



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Campus de Araraquara**

**VICTOR GABRIEL SANTOS SILVA**

**BIOENGENHARIA DE MONÓCITOS MODIFICADOS COM CD19-CAR COM  
DOMÍNIOS COESTIMULATÓRIOS DE DECTINA-1 OU FcR PARA ATUAREM  
CONTRA CÉLULAS B NEOPLÁSICAS**

**Araraquara, SP**

**2026**

**VICTOR GABRIEL SANTOS SILVA**

**BIOENGENHARIA DE MONÓCITOS MODIFICADOS COM CD19-CAR COM  
DOMÍNIOS COESTIMULATÓRIOS DE DCECTINA-1 OU FcR PARA ATUAREM  
CONTRA CÉLULAS B NEOPLÁSICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Área de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Aparecido da Silva

**Araraquara, SP**

**2026**

S586b Silva, Victor Gabriel Santos

Bioengenharia de monócitos modificados com CD19-CAR com domínios coestimulatórios de Dectina-1 ou FcR para atuarem contra células B neoplásicas / Victor Gabriel Santos Silva. -- Araraquara, 2026

87 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara

Orientador: Thiago Aparecido da Silva

1. Terapia celular. 2. Monócitos. 3. Leucemia. 4. Linfoma. 5. Biotecnologia. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Bioengenharia de monócitos modificados com CD19-CAR com domínios coestimulatórios de Dectina-1 ou FcR para atuarem contra células B neoplásicas

AUTOR: VICTOR GABRIEL SANTOS SILVA

ORIENTADOR: THIAGO APARECIDO DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. THIAGO APARECIDO DA SILVA (Participação Presencial)

Departamento de Análises Clínicas / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Dr. LUCAS EDUARDO BOTELHO DE SOUZA (Participação Virtual)

Laboratório de Transferência Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto - FMRP/USP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS (Participação Presencial)

Departamento de Ciências Biológicas / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Araraquara, 31 de julho de 2026.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara  
RODOVIA ARARAQUARA-JAÚ, KM 1 - CP 502, 14800903

<http://www2.fcfar.unesp.br/#/pos-graduacao/biociencias-e-biotecnologias-aplicadas-a-farmacia/> - CNPJ: 48.031.918/0025-00.

A todas as pessoas de *favela*  
que, independente da forma,  
lutam pelo alcance de seus  
sonhos. A educação é o  
caminho.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus e a todas as forças regentes da Natureza, das Águas e do Mundo terreno, por pulsarem energia vital em mim e me permitirem estar aqui, presente. Agradeço à espiritualidade, que por muitas vezes me foi força e contribui para minha firmeza de chegar até aqui.

Venho de uma realidade distante do mundo acadêmico, e é uma honra ter tido o privilégio de poder estudar, o que não foi possível para muitos de meus familiares. Sou imensamente grato à minha mãe, Maria Célia, figura inspiradora de força e coragem, que diariamente arregaça as mangas e segue à luta, além de ser uma inspiração como pedagoga; todo o seu amor pela educação e cuidado com seus alunos são meus também. A educação é o caminho, mãe! Muito obrigado. Agradeço ao meu pai, Adaeldes, por também ser um símbolo de força e coragem, que precisou trabalhar muito cedo e não conseguiu concluir os estudos, mas que me ensina diariamente sobre a vida, que vai muito além da academia. Tenho gratidão à minha irmã, Brennda, por estarmos juntos e nos cuidarmos desde crianças, você é uma inspiração pra mim! Obrigado também por gerar meus sobrinhos, João e Bernardo, que me ajudam com a pura alegria de criança, e que luto para que sigam bem. Agradeço a minha avó, Maria, por cada grão de café colhido sob sol quente da Bahia para que suas filhas pudessem estudar, por ser força geradora de minha família, e por ser a pessoa com o maior coração que já vi até hoje. Cada prato de comida doado é fonte de propósito pra mim, vó! Que nunca desamparemos a quem mais necessita.

Por desavenças de uma vida de presságios, agradeço de todo meu coração aos meus avôs e avó (Gilson, Manoel e Ivoneide) que não estão mais presentes nesse plano carnal, mas que são luz em minha caminhada. Muito obrigado por terem sido pessoas de bom coração, e que me relembram que o mundo vai além do entendimento e do ego humano. Agradeço a todos os meus familiares que de alguma forma, principalmente em palavras, me deram força para que eu chegasse até aqui.

Sou grato ao relacionamento que construímos, João Pedro, de companheirismo e parceria, de força, fé e coragem. Admiro a pessoa que você é, e faço questão de todos os dias te agradecer por caminhar junto comigo nesse mundo que por vezes parece cruel, mas que sempre possamos nos lembrar que ainda existe gente de bom coração aqui. Que nossos sonhos, por muitas vezes mútuos, se realizem e que a gente possa ainda ajudar muita gente.

Agradeço aos meus amigos (a família que escolhemos), por serem rede, por estarmos juntos, por me escutarem e por permitir que eu também esteja com vocês, podendo acompanhar as pessoas incríveis que vocês são. Desejo que vocês tenham condições de ser quem são para realizarem os sonhos e propósitos de vocês. Muito obrigado a família que fiz em Uberaba: Ana Beatriz, Bianca, Hivie, Júlia, Yasmin, Jaqueline, Giovana e Isadora. Agradeço aos meus amigos de São Paulo, Isabella, Ana Júlia e Danielle; e da Bahia, Isadora, Duílio e Mário. Também sou grato às amigas que fiz durante o Mestrado, Janaína e Isabele.

Agradeço ao Laboratório de Hematologia e Hemoterapia da UFTM, pois foi o lugar onde descobri a minha paixão para/com a pesquisa, a educação e a arte cuidadosa de investigar tratamentos antineoplásicos. Muito obrigado em especial à Profa. Fernanda, pessoa de luz imensa, guardo e guardarei as palavras da senhora em meu coração. Também agradeço à Anna, Sarah e Andrezza, que além de ensinarem sobre pesquisa, também demonstraram que é possível estar presente pelo outro, principalmente em momentos difíceis.

Sou grato ao Laboratório de Hematologia Clínica da FCFAr/UNESP, pois além de aprender muito nesse lugar (sobre a vida e sobre a bancada), tive a oportunidade de trabalhar com o que um dia foi um sonho: a Terapia Celular. Acredito que a modificação genética de uma célula, fazendo com que seu potencial terapêutico seja redirecionado de forma alvo-específica é uma revolução no tratamento de neoplasias, que pode ajudar muitas pessoas que por vezes não têm a chance de serem curadas – por isso, também agradeço a cada pessoa que investiga estratégias terapêuticas que tentam superar os tratamentos convencionais e que sejam possíveis de implementar em sistemas públicos de saúde, em especial a Terapia Celular e a Fitoterapia. Agradeço pela oportunidade e pelo aprendizado, em especial ao Prof. Thiago, por toda orientação durante os dois anos de Mestrado.

