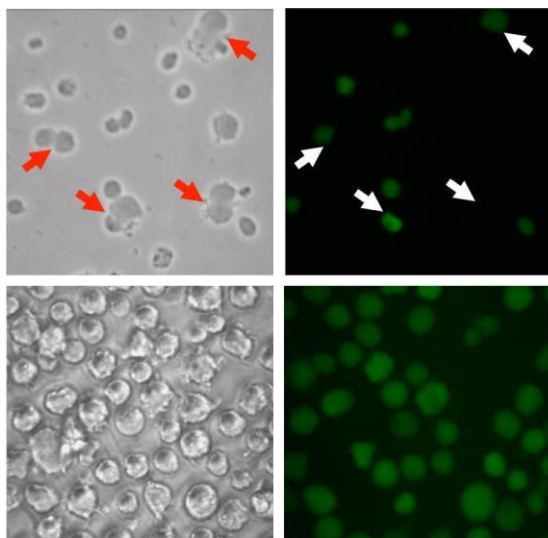


Figura 16: Ensaio de formação de sinapses. Painéis superiores: fotografias de conjugados entre Jurkat expressando o receptor quimérico anti-CD19-GLUT1 e células leucêmicas Nalm-6 em luz visível (esquerda) e fluorescência (direita). Painéis inferiores: fotografias de conjugados entre Jurkat parental e células Nalm-6 em luz visível (esquerda) e fluorescência (direita). Nalm-6 foi previamente marcada com CFSE.

4.6 Bioenergética dos linfócitos T CAR modificados

Nossa principal proposta de trabalho foi tornar o linfócito T CAR anti-CD19 mais eficaz, com aumentada vida útil efetora através da inserção do transgene GLUT1. Esperávamos, por consequência, que esta alteração genética impactaria não somente no aporte de glicose, mas também diretamente sobre o metabolismo celular. Por este motivo, realizamos a investigação e caracterização da bioenergética das células modificadas.

Utilizamos o equipamento Seahorse Analyser XF24 para analisar o metabolismo. Apesar de sua relativa simplicidade, as medidas de consumo de oxigênio são as que fornecem dados mais fidedignos à função mitocondrial, produzindo uma medida integrativa das complexas vias metabólicas acopladas (Pesta e Gnaiger, 2012).

Com a utilização de drogas inibidoras dos complexos respiratórios, que induzem um fenótipo de estresse com demanda de energia na mitocôndria de células vivas, foi possível

analisar em tempo real o consumo de oxigênio (OCR) basal, a fração do consumo de oxigênio relacionado com a síntese de ATP, a respiração máxima e a reserva respiratória.

Com base no gráfico da taxa de consumo de oxigênio gerado pelo Seahorse revelou que os linfócitos CAR anti-CD19 GLUT1 apresentam um consumo de oxigênio basal e OCR máximo significativamente aumentados em relação aos controles que contêm CAR anti-CD19 ou vetor vazio ($p < 0.05$, $n:3$) (Figura 17).

A reserva respiratória (SRC) do CAR anti-CD19 GLUT1 também é maior em relação aos controles, com diferença significativa em relação aos linfócitos controle com vetor vazio ($p < 0.05$) (Figura 17).

Existe também uma tendência aumentada do consumo de oxigênio relacionado à síntese de ATP nos linfócitos CAR anti-CD19 GLUT1 em relação aos controles.

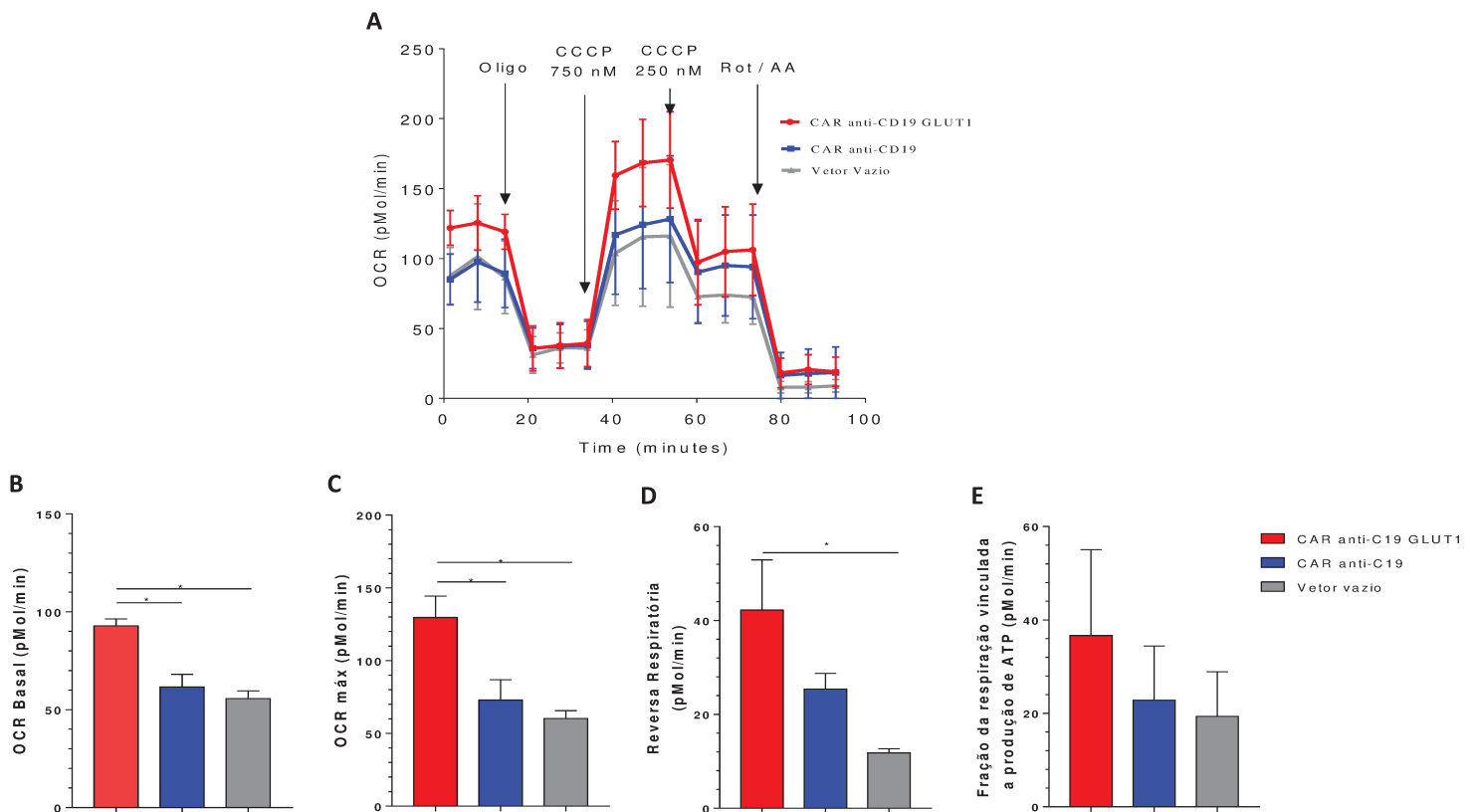


Figura 17: Efeito da co-expressão do CAR anti-CD19 e do transportador de glicose GLUT1 na respiração mitocondrial do linfócito T. **A:** Taxa de consumo de oxigênio (OCR) dos linfócitos modificados sob condições metabólicas basais e em resposta a inibidores mitocondriais. **B:** Níveis de OCR basal **C:** Nível máximo de respiração (OCR máx) **D:** Níveis de reserva respiratória **E:** Níveis da fração da respiração vinculada à produção de ATP. Os linfócitos modificados foram ressuspensos em meio DMEM sem fenol, pH 7,4 e suplementado com glicose 10 mM, piruvato 1mM, glutamina 2mM e Hepes 20 mM, à uma densidade de 200.000 células/poço. As células foram submetidas aos tratamentos indicados durante o ensaio no equipamento Seahorse Analyser XF24. As barras representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. A Significância estatística foi determinada pelo teste One-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni. * $p < 0.05$.

Para avaliarmos a via glicolítica dos linfócitos modificados com o CAR, nós medimos a concentração de lactato nos sobrenadantes dos cultivos em condições fisiológicas ou de estresse mitocondrial, utilizando os inibidores oligomicina e antimicina por 48 horas em três experimentos independentes.

Durante a glicólise, a glicose é quebrada, produzindo duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e a conversão da coenzima NAD⁺ em NADH. Para manter uma alta taxa glicolítica, o NADH necessita ser convertido de volta a NAD⁺ e isto é alcançado pela redução do piruvato a lactato, uma reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase. (Schurich, Magalhães e Mattsson, 2019).

Portanto, sendo o lactato um subproduto da via glicolítica, nós medimos sua concentração no sobrenadante dos cultivos e encontramos uma produção aumentada nos linfócitos CAR anti-CD19 GLUT1 (75.77 mg/dl) em relação aos controles CAR anti-CD19 ($p < 0.05$, 48.36mg/dl) e vetor vazio (56.27mg/dl) sob condições fisiológicas de cultivo. Reforçando este resultado, encontramos este mesmo aumento sob condições de estresse mitocondrial nos linfócitos CAR anti-CD19 GLUT1 (97.16 mg/dl) em relação aos controles CAR anti-CD19 (60.44 mg/dl) e vetor vazio ($p < 0.05$ 60.94 mg/dl) (Figura 18).

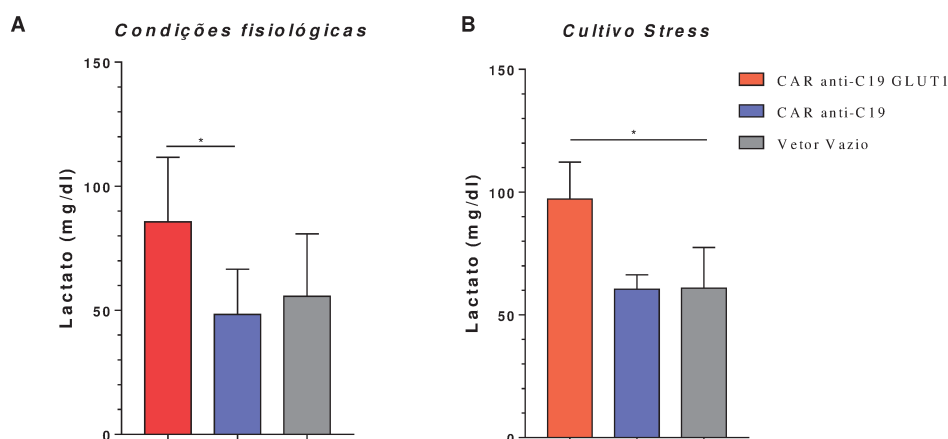


Figura 18: Efeito da co-expressão do CAR anti-CD19 e do transportador de glicose GLUT1 no metabolismo da via glicolítica. As concentrações de lactato foram medidas por metodologia enzimática colorimétrica no sobrenadante dos linfócitos modificados mantidos por 48 horas em condições fisiológicas de cultivo em **A** e de estresse mitocondrial em **B**, utilizando 1 μ g/mL de oligomicina e 1 μ M de Antimicina A. As barras representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste One-Way ANOVA e pós teste de Dunn's em A e o p value foi calculado pelo teste *t* pareado, two-tailed em B. * $p < 0.05$.

O conjunto desses dados indica que os linfócitos T CAR anti-CD19 GLUT1 estão utilizando mais as vias da fosforilação oxidativa e glicolítica em relação aos controles, uma vez que estas células já apresentam uma respiração basal aumentada e, quando são submetidas a uma situação de estresse farmacologicamente induzido, mostram melhor resposta com maior consumo máximo de oxigênio (OCR máx), maior reserva respiratória e maior metabolização da glicose em lactato.

4.7 Avaliação da função efetora antineoplásica dos linfócitos T modificados in vitro

4.7.1 Linfócitos T que expressam o CAR anti-CD19-GLUT1 potencializam a liberação de IFN- γ em resposta ao antígeno

Uma forma de medir a atividade efetora antineoplásica dos linfócitos modificados é a quantificação da produção de citocinas como, por exemplo, o IFN- γ . Esta citocina pró-inflamatória está envolvida na regulação da resposta imunológica, sendo liberada pelos linfócitos T, quando estes encontram um antígeno estranho.

Os linfócitos T ativados foram igualmente transduzidos com os vetores lentivirais e foram cocultivados com as células-alvo Nalm-6 em uma proporção de 1:1. Após o período de incubação de 16 horas, dosamos o IFN- γ por ELISA

Este ensaio de quantificação foi realizado em triplicata e identificou uma produção aumentada e estatisticamente significativa de IFN- γ ($p < 0.05$, $n:3$) no cocultivo das células-alvo Nalm-6 com os linfócitos modificados com o vetor CAR anti-CD19-Glut (6.5 ng/ml/ 10^6 células), em relação aos linfócitos que receberam o CAR anti-CD19 (3.5 ng/ml/ 10^6 células) ou o vetor vazio (2 ng/ml/ 10^6 células) (figura 19).