Por fim, agradeço à vida, a estar aqui presente, a ter a chance de tentar. Ainda tenho muito a aprender e sou grato à pesquisa básica, que vejo como trabalho de formiga: de pouco em pouco chegamos ao montante. Obrigado aos órgãos de fomento em pesquisa, em especial à FAPESP, pois sem a bolsa eu não teria condições de realizar o Mestrado, e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, por ser a casa aonde me tornei Mestre. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Leucemias e linfomas são as neoplasias hematológicas de elevado impacto em saúde pública. O CD19 é amplamente explorado como alvo terapêutico em imunoterapias celulares baseadas em receptores quiméricos de antígeno (CAR). Embora as terapias com células CAR-T tenham demonstrado elevada eficácia clínica, limitações relacionadas à atual necessidade de terapia autóloga e efeitos adversos impulsionam a investigação de estratégias alternativas, incluindo o uso de monócitos/macrófagos geneticamente modificados para expressar CAR. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer plataformas celulares pré-clínicas para a avaliação funcional de monócitos CD19-CAR contendo Dectina-1 ou FcR como moléculas coestimulatórias frente a células B neoplásicas CD19+. Inicialmente, foram geradas linhagens de células B neoplásicas expressando luciferase ou EGFP, utilizadas como plataformas para análise de citotoxicidade, fagocitose e interação célula-célula. Paralelamente, foram clonadas e validadas diferentes variantes de CD19-CAR contendo combinações distintas de regiões hinge, transmembrana e domínios intracelulares derivados de receptores mieloides, como Dectina-1 e FcR. A geração e purificação de populações estáveis de células CD19-THP-1-CAR, que apresentaram taxas distintas de expressão do CAR na superfície celular. Seguidamente, realizou-se a padronização de uma plataforma funcional baseada em luciferase utilizando células CD19-8-137ζ-THP-1-CAR, e as variantes CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR promoveram redução da bioluminescência de células Nalm-6-Luc e Daudi-Luc em comparação às células THP-1 não modificadas, efeito mais pronunciado em 6h de co-cultivo, com mantimento em 24h frente a células Nalm-6-Luc. Os resultados evidenciam o potencial de domínios de sinalização mieloides para a funcionalidade de células THP-1-CAR e demonstram que a composição estrutural do CAR, inclusive das regiões hinge e transmembrana, influencia diretamente sua eficiência de expressão. Em conjunto, este trabalho estabelece uma base experimental sólida para a investigação funcional de monócitos/macrófagos CD19-CAR e contribui para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de imunoterapia celular direcionadas às neoplasias de células B.

**Palavras-chave:** receptor antigênico quimérico (CAR); CD19; monócitos modificados; Dectina-1; FcR; neoplasias de células B.

## ABSTRACT

Leukemias and lymphomas are hematological malignancies that impose a substantial public health burden. CD19 has been extensively explored as a therapeutic target in chimeric antigen receptor (CAR)-based cellular immunotherapies. Although CAR-T cell therapies have demonstrated remarkable clinical efficacy, limitations associated with the current reliance on autologous cell manufacturing and treatment-related toxicities have driven the development of alternative strategies, including the use of genetically engineered monocytes/macrophages expressing CARs. Within this context, the present study aimed to establish preclinical cellular platforms for the functional evaluation of CD19-CAR monocytes incorporating Dectin-1 or Fc receptors (FcR) as costimulatory signaling domains against B-cell malignancies. Initially, B-cell malignant cell lines stably expressing luciferase or EGFP were generated as experimental platforms for cytotoxicity, phagocytosis, and cell–cell interaction assays. In parallel, distinct CD19-CAR variants comprising different combinations of hinge, transmembrane, and intracellular signaling domains derived from myeloid receptors, including Dectin-1 and Fc receptors (FcRs), were cloned and validated. Stable CD19-CAR-expressing THP-1 cell populations were successfully generated and purified, exhibiting distinct levels of CAR surface expression. Subsequently, a luciferase-based functional platform was established using CD19-8-137 $\zeta$ -CAR THP-1 cells. Within this platform, CD19-Dectin-1-CAR and CD19-8-Fc $\gamma$ RI-CAR THP-1 cells reduced the bioluminescence of Nalm-6-Luc and Daudi-Luc cells compared with unmodified THP-1 cells. This effect was more pronounced after 6 h of co-culture and was maintained after 24 h against Nalm-6-Luc cells. These findings highlight the potential of myeloid-derived signaling domains to enhance the functional activity of CAR-engineered THP-1 cells and demonstrate that the structural composition of the CAR, particularly the hinge and transmembrane regions, directly influences CAR surface expression. Collectively, this study establishes a robust experimental platform for the functional investigation of CD19-CAR monocytes/macrophages and contributes to the development of innovative cellular immunotherapy strategies targeting B-cell malignancies.

**Keywords:** chimeric antigen receptor (CAR); CD19; bioengineered monocytes; Dectin-1; Fc receptor (FcR); B-cell malignancies.

## LISTA DE SIGLAS

**ADCC** – Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity  
**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
**BCR** – B Cell Receptor  
**BSA** – Bovine Serum Albumin  
**bp** – base pairs  
**CAR** – Chimeric Antigen Receptor  
**CAR-M** – Chimeric Antigen Receptor Macrophages  
**CAR-T** – Chimeric Antigen Receptor T cell  
**CD** – Cluster of Differentiation  
**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono  
**DAMPs** – Damage-Associated Molecular Patterns  
**DC** – Célula dendrítica (Dendritic Cell)  
**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DMSO** – Dimetilsulfóxido  
**DNA** – Deoxyribonucleic Acid  
**EGFP** – Enhanced Green Fluorescent Protein  
**Fab** – Fragment antigen-binding  
**FBS** – Fetal Bovine Serum  
**FcγRI** – Fc gamma receptor I (FcγRI)  
**FcεRγI** – Fc epsilon receptor gamma I (FcεRγI)  
**FITC** – Fluorescein Isothiocyanate  
**GFP** – Green Fluorescent Protein  
**HIF-1α** – Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha  
**IFN-γ** – Interferon gamma  
**IL** – Interleukin (interleucina)  
**Luc** – Luciferase  
**LNH** – Linfoma Não Hodgkin  
**MHC** – Major Histocompatibility Complex  
**NK** – Natural Killer  
**PBS** – Phosphate Buffered Saline  
**PCR** – Polymerase Chain Reaction  
**RPMI** – Roswell Park Memorial Institute Medium

**scFv** – Single-chain variable fragment

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**SUS** – Sistema Único de Saúde

**TME** – Tumor Microenvironment

**TNF- $\alpha$**  – Tumor Necrosis Factor alpha

**VSV-G** – Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein

**z** – Zeta chain (CD3 $\zeta$ )

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Maturação de células B e expressão de marcadores.....                                                                                                                    | 17 |
| <b>Figura 2.</b> Evolução estrutural das cinco gerações de receptores antigênicos quiméricos (CARs) em células T.....                                                                     | 24 |
| <b>Figura 3.</b> Mecanismos de ação de macrófagos CAR no microambiente tumoral.....                                                                                                       | 29 |
| <b>Figura 4.</b> Fluxograma para validar os plasmídeos utilizados na produção de partículas lentivirais carreando as sequências codificadoras para a expressão de luciferase ou EGFP..... | 37 |
| <b>Figura 5.</b> Representação esquemática do ensaio funcional baseado em luciferase para avaliação da atividade antitumoral de células CD19-THP-1-CAR.....                               | 43 |
| <b>Figura 6.</b> Modificação e seleção de células B neoplásicas para expressar luciferase, e padronização das condições de cultivo para o ensaio de citotoxicidade.....                   | 45 |
| <b>Figura 7.</b> Técnica de <i>Cell Sorting</i> para a seleção de células Nalm-6 e Daudi modificadas para a expressão de EGFP.....                                                        | 47 |
| <b>Figura 8.</b> Microscopia de fluorescência de células Nalm-6-EGFP ou Daudi-EGFP.....                                                                                                   | 47 |
| <b>Figura 9.</b> Construção dos vetores lentivirais para a expressão dos construtos CD19-CAR a partir de fragmentos clonados.....                                                         | 49 |
| <b>Figura 10.</b> Avaliação da modificação de células THP-1 para a expressão de EGFP ou variantes de CD19-CAR construídas a partir de fragmentos clonados.....                            | 51 |
| <b>Figura 11.</b> Avaliação da expressão de CD19-8-137z-CAR ou CD19-FcγRI-CAR na superfície celular de Jurkat modificadas.....                                                            | 52 |
| <b>Figura 12.</b> Marcação intracelular de células THP-1 modificadas para a expressão de CD19-FcγRI-CAR construído a partir de fragmentos clonados ou CD19-8-137z-CAR.....                | 53 |
| <b>Figura 13.</b> Representação esquemática da composição dos domínios das variantes de CD19-CAR construídos a partir de fragmentos sintetizados.....                                     | 54 |
| <b>Figura 14.</b> Validação dos plasmídeos contendo a sequência codificadora das variantes de CD19-CAR construídos a partir de fragmentos sintetizados.....                               | 54 |
| <b>Figura 15.</b> Microscopia de fluorescência de células HEK-293T CD19-Dectin-1-CAR e CD19-8-FcγRI-CAR.....                                                                              | 55 |
| <b>Figura 16.</b> Titulação dos sobrenadantes concentrados de partículas lentivirais dos construtos CD19-CAR em células Jurkat.....                                                       | 56 |

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 17.</b> Geração de células THP-1 modificadas para expressão das variantes de CD19-CAR contendo modificações nos domínios hinge e transmembrana..... | 59 |
| <b>Figura 18.</b> Detecção de variantes de CD19-CAR na superfície de células THP-1 modificadas através do reconhecimento de Proteína L.....                   | 60 |
| <b>Figura 19.</b> Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-8-137z-THP-1-CAR contra células Nalm-6 Luc.....                                           | 62 |
| <b>Figura 20.</b> Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-8-137z-THP-1-CAR contra células Daudi Luc.....                                            | 63 |
| <b>Figura 21.</b> Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcyRI-THP-1-CAR frente a células Nalm-6 Luc.....              | 64 |
| <b>Figura 22.</b> Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcyRI-THP-1-CAR frente a células Daudi Luc.....               | 65 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                                           | <b>16</b> |
| 1.1 Hematopoese, maturação de linfócitos B e CD19 como alvo para imunoterapias.....                                                                                                 | 16        |
| 1.2 Contexto clínico e biológico das neoplasias CD19+.....                                                                                                                          | 18        |
| 1.3 Imunologia tumoral e microambiente tumoral: bases para a geração de imunoterapias direcionadas.....                                                                             | 19        |
| 1.4 Terapia Celular com CAR expresso em células T contra neoplasias hematológicas: o início do desenvolvimento de novas imunoterapias.....                                          | 22        |
| 1.5 Utilização de monócitos e macrófagos modificados com CAR contra as neoplasias de células B.....                                                                                 | 25        |
| 1.6 Moléculas com potencial de ativação e polarização M1 de CD19-CAR-Macrófagos no contexto de neoplasias de células B.....                                                         | 30        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                                            | <b>34</b> |
| 2.1 Objetivo geral.....                                                                                                                                                             | 34        |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                                                                                                                                      | 34        |
| <b>3. METODOLOGIA.....</b>                                                                                                                                                          | <b>36</b> |
| 3.1 Produção de partículas lentivirais contendo a sequência codificadora de luciferase ou EGFP.....                                                                                 | 36        |
| 3.2 Modificação de células B neoplásicas com luciferase ou EGFP.....                                                                                                                | 37        |
| 3.3 Produção de partículas lentivirais contendo a sequência codificadora das variantes de CD19-CAR, modificação de células THP-1 para expressarem EGFP e variantes de CD19-CAR..... | 37        |
| 3.4 Marcação intracelular ou de superfície de CD19-CAR em células THP-1 modificadas.....                                                                                            | 39        |
| 3.5 Estratégias de regiões de análise por citometria de fluxo.....                                                                                                                  | 41        |
| 3.6 Utilização de plataforma luciferase expressa em linhagens de células B neoplásicas para avaliação da atividade funcional antitumoral de células CD19-THP-1-CAR.....             | 42        |
| 3.7 Dosagem de TNF- $\alpha$ no sobrenadante do co-cultivo de células CD19-THP-1-CAR frente a linhagens de células B neoplásicas.....                                               | 43        |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                                           | <b>45</b> |

|                                                                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1 Expressão de luciferase por linhagens de células B neoplásicas: plataforma de análise da citotoxicidade de células CD19-CAR.....                                        | 45        |
| 4.2 Modificação de linhagens de células B neoplásicas para a expressão de EGFP: uma plataforma para avaliar a atividade citotóxica e fagocítica de macrófagos CD19-CAR..... | 46        |
| 4.3 Construção dos vetores lentivirais contendo as sequências codificadoras das variantes de CD19-CAR.....                                                                  | 47        |
| 4.4 Geração de células THP-1 estáveis para expressarem as variantes de CD19-CAR a partir de fragmentos clonados.....                                                        | 49        |
| 4.5 Detecção intracelular de CD19-CAR em células THP-1 modificadas.....                                                                                                     | 52        |
| 4.6 Construção de variantes de CD19-CAR com novas modificações nos domínios hinge/transmembrana.....                                                                        | 53        |
| 4.7 Produção e titulação de partículas lentivirais carreando a sequência codificadora de variantes de CD19-CAR.....                                                         | 55        |
| 4.8 Geração de células THP-1 modificadas com variantes de CD19-CAR contendo modificações nos domínios hinge e transmembrana.....                                            | 57        |
| 4.9 Detecção de variantes de CD19-CAR na superfície de células THP-1 modificadas.....                                                                                       | 59        |
| 4.10 Avaliação do potencial antitumoral de células THP-1 expressando CD19-CAR contra linhagens de células B neoplásicas.....                                                | 61        |
| 4.11 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante do co-cultivo de células CD19-THP-1-CAR frente as linhagens de células B neoplásicas.....         | 65        |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                                                    | <b>67</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                                    | <b>81</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                     | <b>82</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Hematopoese, maturação de linfócitos B e CD19 como alvo para imunoterapias

A hematopoese é um processo altamente regulado responsável pela geração contínua das células sanguíneas a partir de células-tronco hematopoiéticas multipotentes localizadas na medula óssea. Essas células dão origem a progenitores mieloides e linfoides, sendo os progenitores linfoides comuns responsáveis pela geração de linfócitos B, T e células natural killer (NK) (Orr; Lanier, 2010; Wang *et al.*, 2020). A diferenciação dos linfócitos B ocorre predominantemente na medula óssea e envolve uma sequência ordenada de estágios definidos por rearranjos gênicos dos loci das imunoglobulinas e pela expressão diferencial de marcadores de superfície (Wang *et al.*, 2020).