Os linfócitos T transduzidos sem cocultivo, apresentaram produção basal em torno de 2 ng/ml, significativamente menor em relação aos linfócitos com cocultivo com o alvo Nalm-6, exceto para os linfócitos com vetor vazio, como seria esperado, uma vez que estes linfócitos não são capazes de reconhecer o alvo.

Estes resultados sugerem que os linfócitos que coexpressam o transportador GLUT1 têm melhor atividade efetora na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- γ .

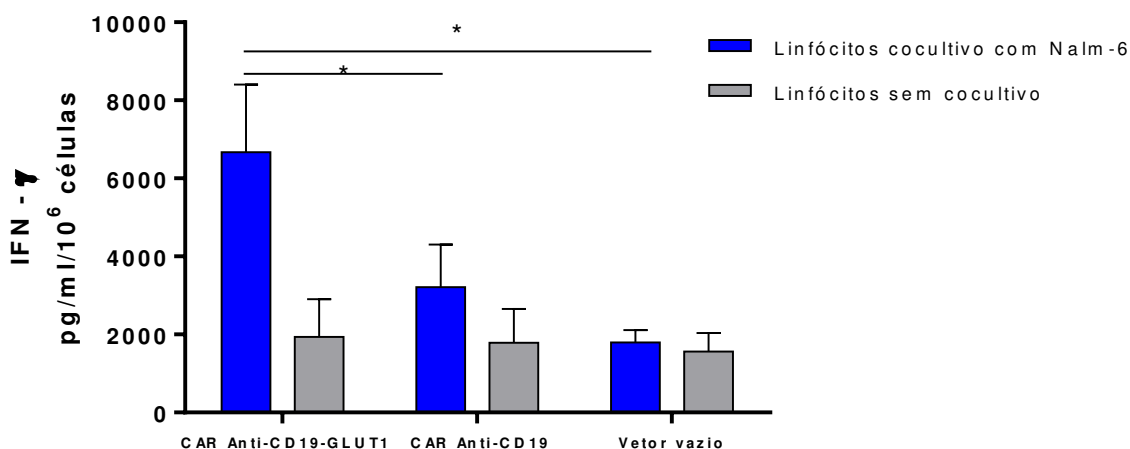


Figura 19: Quantificação da produção de IFN- γ pelas células T primárias transduzidas. Os linfócitos T transduzidos foram cocultivados com o alvo Nalm-6 numa proporção de 1:1 e o sobrenadante deste cocultivo foi recolhido após um período de 16 horas, para realizar a dosagem de IFN- γ por ELISA. As barras representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. A Significância estatística foi determinada pelo teste One-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni. * $p < 0.05$.

4.7.2 Efeito antineoplásico de linfócitos T primários humanos CAR anti-CD19⁺

A atividade citotóxica dos linfócitos T CAR anti-CD19⁺ foi avaliada em testes de depleção *in vitro* por cocultivo. Linfócitos T primários foram transduzidos com um dos três vetores (CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19 e vetor vazio) e coincubados com uma linhagem leucêmica B, que expressa o marcador de superfície CD19 (Nalm-6) numa proporção efetor:alvo de 5:1. A porcentagem de células CD19-positivas foi verificada por citometria de fluxo, depois de um período de 24 horas de incubação.

Com este tipo de experimento, foi possível mostrar que tanto os linfócitos T CAR anti-CD19-GLUT1 quanto o CAR anti-CD19 possuem uma atividade efetora citotóxica comparável e específica contra o alvo CD19⁺, sendo capazes de eliminar eficientemente as células leucêmicas (Nalm-6). Ao fim do experimento ilustrativo apresentado na figura 20, restaram apenas 18,9% e 13,9% de células-alvo vivas nos cocultivos com efetoras positivas para os CARs anti-CD19-GLUT1 e CAR-anti-CD19, respectivamente. Os linfócitos T primários transduzidos com o vetor vazio funcionaram como controle interno, não tendo sido capazes de eliminar as células-alvo leucêmicas (61,9% de células Nalm-6 vivas).

Visto de outra forma, se considerarmos o número de células tumorais vivas presentes nos cocultivos com os linfócitos efetores transduzidos com o vetor vazio como sendo o máximo (100%) da carga tumoral do experimento, os índices de depleção neoplásica *in vitro* alcançados com linfócitos portadores do CAR anti-CD19 foram de 86% para a versão simples e de 81% para aquela com o GLUT1. É também digno de nota que os linfócitos T primários transduzidos não foram capazes de eliminar a linhagem celular controle K562, quando com ela foram cocultivados. Estalinhagem celular não expressa CD19 e é altamente sensível à atividade inespecífica NK-like. Aproximadamente 45% das células-alvo ainda estavam vivas ao fim do experimento em todos os cocultivos com os linfócitos modificados (figura 20)

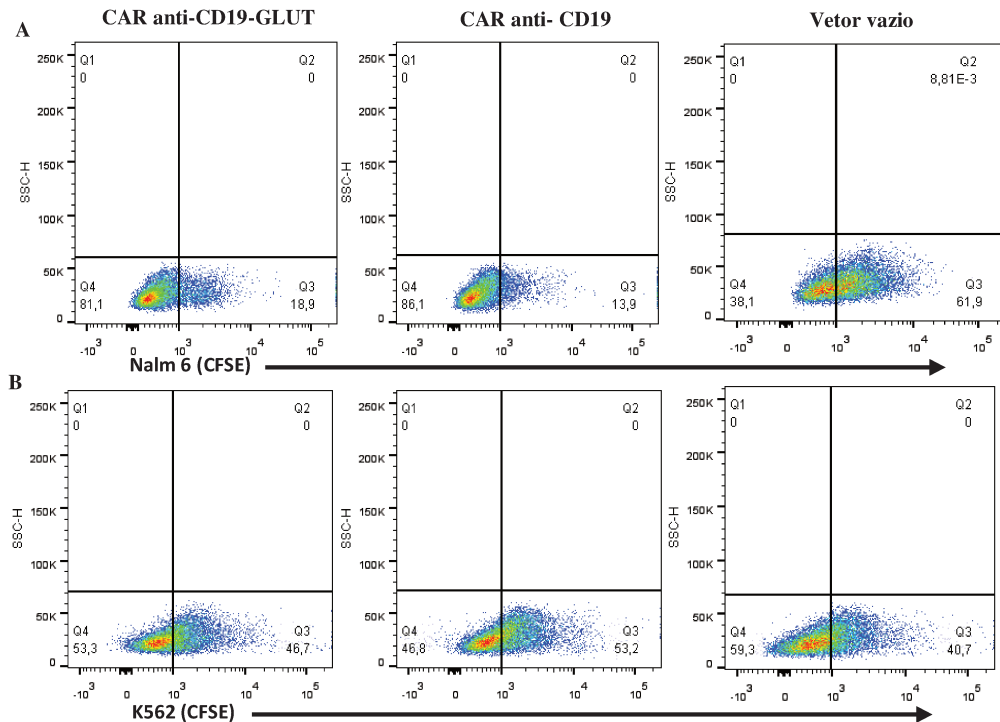


Figura 20: Efeito citotóxico dos linfócitos T primários expressando o receptor quimérico CAR anti-CD19. O painel A ilustra a atividade citotóxica dos linfócitos transduzidos com os vetores CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19 e o controle vetor vazio, os quais foram cocultivados com as células leucêmicas Nalm-6. O painel B mostra a atividade citotóxica dos mesmos linfócitos T primários transduzidos com os receptores quiméricos e cocultivados com a linhagem celular controle K562. As linhagens-alvo foram previamente marcadas com CFSE antes do cocultivo.

Complementando o resultado prévio de depleção por cocultivo verificado por citometria de fluxo, nós realizamos a avaliação da função efetora citotóxica *in vitro* dos linfócitos modificados com o padrão-ouro de quantificação citolítica, ou seja, o teste de liberação de Cr^{51} . As células-alvo foram marcadas com o isótopo radioativo e incubadas com as células T modificadas em proporções decrescentes. Dentre as células-alvo, utilizamos novamente a linhagem leucêmica Nalm-6, que expressa o antígeno-alvo CD19, bem como a linhagem sensível à atividade NK, K562.

Com este ensaio mais sensível, usado como referência de teste de citotoxicidade, nós encontramos os mesmos resultados obtidos anteriormente, como ilustrado pelos resultados do experimento representativo apresentado na figura 21. Os linfócitos T humanos primários, modificados com vetores lentivirais, exibiram atividade citolítica comparáveis, em torno de 40%, mostrando que estão funcionando como células efetoras antineoplásicas *in vitro*, sendo capazes de reconhecer os alvos que expressam o marcador de superfície CD19 e eliminá-los em diversas proporções efetor:alvo (Figura 21). As células transduzidas com o vetor vazio não foram capazes de reconhecer o alvo, como esperado. Assim como observado nos testes de depleção por cocultivo, realizados com a linhagem celular K562, também não houve reconhecimento da mesma pelos linfócitos T que expressam o receptor quimérico anti-CD19, apresentando apenas uma morte celular basal de 10%.

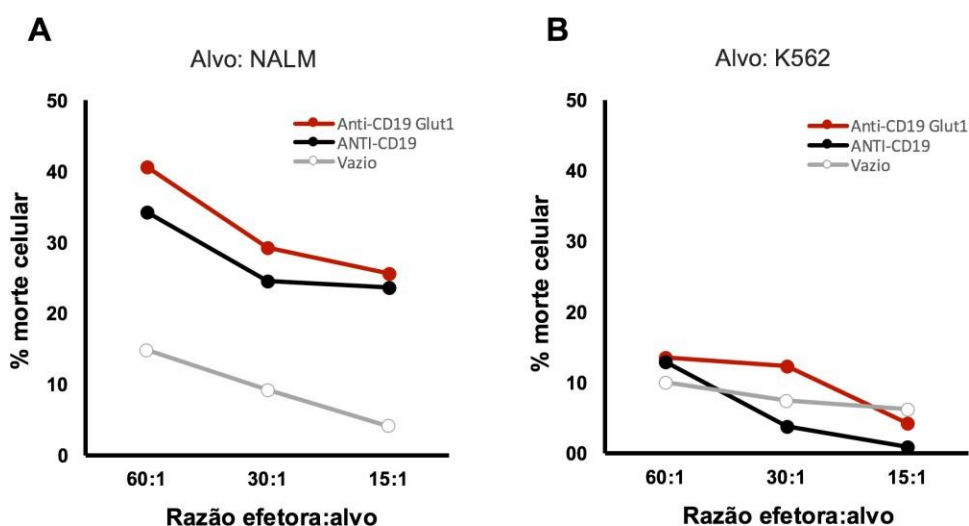


Figura 21: Capacidade citotóxica dos linfócitos T que expressam o CAR anti-CD19 medidas pela liberação de Cr^{51} . **A:** Linfócitos T primários transduzidos com um dos três tipos de vetores indicados foram cocultivados em três razões efetor:alvo com a linhagem leucêmica Nalm-6 marcada com Cr^{51} e em **B** com a linhagem K562 marcada com Cr^{51} .

4.7.3 A expressão transgênica de GLUT1 aumenta a sobrevida dos linfócitos T CAR⁺ em condições de stress metabólico.

Os momentos mais críticos para os linfócitos ocorrem no final da expansão clonal ou dentro do microambiente tumoral, em circunstâncias em que existem escassez de glicose e uma propensão à apoptose (Michalek e Rathmell, 2010). De fato, a apoptose é um fator importante, que pode ter impacto sobre a função efetora dos linfócitos modificados, pois quanto maior a sobrevida dos efetores, mais células leucêmicas serão eliminadas. Para abordar esta possibilidade, nós desenhamos um ensaio para simular a realidade fisiológica do estresse, representado pela falta de nutrientes e substratos energéticos, cultivando os linfócitos em meio RPMI com uma concentração limitante de glicose de 2,4 mM por 24 horas. Em seguida, analisamos o perfil de apoptose celular com anexina V, por citometria de fluxo.

Com este ensaio, nós conseguimos demonstrar, que em condições de escassez de glicose, os linfócitos transduzidos com o vetor CAR anti-CD19-GLUT1 apresentam uma sobrevida significativamente maior (23% de apoptose), em relação aos que foram modificados com o vetor CAR anti-CD19 (47,6% apoptose), bem como aos que receberam o vetor vazio (54,4% apoptose) $p < 0,05$, $n:3$ (Figura 22). Vê-se que os linfócitos que carregavam apenas o CAR anti-CD19 apresentaram uma taxa de apoptose bem parecida com aquela dos linfócitos modificados com vetor vazio, não oferecendo nenhuma vantagem de resistência à apoptose num microambiente estressor.