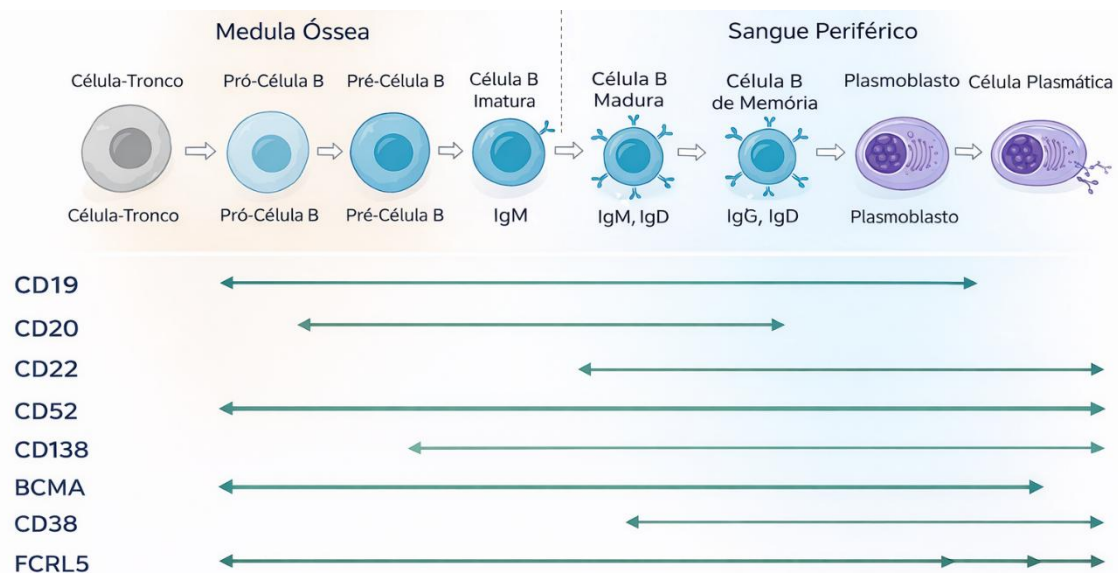
Durante os estágios iniciais de desenvolvimento, as células pró-B e pré-B passam por rearranjos dos genes das cadeias pesada e leve das imunoglobulinas, processo essencial para a geração da diversidade do repertório de anticorpos. À medida que amadurecem, essas células passam a expressar receptores de célula B funcionais (BCR) e migram para órgãos linfoides secundários, onde completam sua maturação e participam de respostas imunes adaptativas (Tussiwand *et al.*, 2009; Raza; Clarke, 2021). Alterações genéticas ou epigenéticas adquiridas ao longo desses estágios podem resultar em bloqueios de diferenciação, proliferação descontrolada e resistência à apoptose, favorecendo o surgimento de neoplasias de células B em diferentes pontos da ontogenia linfóide (Klein; Dalla-Favera 2008; Leval; Jaffe, 2020).

Nesse contexto, o antígeno CD19 destaca-se como um marcador central da linhagem B. O CD19 é uma glicoproteína transmembrana expressa de forma contínua desde os estágios iniciais de células pré-B até células B maduras, sendo ausente apenas em plasmócitos terminalmente diferenciados (Scheuermann; Racila, 1995; Sadelain *et al.*, 2019). Funcionalmente, o CD19 atua como um correceptor do BCR, amplificando sinais de ativação e desempenhando papel crítico na regulação da resposta imune mediada por células B (Depner; Crawford, 2020). A Figura 1 representa todas as células envolvidas na maturação de células B e os antígenos marcadores e suas expressões em cada estágio da maturação.

A expressão ampla e consistente do CD19 na maioria das neoplasias de células B, aliada à sua baixa ou ausente expressão em tecidos não hematopoiéticos, torna

esse antígeno particularmente atrativo para estratégias de imunoterapia direcionada (Neelapu *et al.*, 2017; Cordeiro *et al.*, 2019). Diferentemente de outros marcadores, o CD19 é raramente perdido durante os estágios iniciais da transformação maligna, o que contribui para sua estabilidade como alvo terapêutico (Orlando *et al.*, 2018). Essas características consolidaram o CD19 como um dos alvos mais bem-sucedidos para o desenvolvimento de imunoterapias celulares, incluindo anticorpos monoclonais e receptores antigênicos quiméricos, estabelecendo a base biológica para abordagens inovadoras no tratamento das neoplasias de células B (Sadelain *et al.*, 2013; Rafiq *et al.*, 2020).

**FIGURA 1 – Maturação de células B e expressão de marcadores**



**Legenda: Figura 1 - Maturação de células B e expressão de marcadores.** A maturação de linfócitos B se inicia com a célula-tronco se diferenciando em células pró-B, que se diferencia em células pré-B e por seguinte, em células B imaturas, na medula óssea. Quando migram para o sangue periférico, já em forma de células B maduras, podem se diferenciar em células B de memória, plasmoblasto e célula plasmática. A maturação de células B é marcada por expressão de antígeno marcadores de acordo com o nível de maturação da célula. A expressão de CD19 ocorre entre os estágios de célula pró-B a plasmoblasto, não ocorrendo em plasmócitos maduros. A imagem também representa a expressão de outros marcadores, como CD22 e BCMA, que se diferem nos estágios da maturação em que são expressos pelas células B.

Fonte: elaborado pelo autor – software BioRender.

## 1.2 Contexto clínico e biológico das neoplasias CD19+

As neoplasias hematológicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças malignas originadas a partir de células do sistema hematopoiético, representando importante causa de mortalidade em nível global (Jiang; Lin; Zhu, 2022). Dentre essas patologias, as neoplasias de células B constituem a maior fração,

sendo responsáveis por aproximadamente 80% dos linfomas não Hodgkin (LNH), além de uma parcela significativa das leucemias linfoides agudas e crônicas (Leval; Jaffe, 2020; Alaggio *et al.*, 2022).

Os linfócitos B desempenham papel central na imunidade adaptativa, atuando na produção de anticorpos, apresentação de antígenos e regulação da resposta imune por meio da secreção de citocinas (Tussiwand *et al.*, 2009; Raza; Clarke, 2021). Essas células derivam de progenitores hematopoiéticos na medula óssea e passam por um processo altamente regulado de diferenciação e maturação, caracterizado pela expressão sequencial de marcadores de superfície e rearranjos gênicos dos loci das imunoglobulinas (Wang *et al.*, 2020). Alterações genéticas e epigenéticas adquiridas ao longo desse processo podem comprometer os mecanismos de controle da proliferação e da apoptose, resultando no surgimento de clones malignos de células B (Klein; Dalla-Favera 2008; Burmeister *et al.*, 2010).

Do ponto de vista clínico e biológico, as neoplasias de células B podem apresentar formas altamente agressivas, como o linfoma de Burkitt e a leucemia linfoblástica aguda de células B (Dunleavy; Little; Wilson, 2016; Malard; Mohty, 2020). Do ponto de vista diagnóstico, a caracterização das neoplasias de células B baseia-se na integração de critérios clínicos, morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares. A imunofenotipagem por citometria de fluxo e imuno-histoquímica desempenha papel central na identificação da linhagem celular e do estágio de maturação da célula neoplásica, sendo a expressão de marcadores de superfície como CD19, CD20, CD22 e imunoglobulinas de membrana amplamente utilizada para o diagnóstico e a classificação dessas doenças (Leval; Jaffe, 2020; Alaggio *et al.*, 2022). Alterações genéticas recorrentes, como translocações envolvendo loci de imunoglobulinas e mutações em genes reguladores do ciclo celular e da resposta ao dano genômico, contribuem para a estratificação prognóstica e para a definição de estratégias terapêuticas (Klein; Dalla-Favera 2008; Burmeister *et al.*, 2010).