Realizamos também um controle de cultivo em meio RPMI completo, com níveis normais de glicose, para todos os linfócitos transduzidos e pudemos observar que não houve diferença de sobrevidas nestas condições, apresentando taxas de apoptose basais muito similares, em torno de 15%.

Como uma forma de validar e consolidar os resultados encontrados com os linfócitos T primários, nós submetemos as células Jurkat ao mesmo teste de estresse metabólico, desta vez um pouco mais agressivo, com meio RPMI sem glicose, glutamina e soro por 4 horas e meia. Estas condições foram escolhidas pelo fato desta linhagem ser mais resistente a condições de estresse. Os resultados com a Jurkat suportaram os dados obtidos anteriormente, mostrando a maior sobrevida dos linfócitos CAR anti-CD19-GLUT1 (28% de apoptose) em relação aos controles (40% de apoptose) ($p < 0.05$, $n:3$).

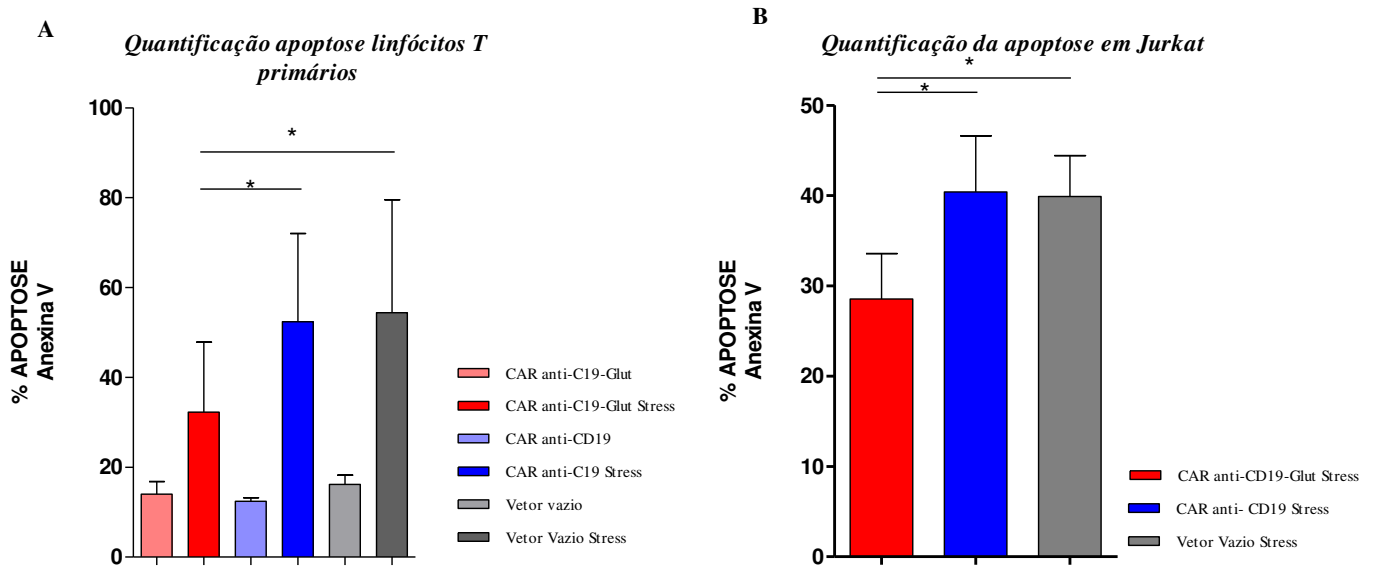


Figura 22: Quantificação da apoptose nos linfócitos T CAR⁺ cultivados em condições normais e de restrição de glicose. **A.** Percentual de apoptose em linfócitos T primários cultivados sob condições fisiológicas e de estresse com 2,4 mM de glicose por 24 horas. **B.** Percentual de apoptose registrado no cultivo da linhagem Jurkat sob condições de estresse com meio RPMI sem glicose, glutamina e soro por 4 horas e 30 minutos. Após o cultivo, as células foram marcadas com anexina V e analisadas por citometria de fluxo. O experimento foi realizado em triplicata. As barras representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes com significância estatística determinada pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

Estes resultados indicam que, conjuntamente com o aumento da produção de IFN- γ mencionada anteriormente, a expressão do transportador de glicose GLUT1 favorece o programa metabólico glicolítico, prorrogando a sobrevivência dos linfócitos em situações que parcialmente mimetizam a escassez de nutrientes característica do final da expansão clonal. Isto sugere, portanto, que existe uma vantagem efetora da coexpressão de GLUT1 e do receptor quimérico nos linfócitos T no contexto de uma futura utilização no tratamento da LLA.

4.7.4 Avaliação da proliferação celular de linfócitos T primários modificados in vitro

Para avaliar se os linfócitos T respondem com sucesso aos estímulos de expansão fornecidos, exibindo potencial de controlar o crescimento tumoral, e se existe alguma vantagem proliferativa dos linfócitos T modificados com o vetor CAR anti-CD19-GLUT1, nós fizemos um ensaio de proliferação com a marcação dos linfócitos T com 5-6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE). O CFSE é naturalmente incolor e não fluorescente. Porém, uma vez que esta droga difunde passivamente para dentro da célula, ela é clivada por esterases

intracelulares, produzindo uma molécula fluorescente que fica retida por um longo período, através de um conjugado formado com o grupo succinimidyl. Este conjugado é, então, transferido para as células filhas durante a divisão sem passar para células adjacentes, permitindo o monitoramento da proliferação por citometria de fluxo (Parish, 1999).

Para a realização deste ensaio nós cocultivamos os linfócitos T efetores modificados marcados com CFSE com a célula-alvo Nalm-6 numa proporção de 2:1 (efetor:alvo) por 5 dias em condições normais e de restrição de glicose (2.4 mM). A análise das divisões celulares foi realizada por citometria de fluxo. Porém esta análise é dificultada pelo fato dos linfócitos primários não possuírem um crescimento linear como aquele de uma linhagem tumoral; isto, porque a divisão do linfócito em resposta a um estímulo antigênico, como aquele disparado por patógenos ou células neoplásicas, exibe uma partição desigual de proteínas que medeiam a sinalização e o destino de diferenciação celular, gerando uma população assimétrica (Bocharov *et al.*, 2013). Para ajudar na interpretação destes resultados, nos servimos do software ModFit LT 5.0 (Verity Software House). Este algoritmo usa modelos matemáticos que permitem distinguir com precisão os picos de gerações das divisões celulares.

Em condições fisiológicas de cultivo, com meio RPMI completo, observamos que entre três experimentos independentes que os linfócitos transduzidos com o vetor CAR anti-CD19-GLUT1 e CAR anti-CD19 proliferaram até a 11^o geração. Porém, o linfócito CAR anti-CD19-GLUT1 demonstrou uma vantagem na quantidade de células que conseguiram chegar até esta geração, com aproximadamente 2 vezes mais células em relação ao linfócito modificado com o CAR anti-CD19 e ao linfócito transduzido com o vetor vazio. Esta diferença na quantidade de células que alcançou a mesma 11^o geração, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$, $n:3$) (Figura 23).

Nas condições de cultivo com restrição de glicose, os resultados corroboraram os dados iniciais, registrando 5 vezes mais células CAR anti-CD19-GLUT1 que alcançaram a 11^o geração em relação ao CAR anti-CD19 ($p < 0,05$, $n:3$). Os linfócitos modificados com o vetor vazio, foram ainda mais prejudicados nestas condições, tendo em vista que eles não respondem ao estímulo antigênico e, em alguns casos, nem conseguiram chegar geração final, como pode ser visto na figura 20A. Também nesta condição de cultivo, o resultado se mostrou muito mais significativo, sugerindo que num microambiente com escassez de nutrientes, como ocorre ao final da expansão clonal dos linfócitos ou dentro do microambiente tumoral, provavelmente ocorre uma seleção positiva das células T CAR anti-CD19-GLUT1. Esta interpretação está de acordo com nossos

resultados anteriores, os quais já revelaram que linfócitos T portadores do CAR anti-CD19-GLUT1 se mostraram mais resistentes à apoptose em condições de escassez de glicose.

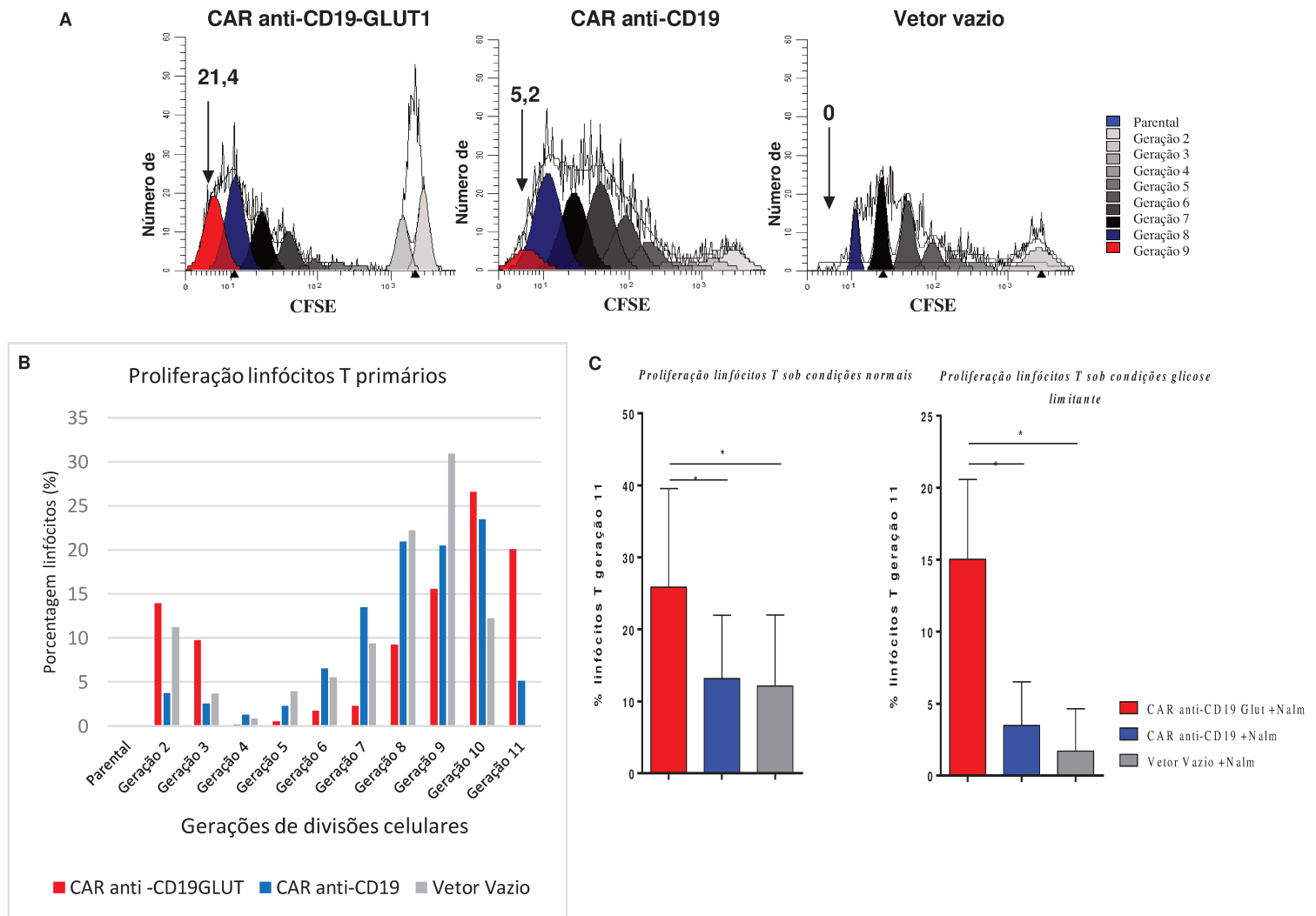


Figura 23: Avaliação da proliferação celular *in vitro* de linfócitos T primários modificados. A análise da proliferação foi realizada em linfócitos transduzidos, marcados com CFSE, cocultivados com a célula-alvo Nalm-6 (CD19+) numa proporção de 2:1 em condições restritas de glicose por 4 dias. **A:** Gráfico representativo com picos das gerações de divisões celulares, correspondentes respectivamente da esquerda para a direita aos linfócitos transduzidos com os vetores CAR anti-CD19-GLUT1, CAR anti-CD19 e vetor vazio, analisados com o Software ModFit LT 5.0. **B:** Gráfico de barras representando a porcentagem de linfócitos presentes em cada geração. **C:** Análise estatística das porcentagens de linfócitos que atingiram a geração 11 após 5 dias de cocultivo com o alvo, tanto em condições normais ou limitantes de glicose. As barras representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. A Significância estatística foi determinada pelo teste One-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni. * $p < 0.05$.

5. DISCUSSÃO

A transferência gênica nos protocolos de imunoterapia é frequentemente obtida por meio de vetores lentivirais ou vetores gamaretrovirais derivados do vírus de Moloney, que são utilizados para reprogramar *ex vivo* os linfócitos dos pacientes (Grupp *et al.*, 2013; Kalos *et al.*, 2011; Brentjens *et al.*, 2013). A complexidade logística dessas manipulações se torna evidente quando se conclui que o número de linfócitos terapêuticos usados nesses protocolos pode chegar 10^7 - 10^9 por paciente (Kalos *et al.*, 2011; Porter *et al.*, 2011; Kochenderfer *et al.*, 2012). Ademais, ficou claro nas primeiras tentativas de imunoterapia gênica do câncer, realizadas com tumores sólidos e em especial com tumores de ovário, que uma fração substancial dos linfócitos terapêuticos injetados morrem por apoptose ou perdem a função *in vivo* (Maher *et al.* 2002). O efeito terapêutico fica, assim, dependente da subpopulação efetora sobrevivente. No caso da imunoterapia gênica da leucemia, esta limitação foi parcialmente abordada pela modificação do transgene que codifica o receptor de antígeno quimérico de forma a incluir um segmento de co-estimulação do CD137 (ou CD28) que facilita a expansão dos linfócitos efetores *in vivo* (Porter *et al.*, 2011; Brentjens *et al.*, 2013; Maher *et al.* 2002; Milone *et al.* 2009). Este formato permitiu a obtenção da primeira cura de um paciente com leucemia linfóide aguda recidivada e refratária à quimioterapia (Grupp *et al.*, 2013) e inspirou um número de estudos clínicos de fase I/II para testar esta estratégia (Van Bruggen *et al.*, 2019; Ghorashian *et al.*, 2019; Adachi *et al.*, 2018; Tschumi *et al.*, 2018). Todavia, é necessário otimizar vários aspectos para que seja possível estender esta opção a um maior número de pacientes recidivados e efetivamente incorporá-la à conduta terapêutica regular. Dentre os aspectos mais limitantes da estratégia, destacam-se (i) a grande quantidade de cada vetor a ser produzida para cada paciente; (ii) o número elevado de células a serem transduzidas, não obstante a expansão *in vivo* e (iii) o custo elevado da produção/purificação de vetores e transdução de linfócitos.

Além disso, na imunoterapia gênica da leucemia linfóide aguda, os linfócitos periféricos são transduzidos com um vetor que lhes confere uma atividade antileucêmica (Grupp *et al.*, 2013; Kochenderfer *et al.*, 2012), formando uma população transduzida heterogênea, com células que utilizam programas energéticos definidos pelo nível de ativação do seu receptor endógeno e pelo estado de maturação antes da transdução (Fleury, Mignotte e Vayssiere, 2002; Michalek *et al.*, 2011). A aquisição do receptor exógeno confere à população transduzida um caráter pseudoclonal,

já que todas as células adquirem a capacidade de reconhecer um antígeno de superfície tumoral através do novo receptor quimérico. É plausível, desta forma, que os linfócitos que não estejam usando glicólise previamente à transdução sejam menos preparados para a proliferação e exercício da função efetora, com menor captação de glicose e maior susceptibilidade à apoptose.

Outro fator relevante a se considerar é que o microambiente tumoral é conhecido por ser imunossupressor, onde ocorre aumento da expressão de citocinas supressoras (IL-10 e TGF- β), expressão de ligantes co-inibitórios, depleção de nutrientes vitais, escassez de O₂ (hipóxia) e acúmulo de produtos tóxicos (lactato). Este ambiente se torna muito desafiante para a resposta imunológica das células T (Shurich, Magalhaes e Mattsson, 2019). Portanto, as características fenotípicas das células T que são utilizadas para a resposta imune anti-câncer constituem um fator crítico na determinação do sucesso da imunoterapia adotiva (Klebanoff *et al.*, 2012). Existem evidências crescentes tanto em modelos humanos quanto animais sugerindo que o potencial replicativo, o padrão de diferenciação e de autorenovação são importantes reguladores da atividade antitumoral e estão associados com melhor resposta (Gattinoni *et al.*, 2009; Klebanoff *et al.*, 2005; Rosenberg *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2005; Sukumar *et al.*, 2017). Neste contexto, vale lembrar que as vias metabólicas celulares possuem um importante papel na regulação da função e longevidade das células T (Chang e Pearce, 2016).

Com estas evidências aparentes, a modulação do metabolismo das células T tem sido explorada como um potencial alvo terapêutico para aumentar ou suprimir a resposta imune antitumoral (O'Sullivan e Pearce, 2015). Portanto, trata-se de uma estratégia promissora, que poderá trazer importantes benefícios terapêuticos (Kishton, Sukuma e Restifo, 2017).

Considerando estes aspectos limitantes da imunoterapia e a importância das características metabólicas dos linfócitos T frente a uma situação adversa encontrada no microambiente tumoral, propusemos otimizar o metabolismo desses linfócitos T CAR anti-CD19, inserindo o gene de transporte de glicose GLUT1 de forma a uniformizar o perfil bioenergético, melhorar a resposta efetora dos linfócitos modificados, mesmo em situação de pobreza de nutrientes e, por consequência, ter uma diminuição dos custos do tratamento.

No nosso modelo proposto de engenharia de linfócito T, obtivemos sucesso na expressão do CAR anti-CD19 na superfície dos linfócitos T modificados *in vitro*, tanto para a linhagem Jurkat quanto para os linfócitos T primários. Otimizamos com sucesso os protocolos, levando em consideração as diferenças de perfis metabólicos de cada tipo celular, produzindo boas taxas de transdução entre 40 e 70%, variando entre os experimentos. Esta expressão do receptor quimérico foi visualizada tanto por citometria quanto por microscopia confocal.

O receptor quimérico não só está sendo expresso na membrana corretamente, assim como, está exercendo seu papel funcional, uma vez que as células Jurkat transduzidas com CAR anti-CD19-GLUT1 e CAR-anti-CD19 foram capazes de formar sinapses com a células-alvo Nalm-6. Este ensaio de formação de sinapses mostra, em parte, que os diversos segmentos gênicos que foram selecionados para compor nosso receptor quimérico estão funcionando. Assim, por exemplo, o peptídeo líder que adicionamos está exercendo sua função de direcionar a internalização do receptor quimérico no retículo endoplasmático depois da tradução. Em seguida, as proteínas recém-sintetizadas passam pelo complexo de Golgi, onde sofrem modificações pós-tradução e são direcionadas para a membrana celular (Alberts *et al.*, 2002), permitindo a detecção pelos anticorpos anti-Myc e anti-GLUT1 na citometria de fluxo. Outro segmento funcional importante é a região *hinge*, uma ponte flexível que liga o ectodomínio à região transmembranar do receptor quimérico, facilitando o reconhecimento adequado do antígeno-alvo nos linfócitos B pela cadeia leve e pesada do anticorpo anti-CD19 (Huston *et al.*, 1988; Shen *et al.*, 2008). As sinapses imunológicas não se formariam na ausência desta sequência *hinge*. Igualmente, a maturação das sinapses não ocorreria sem a funcionalidade dos segmentos responsáveis pela sinalização do receptor, em especial da cadeia ζ , que é iniciadora do sinal 1 da ativação linfocitária (Dustin, 2000; Huppa e Davis, 2003).

O foco do nosso trabalho foi o controle metabólico dos linfócitos T modificados, mediado pela expressão adicional e constitutiva de GLUT1, que é a principal isoforma funcional do transportador de glicose em linfócitos T e o ponto-chave para o controle da glicólise (Chakrabarti *et al.*, 1994). Nós pudemos observar, por citometria de fluxo, que a população de linfócitos T positiva para o CAR anti-CD19-GLUT1 realmente expressava mais GLUT1 em relação aos controles e este dado foi confirmado por Western blot, tanto em linfócitos T primários e em Jurkat. Além disto, da análise por Western blot, conseguimos inferir que os dois transgenes (CAR anti-CD19 e GLUT1) estão sendo devidamente separados, pela hidrolase T2A no momento da tradução, para posterior formação independente de cada proteína (Receptor quimérico anti-CD19 e GLUT1), tendo em vista que a proteína GLUT1 aparece com o tamanho esperado de 50 kDa.

Trabalhos recentes têm demonstrado que terapias que interferem com os sinais inibitórios da imunomodulação, especificamente a inibição da proteína 4 associada ao Linfócito T citotóxico (CTLA4) e PD-1 aumentam a resposta antitumoral, podendo levar à cura de alguns cânceres, como o melanoma. Estes receptores possuem importante função na exaustão das células T e está associado com a má evolução de formas agudas e crônicas das leucemias B, suprimindo a

ativação dos linfócitos T e diminuindo a resposta imune (Siska e Rathmell, 2015; Wherry e Kurachi, 2015).

Já foi bem descrito na literatura que a utilização de bloqueadores destes receptores inibitórios (CTLA4 e PD-1) leva ao aumento da expressão de c-Myc e da atividade de PI3K/Akt/mTORC1, elevando a expressão de GLUT1 e de proteínas glicolíticas nas células T, levando a uma maior funcionalidade e competitividade metabólica dos mesmos no microambiente tumoral (Siska *et al.*, 2016).

Estes linfócitos T CAR anti-CD19-GLUT1 apresentaram uma maior internalização da glicose comparado aos controles, tanto nos linfócitos T primários quanto em Jurkat. Porém, a diferença encontrada em Jurkat foi um pouco menor, uma vez que estas células já possuem um perfil metabólico constitutivamente ativado, intensificando a utilização da via glicolítica (Gatenby e Gillies, 2004). Assim, o consumo da glicose já está próximo do seu máximo nessa linhagem leucêmica, diminuindo as possíveis diferenças de *uptake* de glicose entre os linfócitos analisados. Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang *et al.*, 2018, que compararam linfócitos T CD8⁺ com superexpressão ou diminuição da expressão de GLUT1 controlada pela utilização do microRNA miR-143. Estes autores observaram que os linfócitos com superexpressão de GLUT1 apresentavam um aumento significativo do *uptake* de glicose em relação aos linfócitos com menor expressão de GLUT1.

De forma similar ao que foi descrito acima, Rathmell *et al.*, 2003 observou aumento do *uptake* da glicose e da glicólise em linfócitos murinos com expressão constitutiva da forma ativada de Akt. Esta enzima possui um papel importante na ativação dos linfócitos, contribuindo para superexpressão de GLUT1.

A modulação metabólica realizada nos linfócitos T aqui preconizada aumenta a expressão de GLUT1 e a internalização de glicose, refletindo diretamente na eficiência bioenergética aumentando as taxas de consumo de oxigênio basal e máximo, além de uma tendência maior de reserva respiratória mitocondrial. Este último parâmetro representa a capacidade extra disponível em células para produzir energia em resposta a um aumentado estresse e está associada com a sobrevivência celular (Van der Wind *et al.*, 2012)

Esta modulação também impactou positivamente a via glicolítica, que se mostrou mais ativada nos linfócitos CAR anti-CD19-GLUT1, elevando a produção de lactato em relação aos controles sob condições fisiológicas. Nas condições de estresse mitocondrial, este resultado foi confirmado com a produção de lactato ainda mais aumentada em relação às condições fisiológicas. Isto já era esperado, uma vez que em condições de hipóxia ou disfunção mitocondrial ocorre a ativação da via glicolítica (Pearce *et al.*, 2013). Segundo Van der windt *et*

al., 2012, os linfócitos T efetores ativados mudam para o metabolismo glicolítico ou simultaneamente aumentam a regulação da fosforilação oxidativa e glicólise aeróbica, para complementar a demanda metabólica de proliferação.

Neste último estudo da via glicolítica, houve grande desvio padrão entre os resultados obtidos com as diferentes amostras, devido a variância que é característica do ensaio enzimático colorimétrico, o que explica a ausência de significância estatística entre os linfócitos CAR anti-CD19-GLUT1 e o vetor vazio em condições fisiológicas. Por este motivo, devemos aumentar o número amostral ou utilizar outra técnica mais sensível.