Leucemias e linfomas são as neoplasias hematológicas de elevado impacto em saúde pública. De acordo com a Estimativa 2026–2028 do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o Brasil deve registrar cerca de 781 mil novos casos de câncer por ano, dos quais aproximadamente 518 mil excluindo tumores de pele não melanoma são esperados anualmente, reafirmando a magnitude do câncer como um dos principais problemas de saúde pública no país e sua proximidade com as doenças cardiovasculares como causa de morte. Entre os tipos de neoplasias hematológicas,

linfomas não-Hodgkin e leucemias figuram entre as estimativas, com cerca de 25 mil novos casos por ano, demonstrando significativa contribuição das neoplasias de células B ao total de diagnósticos oncológicos. Além da incidência, os dados epidemiológicos mais recentes indicam que em 2023 ocorreram 4.860 óbitos por linfomas não-Hodgkin, refletindo sua carga em mortalidade, enquanto as leucemias foram responsáveis por mais de 5 mil óbitos no mesmo ano. Esses padrões — alta incidência e mortalidade associadas às neoplasias de células B — realçam sua importância clínica, social e o impacto sobre o sistema de saúde, reforçando a necessidade de abordagens terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas.

Apesar dos avanços no diagnóstico molecular e na estratificação prognóstica, o tratamento dessas doenças ainda enfrenta limitações importantes, especialmente relacionadas à toxicidade de quimioterápicos e radioterapia, à persistência da doença residual mínima e às altas taxas de recidiva em pacientes refratários (Marie 2001; Xu *et al.*, 2019). Além disso, a quimioterapia convencional exerce efeitos imunossupressores não seletivos, comprometendo a vigilância imunológica e favorecendo a seleção de clones tumorais resistentes (Sharma; Jasrotia; Kumar 2024; Alrehaili *et al.*, 2025). Paralelamente, o microambiente tumoral das neoplasias hematológicas apresenta mecanismos ativos de imunossupressão, incluindo secreção de citocinas inibitórias, expressão de ligantes de checkpoint imunológico e reprogramação funcional de células mieloides associadas ao tumor, contribuindo para a evasão da resposta imune antitumoral (Toghraie *et al.*, 2025; Walid *et al.*, 2026).

### **1.3 Imunologia tumoral e microambiente tumoral: bases para a geração de imunoterapias direcionadas**

O microambiente tumoral (TME, *Tumor Microenvironment*) é conhecido por ser altamente complexo e dinâmico, composto não apenas por células neoplásicas, mas também por células estromais, vasos sanguíneos, matriz extracelular e diversas populações de células do sistema imunológico (Schreiber; Old; Smyth, 2011). Nesse sentido, há um processo contínuo de interação entre o sistema imunológico, que está associado com mecanismos de reconhecimento e eliminação de células neoplásicas, e o microambiente tumoral, que possui estratégias de evasão imunológicas adquiridas ao longo do crescimento neoplásico (Hanahan *et al.*, 2022). Por isso, é de suma importância ter como base o entendimento da imunologia tumoral e do microambiente

tumoral, já que influenciam diretamente a progressão da doença e a resposta às terapias (Ayuso; Garrido, 2022).

Nas fases iniciais da transformação neoplásica, células tumorais podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico devido à expressão de neoantígenos derivados de mutações somáticas, proteínas expressas ou moléculas induzidas por estresse celular. Esse reconhecimento desencadeia uma resposta coordenada entre a imunidade inata e adaptativa, caracterizando o processo de imunovigilância tumoral (Mittal *et al.*, 2014). Nesse contexto, células Natural Killer (NK), macrófagos, células dendríticas e linfócitos T contribuem para a eliminação de células malignas por mecanismos citotóxicos diretos ou pela produção de mediadores inflamatórios. Entretanto, a pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico favorece a sobrevivência de variantes neoplásicas menos imunogênicas, culminando no desenvolvimento de mecanismos de escape e progressão tumoral (Dunn; Koebel; Schreiber, 2006; Vesely *et al.*, 2011).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> constituem um dos principais efetores da imunidade antitumoral, e a ativação dessas células depende da apresentação de peptídeos antigênicos por células apresentadoras de antígeno (APCs). No contexto tumoral, essa interação ocorre principalmente por meio da apresentação cruzada (*cross-presentation*), processo em que antígenos exógenos derivados de células tumorais são capturados e redirecionados via MHC classe I, possibilitando o reconhecimento por células T CD8<sup>+</sup> naive. Esse mecanismo possibilita o *cross-priming*, caracterizado pela ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> naive (via MHC-I) associado à interação entre moléculas coestimulatórias, como CD80/CD86 e CD28, e à ação de citocinas inflamatórias, incluindo IL-12, IL-15 e interferons tipo I. Como resultado, ocorre expansão clonal, diferenciação em células T citotóxicas efetoras e formação de células de memória, etapas essenciais para o estabelecimento de respostas antitumorais sustentadas (Joffre *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2013; Abbas; Lichtman; Pillai, 2022). Uma vez ativadas, as células T CD8<sup>+</sup> eliminam células tumorais principalmente por mecanismos dependentes da liberação de perforina e granzimas, induzindo apoptose das células-alvo, além de produzirem interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), citocina capaz de aumentar a expressão de moléculas de MHC-I em células tumorais, favorecendo seu reconhecimento imunológico e amplificando a resposta imune local por meio da ativação de macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno (Chen; Mellman, 2017; Mittal *et al.*, 2014).

Paralelamente, os macrófagos representam uma das populações celulares mais abundantes e funcionalmente relevantes do microambiente tumoral. Essas células podem originar-se tanto de macrófagos residentes quanto de monócitos recrutados do sangue periférico em resposta a quimiocinas produzidas pelo tumor, como CCL2, CCL5 e CXCL12, diferenciando-se em macrófagos associados ao tumor (TAMs, *Tumor-Associated Macrophages*) (Cortés *et al.*, 2017). Além da fagocitose de células tumorais, os macrófagos atuam como importantes sensores imunológicos, reconhecendo padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs) e a patógenos (PAMPs) por meio de receptores como *Toll-like Receptors* (TLRs), receptores Fc e receptores de lectina tipo C. A ativação desses receptores desencadeia vias de sinalização intracelular dependentes de NF- $\kappa$ B, MAPK, SYK e PI3K/Akt, culminando na produção de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e espécies reativas de oxigênio, além da indução de moléculas coestimulatórias e do complexo MHC (Murray, 2017). Dessa forma, os macrófagos estabelecem uma importante conexão entre a imunidade inata e adaptativa, participando do processamento e da apresentação de antígenos tumorais para linfócitos T CD4<sup>+</sup> e, em determinadas condições, contribuindo também para mecanismos de apresentação cruzada e ativação de respostas citotóxicas mediadas por células T CD8<sup>+</sup> (Nutt; Idoyaga, 2019).