Um estudo desenvolvido por Chang *et al.*, 2015, mostrou que a falha na resposta das células T contra o câncer resulta do reconhecimento deficitário de antígenos e/ou supressão por outras células. Utilizando um modelo murino de sarcoma, estes investigadores identificaram que o consumo de glicose pelos tumores restringe metabólicamente as células T, levando à diminuição da atividade mTOR, da capacidade glicolítica e da produção de INF- γ , permitindo assim a progressão tumoral. Mostraram também que a utilização de anticorpos bloqueadores de CTLA-4 e PD-1 restaura a glicose no microambiente tumoral, permitindo a utilização da glicólise pelas células T e a produção de IFN- γ . Outra consequência deste bloqueio foi o restabelecimento da fosforilação de alvos da via mTOR, com a consequente recuperação da capacidade glicolítica e funções efectoras dos linfócitos T. Além disso, o aumento da disponibilidade de glicose refletiu positivamente na utilização da fosforilação oxidativa, aumentando a taxa de consumo de oxigênio (OCR), indicando que este tratamento aumentou globalmente o perfil metabólico dos linfócitos T.

Portanto, as condições do microambiente podem diminuir as funções efectoras da célula T mesmo quando o antígeno é propriamente reconhecido. Esta visão é consistente com a idéia de que a ativação e remodelamento metabólico do linfócito o prepara para ser eficientemente competitivo por nutrientes, como, por exemplo, com a expressão de GLUT1 (Jacobs *et al.*, 2008).

Uma emergente narrativa que pode ser encontrada em muitos estudos é que o metabolismo ótimo para a célula T anti-tumoral é bifásico. Durante a expansão *in vitro* dos linfócitos modificados com o CAR, a manutenção de um programa de atividade metabólica moderada (fosforilação oxidativa) rende aumentada atividade anti-câncer. (Sukuma *et al.*, 2017). Inversamente, no sítio do tumor *in vivo*, uma efetiva resposta antitumoral requer uma atividade metabólica robusta, para suportar a produção de intermediários biossintéticos para proliferação celular, juntamente com a expressão de proteínas inflamatórias (Kishton, Sukumar e Restifo, 2017).

O conjunto dos dados disponíveis na literatura mostra a importância do remodelamento bioenergético para maior eficiência antitumoral dos linfócitos T, tanto no que diz respeito ao metabolismo oxidativo quanto glicolítico. Isto corrobora fortemente nossos resultados, uma vez que a abordagem imunoregulatória aqui apresentada aumenta a eficiência das duas vias.

Os linfócitos T transduzidos com o vetor CAR anti-CD19-GLUT1 também mostraram uma ação potencializada da liberação de IFN- γ em resposta ao antígeno-alvo CD19 comparado aos linfócitos transduzidos com o vetor CAR anti-CD19, sugerindo que a coexpressão constitutiva do transportador GLUT1 produz melhor atividade efetora no que diz respeito à produção de IFN- γ . Esta citocina pró-inflamatória possui um papel-chave em orquestrar a resposta imunológica e uma de suas principais funções, está no recrutamento de leucócitos para o local da infecção/neoplasia e estimulação do processamento e apresentação antigênicos. Também induz a expressão elevada de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II e eleva a atividade da proteína supressora tumoral p53, induzindo a apoptose (Murphy, Travers e Walport, 2010; Mahnker *et al.*, 2013).

Corroborando com nossas evidências, outros estudos também têm demonstrado que o metabolismo glicolítico contribui diretamente para a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , através da elevação da expressão de genes que codificam para as proteínas GLUT1 ou Pkm2, em células T localizadas em tumores (Sukumar *et al.*, 2013).

Siska *et al.* 2016, descreveram um modelo de leucemia murina, no qual foi possível demonstrar que as células neoplásicas induzem uma ativação dos linfócitos T que os tornam hiperresponsivos, com uma aumentada expressão de PD-1 e TIM3. Os linfócitos T reativos apresentam defeitos metabólicos, que incluem: reduzida ativação da via Akt/mTOR, baixa expressão do transportador GLUT1 e hexoquinase 2, bem como limitada internalização de glicose. Este fenótipo de exaustão imune pôde ser resgatado quando foram utilizados camundongos transgênicos com linfócitos T que expressam uma forma constitutivamente ativada de Akt (mAkt). Assim, após estimulação das células T mAkt transgênicas destes camundongos, houve um aumento da expressão de marcadores de ativação CD69, CD25 e CD71 e também da produção de INF- γ . Isto veio acompanhado da diminuição da expressão dos receptores inibitórios TIM3 e PD-1 no subgrupo de células T transgênicas mAkt CD8⁺. De forma relevante, a progressão da leucemia foi retardada nos animais transgênicos mAkt. Como a via Akt/mTOR está intimamente ligada à regulação da expressão de GLUT1 e ao metabolismo da glicose, não foi achado surpreendente que a expressão constitutiva deste transportador também tenha induzido

as mesmas moléculas de ativação acima descritas e IFN- γ , após a estimulação com anti-CD3.

Além dos linfócitos modificados com o CAR anti-CD19 serem capazes de responder ao antígeno-alvo com a liberação de IFN- γ , eles foram efetivos também na função efetora citotóxica, uma vez que conseguiram eliminar de forma específica reconhecendo apenas o alvo CD19⁺, eliminando as células leucêmicas (Nalm-6) e não foram capazes de eliminar as células CD19⁻ (K562), que são sensíveis a atividade NK. Além disso, observamos que a coexpressão constitutiva de GLUT1 não comprometeu a funcionalidade do receptor quimérico no que tange à atividade citolítica. Esta lise específica do alvo leucêmico foi confirmada tanto por citometria de fluxo, quanto pelo método padrão de liberação do Cr⁵¹, condizendo com os achados por Kochenderfer e colaboradores 2009, Maher *et al.*, 2002, Ren *et al.*, 2015, entre outros.

Uma vantagem importante que observamos em células que expressam o CAR anti-CD19-GLUT1, tanto em linfócitos primários quanto em Jurkat, foi a maior sobrevida, quando submetidos a um estresse metabólico. Estas condições foram parcialmente simuladas em nosso ensaio, cultivando os linfócitos em concentrações limitantes de glicose, para representar o quadro que se forma no final da expansão clonal ou dentro do microambiente tumoral, onde existe escassez de glicose (Michalek e Rathmell, 2010). A maior resistência à apoptose dos linfócitos aqui estudados pode ser explicada pelas características especiais dos mesmos como, por exemplo, a expressão aumentada e constitutiva de GLUT1, que produz uma melhora em seu perfil bioenergético. Portanto, os resultados acumulados parecem confirmar nossa hipótese de que as células que coexpressam o GLUT1 estará melhor preparadas do ponto de vista bioenergético para o final da expansão clonal e/ou para o microambiente tumoral. A consolidação do perfil glicolítico nessas células impede a ativação da enzima AMPK e o consequente bloqueio da glicólise, aumento da captação de ácidos graxos e inibição de mTOR (Inoki, *et al.*, 2012; Buzzai *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005). Assim, evita-se que a célula T volte para seu metabolismo basal de fosforilação oxidativa ou que a maioria das células efetoras morram por apoptose. De fato, a expressão constitutiva do GLUT1 ganharia mais tempo de atividade efetora para a célula T, para eliminar as células leucêmicas.

O impacto observado da expressão constitutiva do GLUT1 sobre a sobrevida e função efetora dos linfócitos CAR+ aqui preconizada possivelmente compartilha parte do mecanismo que resgata a função dos linfócitos tratados com anti-PD-1 ou anti-CTLA4, melhorando a habilidade das células T de competir com as células tumorais por limitados nutrientes que são essenciais para as funções efetoras e pode neutralizar os efeitos negativos dos produtos tóxicos liberados pelas

células tumorais.

Além da maior sobrevivência dos linfócitos T CAR anti-CD19-GLUT1 em situações de estresse, observamos também uma vantagem proliferativa dessas células em relação aos controles, em resposta ao estímulo com uma célula-alvo (Nalm-6), tanto em condições de restrição de glicose como em condições fisiológicas de cultivo. A diferença está na porcentagem de linfócitos T modificados que conseguiram alcançar a última geração da divisão celular após 5 dias de proliferação. A diferença mais significativa foi observada em condições limitantes de glicose, tendo alcançado uma magnitude 5 vezes maior de células CAR anti-CD19-GLUT1+ na 11ª geração de divisão celular em relação às aquelas desprovidas do GLUT1 exógeno. Este efeito proliferativo pôde ser observado apesar do alto *background* inerente ao nosso modelo de trabalho. Deve-se levar em consideração que, devido ao protocolo de ativação para transdução dos linfócitos, estes ainda apresentam um estado metabólico muito ativado, promovendo a utilização da via glicolítica e proliferação de forma independente da estimulação antigênica específica, explicando assim os níveis de proliferação nos linfócitos modificados com o vetor vazio em nossos experimentos.

Este resultado indica que possivelmente o perfil bioenergético favorável do nosso modelo de linfócito T, em situações em que há escassez de nutrientes, promova uma seleção positiva de células com o CAR anti-CD19 GLUT1 que resistam mais a apoptose, chegando mais células a última geração de divisão celular.

A análise global de nossos resultados, tais como o aumento da produção de IFN- γ e a função de citotoxicidade específica, indicam que nosso modelo de linfócito T com o CAR anti-CD19-GLUT1 é capaz de redirecionar a função efetora antineoplásica *in vitro* de linfócitos do sangue periférico. A isto se somam a melhor eficiência bioenergética, a maior resistência à apoptose em situações de estresse com restrição de glicose, além de uma vantagem proliferativa, apontando para uma real melhora da atividade efetora da coexpressão de GLUT1 e do receptor quimérico.

Portanto, os dados acumulados parecem favorecer a hipótese de trabalho, deixando aberta a possibilidade de que seja viável otimizar a imunoterapia para a leucemia, através do aumento de performance metabólica das células reprogramadas com a coexpressão do CAR anti-CD19 e GLUT1 se traduzindo: (i) na necessidade de uma menor quantidade de cada vetor a ser produzida; (ii) na possibilidade de se administrar um menor número de linfócitos terapêuticos e, portanto, numa menor necessidade de células transduzidas; (iii) na diminuição dos efeitos adversos associados e (iv) na redução dos custos em consequência das razões anteriores, tornando assim

este promissor tratamento mais acessível para um maior número de enfermos. Entretanto, nossos resultados devem primeiro ser corroborados *in vivo* num modelo de leucemia em animais imunodeficientes, antes de considerarmos sua relevância clínica em definitivo.

6. CONCLUSÕES

- O receptor quimérico está sendo expresso na membrana celular corretamente;
- A população de linfócitos T modificada com o CAR anti-CD19-GLUT1 possui uma expressão aumentada do transgene GLUT1 na membrana, em relação aos controles;
- As células T CAR anti-CD19-GLUT1 apresentam uma maior internalização de glicose, tanto nos linfócitos T primários quanto na linhagem Jurkat modificada;
- Os linfócitos modificados com o CAR-anti-CD19 possuem atividade funcional de reconhecimento do antígeno-alvo pela formação de sinapses;
- Os linfócitos T CAR anti-CD19-GLUT1 apresentam um perfil bioenergético com uma maior respiração basal, capacidade máxima de respiração e maior utilização da via glicolítica, comparado aos controles;
- O receptor quimérico exerce sua função efetora citotóxica de forma específica reconhecendo o alvo leucêmico CD19⁺ *in vitro*;
- A coexpressão do transportador GLUT1 tem melhor atividade efetora na produção da citocina pró-inflamatória INF- γ ;
- Em condições de escassez de glicose, os linfócitos T pró-glicolíticos CAR anti-CD19-GLUT1 possuem uma maior resistência à apoptose tanto em células primárias quanto em Jurkat.
- Existe uma vantagem proliferativa dos linfócitos T que coexpressam o transportador de glicose transgênico em resposta ao estímulo com uma célula-alvo (Nalm-6), tanto em condições de restrição de glicose como em condições normais de cultivo.

Em conjunto, esses achados nos indicam que a coexpressão do transportador de glicose GLUT1 com o receptor quimérico-anti-CD19 promove uma vantagem bioenergética, produzindo um perfil de atividade efetora mais eficaz, que talvez permita a utilização de um menor número de linfócitos modificados para o tratamento, tornando o tratamento mais acessível aos pacientes em termos de custo. Enfatizamos que este modelo de linfócito T deve ser primeiramente testado *in vivo* num modelo murino de leucemia, antes de considerar sua relevância clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, K.; KANO, Y.; NAGAI, T.; OKUYAMA, N. *et al.* IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. **Nature biotechnology**, 36 n.4, p. 346-351, Apr 2018.

ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, S. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells. **Arthritis Res Ther**, 11, n. 6, p. 257, 2009.

BAILEY, L. C.; LANGE, B. J.; RHEINGOLD, S. R.; BUNIN, N. J. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol**, 9, n. 9, p. 873-883, Sep 2008.