Apesar da capacidade antitumoral intrínseca dessas populações celulares, o microambiente tumoral estabelece diversos mecanismos imunossupressores que comprometem sua funcionalidade. Fatores como hipóxia, acidose metabólica, escassez de nutrientes e elevadas concentrações de citocinas regulatórias, como TGF- $\beta$  e IL-10, favorecem a exaustão de linfócitos T, caracterizada pela expressão aumentada de receptores inibitórios como PD-1, TIM-3, LAG-3 e TIGIT, além de induzirem fenótipos imunossupressores em macrófagos associados à produção de VEGF, metaloproteinasas e mediadores que favorecem angiogênese, remodelamento tecidual e progressão tumoral (Denardo; Ruffell, 2019). Dessa forma, embora células T e macrófagos desempenhem funções centrais na imunidade antitumoral, sua atividade frequentemente é insuficiente para promover a eliminação completa das células neoplásicas. Essas limitações impulsionaram o desenvolvimento de estratégias de engenharia celular capazes de aumentar a especificidade, a ativação e a persistência funcional de células imunológicas, culminando no surgimento das

terapias baseadas em receptores antigênicos quiméricos (CAR, *Chimeric Antigen Receptors*).

#### **1.4 Terapia celular com CAR expresso em células T contra neoplasias hematológicas: o início do desenvolvimento de novas imunoterapias**

A terapia celular baseada em CAR constitui uma das mais relevantes inovações da imunoterapia, tendo sido primeiramente desenvolvida para o tratamento de neoplasias de células B refratárias às terapias convencionais (Sadelain *et al.*, 2013; Dotti *et al.*, 2014). Essa abordagem baseia-se na engenharia genética de células do sistema imune, principalmente linfócitos T, para expressar receptores sintéticos capazes de reconhecer antígenos tumorais de forma independente da apresentação por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), superando importantes mecanismos de evasão tumoral (Rafiq *et al.*, 2020).

Do ponto de vista estrutural, os CARs são compostos por quatro domínios principais: (I) domínio extracelular de reconhecimento antigênico; (II) região de dobradiça (hinge ou stalk); (III) domínio transmembrana; e (IV) domínio intracelular de transdução de sinal (Dotti *et al.*, 2014). O domínio extracelular é responsável pela especificidade do CAR e, na maioria dos construtos, é constituído por um fragmento variável de cadeia única (*single-chain variable fragment*, scFv) derivado de anticorpos monoclonais, permitindo o reconhecimento direto de antígenos de superfície com natureza proteica, lipídica ou polissacarídica (Sadelain *et al.*, 2013).

A região hinge conecta o scFv ao domínio transmembrana e exerce papel crítico na flexibilidade espacial do CAR, influenciando a acessibilidade ao antígeno, a formação da sinapse imune e a intensidade do sinal de ativação. O comprimento e a composição dessa região, frequentemente derivados de moléculas como IgG1, IgG4 ou CD8 $\alpha$ , impactam diretamente a eficácia funcional do receptor (Fujiwara *et al.*, 2020). O domínio transmembrana, por sua vez, é responsável pela ancoragem do CAR à membrana plasmática e pode derivar de proteínas como CD3 $\zeta$ , CD28 ou CD8 $\alpha$ , influenciando a estabilidade do receptor e sua associação com complexos de sinalização intracelular (Dotti *et al.*, 2014).

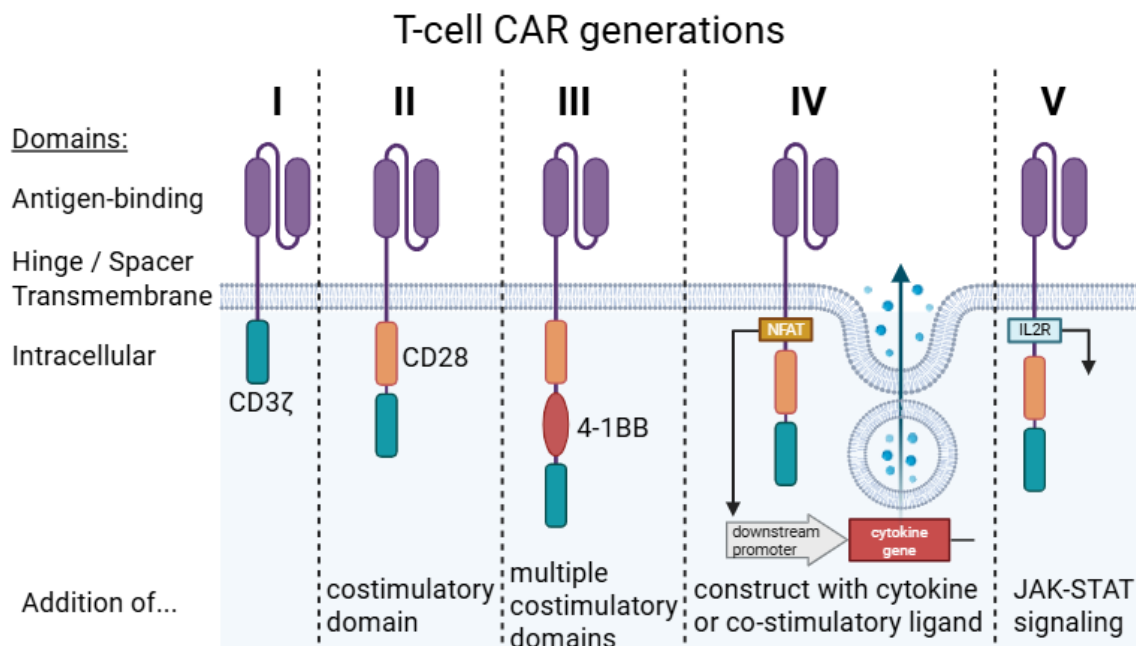
O domínio intracelular representa o componente funcional central do CAR, sendo responsável pela transdução do sinal após o reconhecimento do antígeno. O primeiro CAR desenvolvido, classificado como de primeira geração, continha exclusivamente o domínio CD3 $\zeta$ , responsável pelo sinal ativador primário das células

T. Entretanto, esses construtos apresentaram ativação transitória, baixa persistência *in vivo* e limitada eficácia clínica (Sadelain *et al.*, 2013). A compreensão de que as células T requerem, fisiologicamente, pelo menos dois sinais para ativação plena — um sinal primário mediado pelo complexo TCR-CD3 e um sinal coestimulatório, como aquele fornecido por CD28 ou 4-1BB — levou ao desenvolvimento dos CARs de segunda geração (Lee *et al.*, 2015).

Os CARs de segunda geração incorporam um domínio coestimulatório intracelular, geralmente CD28 ou 4-1BB, acoplado ao CD3 $\zeta$ , promovendo maior expansão, persistência, produção de citocinas e atividade citotóxica das células CAR-T. Essa arquitetura tornou-se o padrão adotado na prática clínica, sendo utilizada em todos os produtos comerciais atualmente aprovados (Sadelain *et al.*, 2019). Os CARs de terceira geração incorporam dois domínios coestimuladores simultaneamente, enquanto os CARs de quarta geração, também denominados TRUCKs (*T cells Redirected for Universal Cytokine Killing*), incluem elementos adicionais capazes de modular o microambiente tumoral, como a secreção induzível de citocinas pró-inflamatórias (Gacerez *et al.*, 2016).

Mais recentemente, os CARs de quinta geração foram desenvolvidos com o objetivo de integrar sinais de ativação, coestimulação e diferenciação celular de maneira mais fisiológica, incorporando domínios capazes de ativar vias como JAK/STAT após o reconhecimento antigênico, aproximando-se ainda mais da sinalização natural do receptor de célula T (Tokarew *et al.*, 2025). Essa evolução tecnológica reflete o esforço contínuo para otimizar a eficácia, a segurança e a durabilidade da resposta antitumoral mediada por CAR-T. A Figura 2 representa as cinco gerações em uso até Fevereiro de 2026.

**FIGURA 2 - Evolução estrutural das cinco gerações de receptores antigênicos quiméricos (CARs) em células T**



**Legenda: Figura 2 - Evolução estrutural das cinco gerações de receptores antígenicos quiméricos (CARs) em células T.** I) CAR de primeira geração, composto por um domínio extracelular de reconhecimento de antígeno (scFv), hinge, domínio transmembrana e um único domínio intracelular de sinalização derivado de CD3ζ, responsável pela ativação inicial da célula T. II) CAR de segunda geração, que incorpora um domínio coestimulatório (por exemplo, CD28) ao CD3ζ, promovendo maior ativação, expansão e persistência celular. III) CAR de terceira geração, contendo múltiplos domínios coestimuladores (como CD28 e 4-1BB), com o objetivo de potencializar a sinalização e a função efetora das células T. IV) CAR de quarta geração (*TRUCKs*), projetado para induzir a expressão controlada de citocinas ou ligantes coestimuladores após ativação do CAR, contribuindo para a modulação do microambiente tumoral. V) CAR de quinta geração, que associa a sinalização clássica do CD3ζ e coestimulação a domínios de receptores de citocinas (por exemplo, IL-2Rβ), ativando vias JAK-STAT e integrando a ativação antígeno à sinalização de citocinas.

Fonte: Software BioRender.

No contexto das neoplasias de células B, a terapia com CAR-T direcionada ao antígeno CD19 apresentou resultados clínicos de excelente sucesso terapêutico. Estudos clínicos demonstraram elevadas taxas de resposta completa em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células B e linfomas não Hodgkin agressivos, mesmo em cenários de doença refratária ou recidivada (Maude *et al.*, 2014; Neelapu *et al.*, 2017). Um ensaio clínico de fase II envolvendo pacientes com LLA-B, LNH e leucemia linfocítica crônica reportou taxas de resposta global de 82% e remissão completa de 54%, evidenciando o potencial terapêutico dessa abordagem em diferentes neoplasias de células B (Cordeiro *et al.*, 2019).

Até o ano de 2025, sete produtos CAR-T foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para aplicação clínica. Desses, cinco são direcionados ao CD19 para o tratamento de leucemias e linfomas de células B: tisagenlecleucel (Kymriah; Novartis), axicabtagene ciloleucel (Yescarta; Gilead), brexucabtagene autoleucel

(Tecartus; Gilead), lisocabtagene maraleucel (Breyanzi; Bristol Myers Squibb) e recentemente um sétimo produto CD19-CAR-T aprovado. Os outros dois produtos são direcionados ao antígeno BCMA para o tratamento de mieloma múltiplo: idecabtagene vicleucel (Abecma; Bristol Myers Squibb) e ciltacabtagene autoleucel (Carvykti; Janssen/Legend) (FDA, 2026; Mishra; Malonia 2023).

No Brasil, a terapia CAR-T também avançou de forma significativa. O primeiro tratamento com CAR-T em pacientes com linfoma não Hodgkin foi realizado em 2019, com relatos de remissão completa em casos refratários. Posteriormente, a criação do Núcleo de Terapia Avançada (Nutera), em Ribeirão Preto, consolidou o maior programa de terapia CAR da América Latina. Em 2023, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autorizou ensaios clínicos envolvendo pacientes com LLA-B refratária e LNH no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), marcando um avanço relevante na incorporação dessa tecnologia no cenário nacional (ANVISA, 2023; INCA, 2023).

Apesar de sua eficácia comprovada, a terapia com células CAR-T apresenta limitações importantes. A necessidade de produção autóloga, o tempo prolongado entre a coleta e a infusão das células, os custos elevados e a ocorrência de efeitos adversos graves, como a síndrome de liberação de citocinas e a neurotoxicidade associada à imunoterapia, representam desafios significativos para sua ampla aplicação clínica (Suck *et al.*, 2016; Alrehaili *et al.*, 2025). Essas limitações têm impulsionado o desenvolvimento de estratégias alternativas baseadas na aplicação da tecnologia CAR *off-the-shelf* (prontas para uso, terapias alogênicas) em outras populações celulares do sistema imune, como células natural killer, monócitos e macrófagos, com o objetivo de ampliar a segurança, a acessibilidade e o espectro terapêutico da imunoterapia celular (Toghraie *et al.*, 2025; Walid *et al.*, 2026).

### **1.5 Utilização de monócitos e macrófagos modificados com CAR contra as neoplasias de células B**

Os monócitos e macrófagos pertencem à linhagem mieloide e se originam a partir das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, por meio da diferenciação em progenitores mieloides comuns, culminando na geração de monócitos circulantes no sangue periférico (Gordon; Taylor, 2005; Geissmann *et al.*, 2010). Uma vez recrutados para os tecidos periféricos, esses monócitos sofrem diferenciação terminal em macrófagos sob a influência de sinais locais, incluindo citocinas, fatores de

crescimento e estímulos derivados do microambiente tecidual ou tumoral (Murray; Wynn, 2011). Os macrófagos exercem funções essenciais como fagocitose, processamento e apresentação de antígenos extracelulares e intracelulares, além da secreção de mediadores inflamatórios capazes de modular a resposta imune adaptativa (Shi; Pamer, 2011). Essa plasticidade funcional permite que os macrófagos adquiram perfis fenotípicos e funcionais distintos, adaptando-se às demandas imunológicas do tecido em que se encontram. No contexto do câncer, monócitos recrutados para o microambiente tumoral diferenciam-se majoritariamente em macrófagos associados ao tumor (TAMs), células altamente abundantes e funcionalmente relevantes na progressão neoplásica e na modulação da resposta imune antitumoral (Naylor *et al.*, 2018). Essa origem hematopoiética, aliada à elevada capacidade migratória, plasticidade fenotípica e atuação central no microambiente tumoral, fundamenta o interesse crescente na utilização de monócitos e macrófagos como plataformas celulares para estratégias avançadas de imunoterapia, incluindo a modificação genética por receptores antigênicos quiméricos (CAR).

Os macrófagos geneticamente modificados para expressar receptores antigênicos quiméricos (CAR-M) apresentam vantagens funcionais específicas quando comparados às células CAR-T, especialmente no contexto do microambiente tumoral (tumor microenvironment, TME). Embora as terapias CAR-T tenham demonstrado elevada eficácia clínica em neoplasias de células B, evidências indicam que linfócitos T modificados com CAR podem apresentar infiltração limitada em determinados contextos tumorais, particularmente em ambientes caracterizados por hipóxia, remodelamento estromal e sinalização imunossupressora (Walid *et al.*, 2026). Em contraste, macrófagos são células naturalmente recrutadas para o TME e desempenham papel central na sua remodelação, favorecendo a infiltração de outras populações da imunidade e modulando a resposta inflamatória local (Wager; Wormley, 2014).

O recrutamento de macrófagos para o TME está intimamente associado às condições metabólicas e inflamatórias do tumor. A hipóxia tumoral induz a expressão de fatores como HIF-1 $\alpha$ , promovendo a liberação de citocinas e quimiocinas, incluindo CCL2, que atuam como potentes mediadores do recrutamento de monócitos circulantes e sua subsequente diferenciação em macrófagos associados ao tumor (Henze; Mazzone, 2016). Esse mecanismo é particularmente relevante em neoplasias

hematológicas, nas quais células mieloides infiltrantes contribuem de forma decisiva para a dinâmica do nicho tumoral.