BALDUZZI, A.; VALSECCHI, M. G.; UDERZO, C.; DE LORENZO, P. *et al.* Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. **Lancet**, 366, n. 9486, p. 635-642, Aug 20-26 2005.

BARRETT, A. J. Acute myeloid leukaemia and the immune system: implications for immunotherapy. **British Journal of Haematology**, 188, p.147–158, 2020.

BARRETT, D. M.; SINGH, N.; PORTER, D. L.; GRUPP, S. A. *et al.* Chimeric antigen receptor therapy for cancer. **Annu Rev Med**, 65, p. 333-347, 2014.

BENTAL, M.; DEUTSCH, C. Metabolic changes in activated T cells: an NMR study of human peripheral blood lymphocytes. **Magn Reson Med**, 29, n. 3, p. 317-326, Mar 1993.

BERZOFSKY, J. A.; AHLERS, J. D.; JANIK, J.; MORRIS, J. *et al.* Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. **J Clin Invest**, 114, n. 4, p. 450-462, Aug 2004.

BESSER, M. J.; SHAPIRA-FROMMER, R.; ITZHAKI, O.; TREVES, A. J. *et al.* Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies. **Clin Cancer Res**, 19, n. 17, p. 4792-4800, Sep 1 2013.

BHOJWANI, D.; PUI, C. H. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol**, 14, n. 6, p. e205-217, May 2013.

BLONSKA, M.; LIN, X. NF-kappaB signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins. **Cell Res**, 21, n. 1, p. 55-70, Jan 2011.

BOCHAROV, G.; LUZYANINA, T.; CUPOVIC, J.; LUDEWIG, B. Asymmetry of Cell Division in CFSE-Based Lymphocyte Proliferation Analysis. **Front Immunol**, 4, p. 264, Sep 2 2013.

BOROSS, P.; LEUSEN, J. H. Mechanisms of action of CD20 antibodies. **Am J Cancer Res**, 2, n. 6, p. 676-690, 2012.

BOYIADZIS, M. M.; DHODAPKAR, M. V.; BRENTJENS, R. J.; KOCHENDERFER, J. N. *et al.* Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: clinical perspective and significance. **J Immunother Cancer**, 6, n. 1, p. 137, Dec 4 2018.

BRAND, M.D; NICHOLLS, D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochem J**, 435, p. 297-312. 2011

BRENTJENS, R. J.; DAVILA, M. L.; RIVIERE, I.; PARK, J. *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. **Sci Transl Med**, 5, n. 177, p. 177ra138, Mar 20 2013.

BRENTJENS, R. J.; LATOUCHE, J. B.; SANTOS, E.; MARTI, F. *et al.* Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. **Nat Med**, 9, n. 3, p. 279-286, Mar 2003.

BURNS, J. C.; FRIEDMANN, T.; DRIEVER, W.; BURRASCANO, M. *et al.* Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90, n. 17, p. 8033-8037, Sep 1 1993.

BUZZAI, M.; BAUER, D. E.; JONES, R. G.; DEBERARDINIS, R. J. *et al.* The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. **Oncogene**, 24, n. 26, p. 4165-4173, Jun 16 2005.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev**, 75, n. 1, p. 50-83, Mar 2011.

CARO-MALDONADO, A.; GERRIETS, V. A.; RATHMELL, J. C. Matched and mismatched metabolic fuels in lymphocyte function. **Semin Immunol**, 24, n. 6, p. 405-413, Dec 2012.

CARROLL, W. L.; RAETZ, E. A. Clinical and laboratory biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr**, 160, n. 1, p. 10-18, Jan 2012.

CARTER, P. J.; SENTER, P. D. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. **Cancer J**, 14, n. 3, p. 154-169, May-Jun 2008.

CHAKRABARTI, R.; JUNG, C. Y.; LEE, T. P.; LIU, H. *et al.* Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. **J Immunol**, 152, n. 6, p. 2660-2668, Mar 15 1994.

CHAM, C. M.; GAJEWSKI, T. F. Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8+ effector T cells. **J Immunol**, 174, n. 8, p. 4670-4677, Apr 15 2005.

CHANG, C. H.; PEARCE, E. L. Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy. **Nat Immunol**, 17, n. 4, p. 364-368, Apr 2016.

CHANG, J. T.; WHERRY, E. J.; GOLDRATH, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. **Nat Immunol**, 15, n. 12, p. 1104-1115, Dec 2014.

CHEN, C. Y.; LIU, T. Z.; CHEN, C. H.; WU, C. C. *et al.* Isoobtusilactone A-induced apoptosis in human hepatoma Hep G2 cells is mediated via increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) production and the mitochondria-associated apoptotic mechanisms. **Food Chem Toxicol**, 45, n. 7, p. 1268-1276, Jul 2007.

CHI, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. **Nat Rev Immunol**, 12, n. 5, p. 325-338, Apr 20 2012.

COOPER, L. J.; TOPP, M. S.; SERRANO, L. M.; GONZALEZ, S. *et al.* T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. **Blood**, 101, n. 4, p. 1637-1644, Feb 15 2003.

CONNOLLY, N, M, C; THEUREY, P; ADAM-VIZI, V; BAZAN, N, G. *et al.* Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. **Cell Death Differ**. 25, p. 542-72. 2018.

DAVILA, M. L.; BRENTJENS, R. J. CD19-Targeted CAR T cells as novel cancer immunotherapy for relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Clin Adv Hematol Oncol**, 14, n. 10, p. 802-808, Oct 2016.

DAVILA, M. L.; RIVIERE, I.; WANG, X.; BARTIDO, S. *et al.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. **Sci Transl Med**, 6, n. 224, p. 224ra225, Feb 19 2014.

DAVIS, H. E.; MORGAN, J. R.; YARMUSH, M. L. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. **Biophys Chem**, 97, n. 2-3, p. 159-172, Jun 19 2002.

DE OBALDIA, M. E.; BHANDOOOLA, A. Transcriptional regulation of innate and adaptive lymphocyte lineages. **Annu Rev Immunol**, 33, p. 607-642, 2015. DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**, 343, n. 1, p. 37-49, Jul 6 2000.

DEMIDENKO, A. A.; BLATTMAN, J. N.; BLATTMAN, N. N.; GREENBERG, P. D. *et al.* Engineering recombinant reoviruses with tandem repeats and a tetravirus 2A-like element for exogenous polypeptide expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 20, p. E1867-1876, May 14 2013.

DiNOFIA, A. M; MAUDE, S.L. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy Clinical Results in Pediatric and Young Adult B-ALL. **HemaSphere**, 3, n.4, 2019.

DONNELLY, M. L.; LUKE, G.; MEHROTRA, A.; LI, X. *et al.* Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. **J Gen Virol**, 82, n. Pt 5, p. 1013-1025, May 2001.

DRANKA, B.P; BENAVIDES, G. A, DIERS, A.R; GIORDANO, S. *et al.* Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. **Free Radic. Biol. Med**, 51, p. 1621-35, 2011.

DUDLEY, M. E.; WUNDERLICH, J. R.; SHELTON, T. E.; EVEN, J. *et al.* Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. **J Immunother**, 26, n. 4, p. 332-342, Jul-Aug 2003.

DULL, T.; ZUFFEREY, R.; KELLY, M.; MANDEL, R. J. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **J Virol**, 72, n. 11, p. 8463-8471, Nov 1998.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD, L. J. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, 3, n. 11, p. 991-998, Nov 2002.

DUSTIN, M. L.; COOPER, J. A. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. **Nat Immunol**, 1, n. 1, p. 23-29, Jul 2000.

EDINGER, A. L.; CINALLI, R. M.; THOMPSON, C. B. Rab7 prevents growth factor-independent survival by inhibiting cell-autonomous nutrient transporter expression. **Dev Cell**, 5, n. 4, p. 571-582, Oct 2003.

ESCORS, D.; BRECKPOT, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 58, n. 2, p. 107-119, Apr 2010.

ESHAR, Z.; WAKS, T.; BENDAVID, A.; SCHINDLER, D. G. Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. **J Immunol Methods**, 248, n. 1-2, p. 67-76, Feb 1 2001.

FINLAY, D. K. Regulation of glucose metabolism in T cells: new insight into the role of Phosphoinositide 3-kinases. **Front Immunol**, 3, p. 247, 2012.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, 84, n. 2-3, p. 131-141, Feb-Mar 2002.

FRAUWIRTH, K. A.; RILEY, J. L.; HARRIS, M. H.; PARRY, R. V. *et al.* The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. **Immunity**, 16, n. 6, p. 769-777, Jun 2002.

FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. Regulation of T lymphocyte metabolism. **J Immunol**, 172, n. 8, p. 4661-4665, Apr 15 2004.

FRENCH, D.; YANG, W.; CHENG, C.; RAIMONDI, S. C. *et al.* Acquired variation outweighs inherited variation in whole genome analysis of methotrexate polyglutamate accumulation in leukemia. **Blood**, 113, n. 19, p. 4512-4520, May 7 2009.

GALON, L.; FOX, B.A; BIFULCO, C.B; MASUCCI, G. *et al.* Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. **J. Transl. Med**, 14, n.273, 2016.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nat Rev Cancer**, 4, n. 11, p. 891-899, Nov 2004.

GATTINONI, L.; ZHONG, X. S.; PALMER, D. C.; JI, Y. *et al.* Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. **Nat Med**, 15, n. 7, p. 808-813, Jul 2009.

GAYNON, P. S. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. **Br J Haematol**, 131, n. 5, p. 579-587, Dec 2005.

GHORASHIAN, S; KRAMER, A.M; ONUOHA, S; WRIGHT, G; BARTRAM, J; RICHARDSON, R *et al.* Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. **Nat Med**, 25 n.9 p.1408-1414, 2019.

GILL, S.; PORTER, D. L. CAR-modified anti-CD19 T cells for the treatment of B-cell malignancies: rules of the road. **Expert Opin Biol Ther**, 14, n. 1, p. 37-49, Jan 2014.

GRUPP, S. A.; KALOS, M.; BARRETT, D.; APLENC, R. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. **N Engl J Med**, 368, n. 16, p. 1509-1518, Apr 18 2013.

GUPPY, M.; GREINER, E.; BRAND, K. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. **Eur J Biochem**, 212, n. 1, p. 95-99, Feb 15 1993.

HAAS, K. M.; TEDDER, T. F. Role of the CD19 and CD21/35 receptor complex in innate immunity, host defense and autoimmunity. **Adv Exp Med Biol**, 560, p. 125-139, 2005.

HAHN, C. L.; LIEWEHR, F. R. Innate immune responses of the dental pulp to caries. **J Endod**, 33, n. 6, p. 643-651, Jun 2007.

HAN, S.; LAN, Q.; PARK, A. K.; LEE, K. M. *et al.* Polymorphisms in innate immunity genes and risk of childhood leukemia. **Hum Immunol**, 71, n. 7, p. 727-730, Jul 2010.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, 21, n. 3, p. 309-322, Mar 20 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

HANAZONO, Y.; BROWN, K. E.; DUNBAR, C. E. Primary T lymphocytes as targets for gene therapy. **J Hematother Stem Cell Res**, 9, n. 5, p. 611-620, Oct 2000.

HEIKAMP, E. B.; POWELL, J. D. Sensing the immune microenvironment to coordinate T cell metabolism, differentiation & function. **Semin Immunol**, 24, n. 6, p. 414-420, Dec 2012.

HOGAN, P. G.; LEWIS, R. S.; RAO, A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. **Annu Rev Immunol**, 28, p. 491-533, 2010.

HOLLYMAN, D.; STEFANSKI, J.; PRZYBYLOWSKI, M.; BARTIDO, S. *et al.* Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. **J Immunother**, 32, n. 2, p. 169-180, Feb-Mar 2009.

HUNGER, S. P.; LU, X.; DEVIDAS, M.; CAMITTA, B. M. *et al.* Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. **J Clin Oncol**, 30, n. 14, p. 1663-1669, May 10 2012.

HUPPA, J. B.; DAVIS, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. **Nat Rev Immunol**, 3, n. 12, p. 973-983, Dec 2003.

HUSTON, E. E.; GRAMMER, J. C.; YOUNT, R. G. Flexibility of the myosin heavy chain: direct evidence that the region containing SH1 and SH2 can move 10 Å under the influence of

nucleotide binding. **Biochemistry**, 27, n. 25, p. 8945-8952, Dec 13 1988.

HUSTON, J. S.; LEVINSON, D.; MUDGETT-HUNTER, M.; TAI, M. S. *et al.* Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 85, n. 16, p. 5879-5883, Aug 1988.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, 381, n. 9881, p. 1943-1955, Jun 1 2013.

INOKI, K.; KIM, J.; GUAN, K. L. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 52, p. 381-400, 2012.

JACOBS, S. R.; HERMAN, C. E.; MACIVER, N. J.; WOFFORD, J. A. *et al.* Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. **J Immunol**, 180, n. 7, p. 4476-4486, Apr 1 2008.

JIN, J.; SABATINO, M.; SOMERVILLE, R.; WILSON, J. R. *et al.* Simplified method of the growth of human tumor infiltrating lymphocytes in gas-permeable flasks to numbers needed for patient treatment. **J Immunother**, 35, n. 3, p. 283-292, Apr 2012.

JONCKER, N. T.; MARLOIE, M. A.; CHERNYSHEVA, A.; LONCHAY, C. *et al.* Antigen-independent accumulation of activated effector/memory T lymphocytes into human and murine tumors. **Int J Cancer**, 118, n. 5, p. 1205-1214, Mar 1 2006.

JONES, R. G.; PLAS, D. R.; KUBEK, S.; BUZZAI, M. *et al.* AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. **Mol Cell**, 18, n. 3, p. 283-293, Apr 29 2005.

JONES, R. G.; THOMPSON, C. B. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. **Immunity**, 27, n. 2, p. 173-178, Aug 2007.

KALOS, M.; LEVINE, B. L.; PORTER, D. L.; KATZ, S. *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. **Sci Transl Med**, 3, n. 95, p. 95ra73, Aug 10 2011.

KAPLAN, D. H.; SHANKARAN, V.; DIGHE, A. S.; STOCKERT, E. *et al.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 13, p. 7556-7561, Jun 23 1998.

KAWAKAMI, Y.; ELIYAHU, S.; DELGADO, C. H.; ROBBINS, P. F. *et al.* Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91, n. 9, p. 3515-3519, Apr 26 1994.

KERSHAW, M. H.; WESTWOOD, J. A.; PARKER, L. L.; WANG, G. *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, 12, n. 20 Pt 1, p. 6106-6115, Oct 15 2006.

KISHTON, R. J.; SUKUMAR, M.; RESTIFO, N. P. Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. **Cell Metab**, 26, n. 1, p. 94-109, Jul 5 2017.

KLEBANOFF, C. A.; GATTINONI, L.; RESTIFO, N. P. Sorting through subsets: which T- cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? **J Immunother**, 35, n. 9, p. 651-660, Nov-Dec 2012.

KLEBANOFF, C. A.; GATTINONI, L.; TORABI-PARIZI, P.; KERSTANN, K. *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 27, p. 9571-9576, Jul 5 2005.

KOCHENDERFER, J. N.; DUDLEY, M. E.; FELDMAN, S. A.; WILSON, W. H. *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. **Blood**, 119, n. 12, p. 2709- 2720, Mar 22 2012.

KOCHENDERFER, J. N.; FELDMAN, S. A.; ZHAO, Y.; XU, H. *et al.* Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. **J Immunother**, 32, n. 7, p. 689-702, Sep 2009.

KOEBEL, C. M.; VERMI, W.; SWANN, J. B.; ZERAFA, N. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. **Nature**, 450, n. 7171, p. 903-907, Dec 6 2007.

KUTNER, R. H.; ZHANG, X. Y.; REISER, J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. **Nat Protoc**, 4, n. 4, p. 495-505, 2009.

LALONDE, A.; AVILA-CARINO, J.; CARUSO, M.; DE CAMPOS-LIMA, P. O. Rescue of the immunotherapeutic potential of a novel T cell epitope in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. **Virology**, 361, n. 2, p. 253-262, May 10 2007.

LAW, C. L.; GORDON, K. A.; TOKI, B. E.; YAMANE, A. K. *et al.* Lymphocyte activation antigen CD70 expressed by renal cell carcinoma is a potential therapeutic target for anti-CD70 antibody-drug conjugates. **Cancer Res**, 66, n. 4, p. 2328-2337, Feb 15 2006.

LEE, D. W.; BARRETT, D. M.; MACKALL, C.; ORENTAS, R. *et al.* The future is now: chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer. **Clin Cancer Res**, 18, n. 10, p. 2780-2790, May 15 2012.

LEUNG, W.; CAMPANA, D.; YANG, J.; PEI, D. *et al.* High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. **Blood**, 118, n. 2, p. 223-230, Jul 14 2011.

LO NIGRO, L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, 35, n. 4, p. 245-252, May 2013.

LOCATELLI, F.; MORETTA, F.; RUTELLA, S. Management of relapsed acute lymphoblastic leukemia in childhood with conventional and innovative approaches. **Curr Opin Oncol**, 25, n. 6, p. 707-715, Nov 2013.

LOCATELLI, F.; SCHRAPPE, M.; BERNARDO, M. E.; RUTELLA, S. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 120, n. 14, p. 2807-2816, Oct 4 2012.

LOH, M. L.; MULLIGHAN, C. G. Advances in the genetics of high-risk childhood B- progenitor acute lymphoblastic leukemia and juvenile myelomonocytic leukemia: implications for therapy. **Clin Cancer Res**, 18, n. 10, p. 2754-2767, May 15 2012.

LU, B.; FINN, O. J. T-cell death and cancer immune tolerance. **Cell Death Differ**, 15, n. 1, p. 70-79, Jan 2008.

MACIVER, N. J.; MICHALEK, R. D.; RATHMELL, J. C. Metabolic regulation of T lymphocytes. **Annu Rev Immunol**, 31, p. 259-283, 2013.

MAGNANI, C. F.; TETTAMANTI, S.; MALTESE, F.; TURAZZI, N. *et al.* Advanced targeted, cell and gene-therapy approaches for pediatric hematological malignancies: results and future perspectives. **Front Oncol**, 3, p. 106, 2013.

MAHER, J.; BRENTJENS, R. J.; GUNSET, G.; RIVIERE, I. *et al.* Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. **Nat Biotechnol**, 20, n. 1, p. 70-75, Jan 2002.

MAHNKE, Y. D.; BRODIE, T. M.; SALLUSTO, F.; ROEDERER, M. *et al.* The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. **Eur J Immunol**, 43, n. 11, p. 2797-2809, Nov 2013.

MAJ, T.; WEI, S.; WELLING, T.; ZOU, W. T cells and costimulation in cancer. **Cancer J**, 19, n. 6, p. 473-482, Nov-Dec 2013.

MARELLI-BERG, F. M.; FU, H.; MAURO, C. Molecular mechanisms of metabolic reprogramming in proliferating cells: implications for T-cell-mediated immunity. **Immunology**, 136, n. 4, p. 363-369, Aug 2012.

MARKS, D. I.; WANG, T.; PEREZ, W. S.; ANTIN, J. H. *et al.* The outcome of full-intensity and reduced-intensity conditioning matched sibling or unrelated donor transplantation in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first and second complete remission. **Blood**, 116, n. 3, p. 366-374, Jul 22 2010.

MATSUSHITA, H.; VESELY, M. D.; KOBOLDT, D. C.; RICKERT, C. G. *et al.* Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. **Nature**, 482, n. 7385, p. 400-404, Feb 8 2012.

MAUDE, S. L.; FREY, N.; SHAW, P. A.; APLENC, R. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. **N Engl J Med**, 371, n. 16, p. 1507-1517, Oct 16 2014.

MICHALEK, R. D.; GERRIETS, V. A.; JACOBS, S. R.; MACINTYRE, A. N. *et al.* Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. **J Immunol**, 186, n. 6, p. 3299-3303, Mar 15 2011.

MICHALEK, R. D.; RATHMELL, J. C. The metabolic life and times of a T-cell. **Immunol Rev**, 236, p. 190-202, Jul 2010.

MILONE, M. C.; FISH, J. D.; CARPENITO, C.; CARROLL, R. G. *et al.* Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. **Mol Ther**, 17, n. 8, p. 1453-1464, Aug 2009.

MIYOSHI, H.; BLOMER, U.; TAKAHASHI, M.; GAGE, F. H. *et al.* Development of a self-inactivating lentivirus vector. **J Virol**, 72, n. 10, p. 8150-8157, Oct 1998.

NAITO, Y.; SAITO, K.; SHIIBA, K.; OHUCHI, A. *et al.* CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. **Cancer Res**, 58, n. 16, p. 3491-3494, Aug 15 1998.

NAKAYAMADA, S.; TAKAHASHI, H.; KANNO, Y.; O'SHEA, J. J. Helper T cell diversity and plasticity. **Curr Opin Immunol**, 24, n. 3, p. 297-302, Jun 2012.

NOVOSIADLY, R.; KALOS, M. High-content molecular profiling of T-cell therapy in oncology. **Mol Ther Oncolytics**, 3, p. 16009, 2016.

O'BRIEN, T. F.; GORENTLA, B. K.; XIE, D.; SRIVATSAN, S. *et al.* Regulation of T-cell survival and mitochondrial homeostasis by TSC1. **Eur J Immunol**, 41, n. 11, p. 3361-3370, Nov 2011.

O'SULLIVAN, D.; PEARCE, E. L. Targeting T cell metabolism for therapy. **Trends Immunol**, 36, n. 2, p. 71-80, Feb 2015.

ORLOWSKI, R. J.; PORTER, D. L.; FREY, N. V. The promise of chimeric antigen receptor T cells (CARTs) in leukaemia. **Br J Haematol**, 177, n. 1, p. 13-26, Apr 2017.

PALAZON, A.; ARAGONES, J.; MORALES-KASTRESANA, A.; DE LANDAZURI, M. O. *et al.* Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer. **Clin Cancer Res**, 18, n. 5, p. 1207-1213, Mar 1 2012.

PARISH, C. R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. **Immunol Cell Biol**, 77, n. 6, p. 499-508, Dec 1999.

PEARCE, E.L; POFFENBERG, M.C; CHANG, C e JONES, R.G. Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte function. **Science**. 342 (6155), 2013.

PESTA, D; GNAIGER, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. **Methods Mol. Biol**, 810, p. 25-58, 2012

PIERSMA, S. J.; JORDANOVA, E. S.; VAN POELGEEST, M. I.; KWAPPENBERG, K. M. *et al.* High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Res**, 67, n. 1, p. 354-361, Jan 1 2007.

PORTER, D. L.; LEVINE, B. L.; KALOS, M.; BAGG, A. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. **N Engl J Med**, 365, n. 8, p. 725-733, Aug 25 2011.

PUA, H. H.; HE, Y. W. Mitophagy in the little lymphocytes: an essential role for autophagy in mitochondrial clearance in T lymphocytes. **Autophagy**, 5, n. 5, p. 745-746, Jul 2009.

PUI, C. H.; CARROLL, W. L.; MESHINCHI, S.; ARCECI, R. J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **J Clin Oncol**, 29, n. 5, p. 551-565, Feb 10 2011.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, 371, n. 9617, p. 1030-1043, Mar 22 2008.

PULE, M.; FINNEY, H.; LAWSON, A. Artificial T-cell receptors. **Cytotherapy**, 5, n. 3, p. 211-226, 2003.

PULE, M. A.; STRAATHOF, K. C.; DOTTI, G.; HESLOP, H. E. *et al.* A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. **Mol Ther**, 12, n. 5, p. 933-941, Nov 2005.

RAMEZANI, A.; HAWLEY, R. G. Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. **Curr Protoc Mol Biol**, Chapter 16, p. Unit 16 21, Nov 2002.

RAMOS, C. A.; DOTTI, G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. **Expert Opin Biol Ther**, 11, n. 7, p. 855-873, Jul 2011.

RAMSEY, L. B.; BRUUN, G. H.; YANG, W.; TREVINO, L. R. *et al.* Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. **Genome Res**, 22, n. 1, p. 1-8, Jan 2012.

RATHMELL, J. C.; ELSTROM, R. L.; CINALLI, R. M.; THOMPSON, C. B. Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma. **Eur J Immunol**, 33, n. 8, p. 2223-2232, Aug 2003.

REICHERT, J. M.; VALGE-ARCHER, V. E. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, 6, n. 5, p. 349-356, May 2007.

REN, X.; MA, W.; LU, H.; YUAN, L. *et al.* Modification of cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors (CARs) enhances antitumor immunity to epidermal growth factor receptor (EGFR)-positive malignancies. **Cancer Immunol Immunother**, 64, n. 12, p. 1517-1529, Dec 2015.

RIBAS, A.; WOLCHOK, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. **Science**, 359, n. 6382, p. 1350-1355, Mar 23 2018.

ROMAN, E.; BERAL, V. Possible aetiological factors in childhood leukaemia. **Arch Dis Child**, 66, n. 2, p. 179-180, Feb 1991.

ROSENBERG, S. A.; PACKARD, B. S.; AEBERSOLD, P. M.; SOLOMON, D. *et al.* Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. **N Engl J Med**, 319, n. 25, p. 1676-1680, Dec 22 1988.

RUPPERT, S. M.; LI, W.; ZHANG, G.; CARLSON, A. L. *et al.* The major isoforms of Bim contribute to distinct biological activities that govern the processes of autophagy and apoptosis in interleukin-7 dependent lymphocytes. **Biochim Biophys Acta**, 1823, n. 10, p. 1877-1893, Oct 2012.

SATO, E.; OLSON, S. H.; AHN, J.; BUNDY, B. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 51, p. 18538-18543, Dec 20 2005.

SCHEUERMANN, R. H.; RACILA, E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. **Leuk Lymphoma**, 18, n. 5-6, p. 385-397, Aug 1995.

SCHURICH, A.; MAGALHAES, I.; MATTSSON, J. Metabolic regulation of CAR T cell function by the hypoxic microenvironment in solid tumors. **Immunotherapy**, 11, n. 4, p. 335-345, Mar 2019.

SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A. T.; WHITE, J. M. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, 410, n. 6832, p. 1107-1111, Apr 26 2001.

SHEN, Z.; YAN, H.; ZHANG, Y.; MERNAUGH, R. L. *et al.* Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. **Anal Chem**, 80, n. 6, p. 1910-1917, Mar 15 2008.

SISKA, P. J.; RATHMELL, J. C. T cell metabolic fitness in antitumor immunity. **Trends Immunol**, 36, n. 4, p. 257-264, Apr 2015.

SISKA, P. J.; VAN DER WINDT, G. J.; KISHTON, R. J.; COHEN, S. *et al.* Suppression of Glut1 and Glucose Metabolism by Decreased Akt/mTORC1 Signaling Drives T Cell Impairment in B Cell Leukemia. **J Immunol**, 197, n. 6, p. 2532-2540, Sep 15 2016.

SMITH-GARVIN, J. E.; KORETZKY, G. A.; JORDAN, M. S. T cell activation. **Annu Rev Immunol**, 27, p. 591-619, 2009.

SMITH, F. O.; DOWNEY, S. G.; KLAPPER, J. A.; YANG, J. C. *et al.* Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. **Clin Cancer Res**, 14, n. 17, p. 5610-5618, Sep 1 2008.

STANULLA, M.; SCHRAPPE, M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Semin Hematol**, 46, n. 1, p. 52-63, Jan 2009.

SUKUMAR, M.; KISHTON, R. J.; RESTIFO, N. P. Metabolic reprogramming of anti-tumor immunity. **Curr Opin Immunol**, 46, p. 14-22, Jun 2017.

SWIFT, S.; LORENS, J.; ACHACOSO, P.; NOLAN, G. P. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. **Curr Protoc Immunol**, Chapter 10, p. Unit 10 17C, May 2001.

TANG, Y.; GARSON, K.; LI, L.; VANDERHYDEN, B. C. Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine-mediated transfection. **Oncol Lett**, 9, n. 1, p. 55-62, Jan 2015.

TEICHER, B. A.; CHARI, R. V. Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. **Clin Cancer Res**, 17, n. 20, p. 6389-6397, Oct 15 2011.

TSCHUMI, B.O; DUMAUTHIOZ, N; MARTI, B; ZHANG, L; SHNEIDER, P, et al. CART cells are prone to Fas- and DR5-mediated cell death. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, 6, n.71, 2018.

TOMULEASA, C.; FUJI, S.; BERCE, C.; ONACIU, A. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T-Cells for the Treatment of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Front Immunol**, 9, p. 239, 2018.

TOWER, R. L.; SPECTOR, L. G. The epidemiology of childhood leukemia with a focus on birth weight and diet. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 44, n. 3, p. 203-242, 2007.

URESHINOA, H; SHINDOA, T; KIMURA, S. Role of cancer immunology in chronic myelogenous leucemia. **Leukemia Research**, 88, Jan 2020.

VAN BRUGGEN, J.A.C; MARTENS, A.W.J; FRAIETTA, J.A; HOFLAND, T. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells impair mitochondrial fitness in CD8+ T cells and impede CAR T-cell efficacy. *Blood*, 134, n.1, Jul 2019.

VAN DER MERWE, P. A.; DUSHEK, O. Mechanisms for T cell receptor triggering. **Nat Rev Immunol**, 11, n. 1, p. 47-55, Jan 2011.

VAN DER WINDT, G.J.W; EVERTS, B; CHANG, C; CURTIS, J. D. *et al.* Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8+ T Cell Memory Development. **Immunity**, 36, p. 68–78, Jan 2012.

VAN STIPDONK, M. J.; HARDENBERG, G.; BIJKER, M. S.; LEMMENS, E. E. *et al.* Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. **Nat Immunol**, 4, n. 4, p. 361-365, Apr 2003.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, 324, n. 5930, p. 1029-1033, May 22 2009.

VEDI, A.; ZIEGLER, D. S. Antibody therapy for pediatric leukemia. **Front Oncol**, 4, p. 82, 2014.

WAICKMAN, A. T.; POWELL, J. D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. **Immunol Rev**, 249, n. 1, p. 43-58, Sep 2012.

WANG, M; ZHANG, C; SONG, Y; WANG, Z; WANG, Y; LUO, F; XU, Y. *et al.* Mechanism of immune evasion in breast cancer. **OncoTargets and Therapy**, 10, 2017.

WANG, R.; DILLON, C. P.; SHI, L. Z.; MILASTA, S. *et al.* The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. **Immunity**, 35, n. 6, p. 871-882, Dec 23 2011.

WATANABE, S.; TEMIN, H. M. Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 79, n. 19, p. 5986-5990, Oct 1982.

WAYNE, A. S.; CAPITINI, C. M.; MACKALL, C. L. Immunotherapy of childhood cancer: from biologic understanding to clinical application. **Curr Opin Pediatr**, 22, n. 1, p. 2-11, Feb 2010.

WHERRY, E.J; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nat. Rev. Immunol**, 15, n.8, p. 486-499, 2015.

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. **Chem Biol Interact**, 196, n. 3, p. 59-67, Apr 5 2012.

WISE, D. R.; DEBERARDINIS, R. J.; MANCUSO, A.; SAYED, N. *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 48, p. 18782-18787, Dec 2 2008.

WOFFORD, J. A.; WIEMAN, H. L.; JACOBS, S. R.; ZHAO, Y. *et al.* IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. **Blood**, 111, n. 4, p. 2101-2111, Feb 15 2008.

WYATT, K. D.; BRAM, R. J. Immunotherapy in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Hum Immunol**, 80, n. 6, p. 400-408, Jun 2019.

YANG, S.; SHI, H.; CHU, X.; ZHOU, X. *et al.* A rapid and efficient polyethylenimine-based transfection method to prepare lentiviral or retroviral vectors: useful for making iPS cells and transduction of primary cells. **Biotechnol Lett**, 38, n. 9, p. 1631-1641, Sep 2016.

ZENNOU, V.; PETIT, C.; GUETARD, D.; NERHBASS, U. *et al.* HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. **Cell**, 101, n. 2, p. 173-185, Apr 14 2000.

ZHANG, C.; LIU, J.; ZHONG, J. F.; ZHANG, X. Engineering CAR-T cells. **Biomark Res**, 5, p. 22, 2017.

ZHANG, T.; ZHANG, Z.; LI, F.; PING, Y. *et al.* miR-143 Regulates Memory T Cell Differentiation by Reprogramming T Cell Metabolism. **J Immunol**, 201, n. 7, p. 2165-2175, Oct 1 2018.

ZHAO, Y.; ALTMAN, B. J.; COLOFF, J. L.; HERMAN, C. E. *et al.* Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. **Mol Cell Biol**, 27, n. 12, p. 4328-4339, Jun 2007.

ZHONG, X. S.; MATSUSHITA, M.; PLOTKIN, J.; RIVIERE, I. *et al.* Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. **Mol Ther**, 18, n. 2, p. 413-420, Feb 2010.

8. Anexo

8.1 Anexo I: Termo de Sigilo



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

TERMO DE SIGILO REFERENTE

ÀS INFORMAÇÕES CONSTANTES EM DEFESA DE TESES E DISSERTAÇÕES

Título da Tese de Doutorado: ENGENHARIA DE LINFÓCITOS T PARA O RECONHECIMENTO DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

Aluno: Carolina Dias Carlos

Data: 29/01/2020

Orientador: Pedro O. de Campos Lima, Centro Infantil Boldrini

1. São tidas como “**Informações Confidenciais**” todas as informações relacionadas à tese de doutorado da **Sra. Carolina Dias Carlos**, cujo o título é “Doutora em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia”, defendida no dia **29** de janeiro de 2020 às **13:30** horas na sala Sala de Defesa de Tese 1º andar do prédio da pós-graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas expressas por qualquer meio seja oral, escrito ou eletrônico, constantes em documentos, planilhas, sistemas, fotografias, relatórios, disquetes, disco laser, desenhos, modelos, dados, especificações, relatórios, compilações, programas de computador, pedidos de patentes e patentes, produtos e processos e outros, a que venham a ser apresentadas ou de alguma forma disponibilizadas aos examinadores e demais presentes.

2. Os membros da banca examinadora e os presentes manterão sigilo, em relação às “**Informações Confidenciais**” mesmo que estas não contenham nem sejam acompanhadas de qualquer tipo de advertência de sigilo, devendo tal condição ser sempre presumida.

3. Os membros da banca examinadora e os presentes têm ciência e anuência que as informações confidenciais serão protegidas pelos meios legais e asseguram desde já que estas “**Informações Confidenciais**” a que tiverem acesso, não serão mecanicamente copiadas ou de qualquer outra forma reproduzidas, bem como não serão divulgadas, publicadas nem serão circuladas.

4. O descumprimento dos itens ou condições previstas neste Termo sujeitará o signatário que incorrer na infração ao presente, à responsabilidade criminal e ou civil e consequente indenização.

5. Os membros da banca examinadora, abaixo assinados, manifestam sua total ciência e anuência com as condições estabelecidas neste termo.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

TERMO DE SIGILO REFERENTE

ÀS INFORMAÇÕES CONSTANTES EM DEFESA DE TESES E DISSERTAÇÕES

Prof. Sang Won
Han Unifesp, São
Paulo RG:

Prof. Jane Zveiter de
Moraes Unifesp, São
Paulo RG:

Prof. Fabio Cesar
Gozzo Unicamp,
São Paulo RG:

Prof. José Andrés
Yunes
Centro Infantil
Boldrini
RG:

Aluno. Carolina Dias Carlos
Centro Infantil Boldrini/
Unicamp, Campinas.
RG: 2.313.854

Pedro Otavio de Campos
Lima Centro Infantil
Boldrini RG: 2.109.195

Os demais presentes assinam na tabela abaixo deste documento (nome completo, RG e assinatura).

[illegible]

8.2. Anexo II: Parecer da comissão interna de biossegurança (CIBio)

**CENTRO INFANTIL DE INVESTIGAÇÕES HEMATOLÓGICAS
DR. DOMINGOS A. BOLDRINI**

Rua Dr. Gabriel Porto, 1270 - Cidade Universitária II - Barão Geraldo - Campinas / SP - CEP 13083-210
Telefone 55 (19) 3787 5000 - Fax: 55 (19) 3289-3571 - www.boldrini.org.br

PARECER

Comissão Interna de Biossegurança (CIBio)

1. Identificação:

Projeto: **ENGENHARIA DE LINFÓCITOS T PARA O RECONHECIMENTO DA LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA**

(Doutorado em Biologia Funcional e Molecular, IB/UNICAMP)

Pesquisador responsável: Carolina Dias Carlos (orientador: Pedro O. de Campos Lima)

Centro Infantil Boldrini

2. Parecer da CIBio/Boldrini

A Comissão Interna de Biossegurança do Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr Domingos A. Boldrini, após análise conjunta realizada em reunião neste dia, resolve aprovar o projeto de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CIBio/Boldrini e não representam a opinião do Centro Infantil Boldrini nem o comprometem.

3. Informações complementares

Encaminhamos por e-mail cópia do "Cadernos de Biossegurança – Legislação", onde estão reunidos todos os textos legais referentes à Biossegurança no Brasil: Leis e Decretos Federais, Resoluções Ministeriais, além das Instruções Normativas da CTNBio", obtido da página do CTNBio.


4. Local e Data:

Campinas, 18 de março de 2015



José Andrés Yunes
Presidente da CIBio/Boldrini

De acordo,



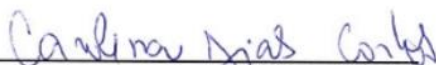
Prof. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez
Vice-Presidente CIBio
IB - UNICAMP

8.3. Anexo III: Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Engenharia de linfócitos T para o reconhecimento da leucemia linfóide aguda**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 18 de fevereiro de 2020

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Carolina Dias Carlos**

RG n.º 2.313.854

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Pedro Otavio de Campos Lima**

RG n.º 2.109.195