Tradicionalmente, essas células são classificadas em fenótipos funcionalmente distintos: macrófagos M1, associados a respostas pró-inflamatórias e atividade antitumoral, e macrófagos M2, relacionados a processos anti-inflamatórios, remodelamento tecidual e promoção do crescimento tumoral. Entretanto, evidências contemporâneas indicam que essa classificação representa extremos de um espectro funcional altamente plástico, influenciado dinamicamente por sinais presentes no microambiente tumoral (Ji *et al.*, 2025). Durante as fases iniciais do desenvolvimento tumoral, predominam sinais inflamatórios que favorecem a ativação de macrófagos com perfil M1, caracterizados pela expressão de marcadores como CD80, CD86 e pela produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-8, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , conferindo elevada capacidade antitumoral (Fu *et al.*, 2025.). Contudo, com a progressão da neoplasia, o TME torna-se imunossupressor, promovendo a polarização de macrófagos infiltrantes para perfis funcionalmente semelhantes ao fenótipo M2, que contribuem para evasão imune, angiogênese e progressão tumoral.

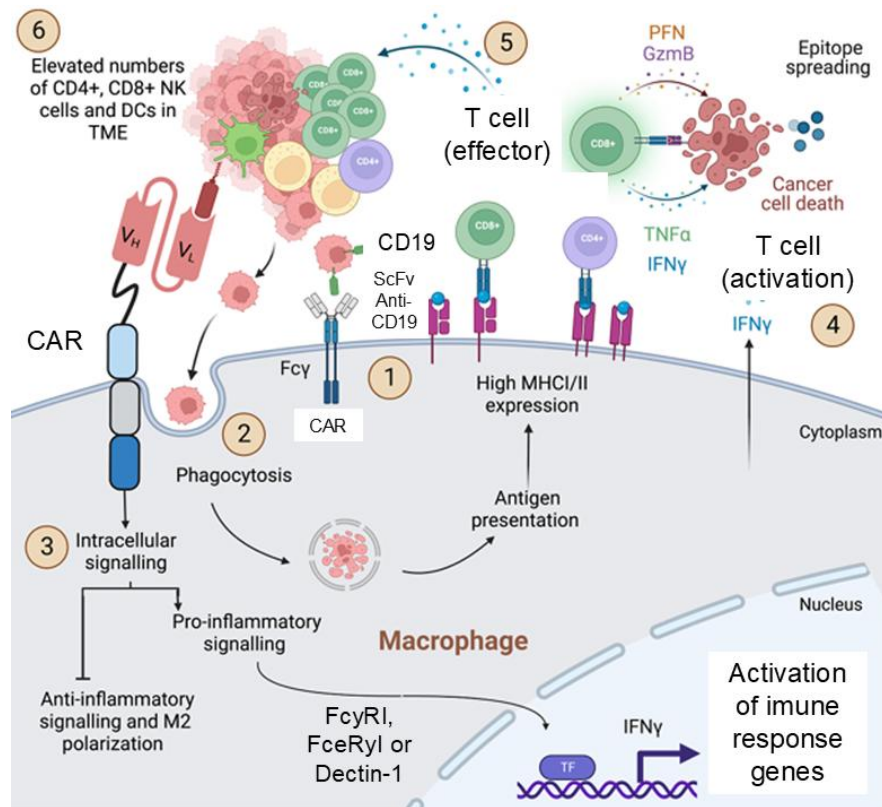
Embora macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico representem o modelo mais próximo da fisiologia humana, a linhagem monocítica humana THP-1 tem sido amplamente empregada como plataforma inicial para o desenvolvimento e validação de estratégias envolvendo macrófagos modificados com CAR (Klichinsky *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2024; Kim *et al.*, 2026). A linhagem celular THP-1 é derivada de um paciente com leucemia monocítica aguda, e por isso possui potencial funcional limitado, ao mesmo tempo que apresenta elevada capacidade proliferativa, homogeneidade genética, facilidade de cultivo e elevada susceptibilidade à modificação genética por vetores virais, características que favorecem sua utilização em estudos de prova de conceito e padronização experimental (Auwerx, 1991; Qin *et al.*, 2012; Klichinsky *et al.*, 2020).

Ensaio clínicos iniciais envolvendo a infusão de macrófagos autólogos derivados de monócitos demonstraram viabilidade e segurança do procedimento, porém com eficácia antitumoral limitada (Andreesen *et al.*, 1998). Esses resultados sugeriram que, embora os macrófagos possuam potencial antitumoral intrínseco, sinais adicionais de ativação e direcionamento antigênico são necessários para maximizar sua função efetora. A partir dessa premissa, estudos subsequentes propuseram a introdução de receptores CAR em macrófagos como estratégia para

promover reconhecimento específico e fagocitose dirigida de células neoplásicas expressando antígenos-alvo, como o CD19 (Morrissey *et al.*, 2018; Klichinsky *et al.*, 2020).

Quanto aos mecanismos por trás dos CAR-Macrófagos, o reconhecimento do antígeno tumoral ocorre por meio do domínio extracelular do CAR (scFv), direcionado contra um antígeno associado ao tumor (por exemplo, CD19), o que permite a ligação específica do macrófago à célula neoplásica. Esse reconhecimento desencadeia sinais intracelulares mediados pelo domínio de transdução de sinal do CAR, frequentemente derivado de moléculas envolvidas em fagocitose ou ativação mieloide, promovendo fagocitose direta da célula tumoral e citotoxicidade dependente de anticorpos via interação Fcγ (ADCC). De forma dependente à escolha da molécula coestimulatória incorporada no domínio de transdução de sinal, a ativação do CAR-Macrófago induz um perfil pró-inflamatório, com aumento da expressão de MHC de classe I e II e intensificação da apresentação de antígenos tumorais processados, favorecendo o recrutamento e a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no microambiente tumoral. A secreção de citocinas inflamatórias, como TNF-α e IFN-γ, contribui para a ativação de células T efetoras e para a remodelação do microambiente tumoral, reduzindo sinais imunossupressores associados à polarização M2. Como consequência, observa-se amplificação da resposta imune antitumoral, caracterizada por morte celular tumoral mediada por linfócitos T citotóxicos, liberação de granzimas e perforinas, além de fenômenos de *epitope spreading*, que ampliam o repertório de reconhecimento imunológico contra o tumor. Em conjunto, a Figura 3 evidencia que os CAR-Macrófagos atuam não apenas como efetores citotóxicos inatos, mas também como potentes orquestradores da resposta imune inata e adaptativa, integrando fagocitose, apresentação de antígenos e ativação de células T no combate às neoplasias.

**FIGURA 3 - Mecanismos de ação de macrófagos CAR no microambiente tumoral**



**Figura 3 - Mecanismos de ação de macrófagos CAR no microambiente tumoral.** (1) O reconhecimento do antígeno tumoral pelo scFv do CAR promove a ativação do macrófago e o aumento da expressão de MHC I e II, favorecendo a apresentação de antígenos. (2) A ligação às células tumorais pode desencadear fagocitose e citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC). (3) A sinalização intracelular mediada pelo domínio de transdução do CAR induz vias pró-inflamatórias e reprogramação funcional do macrófago. (4) A secreção de citocinas inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , intensifica a resposta imune local. (5) A apresentação antigênica e o ambiente inflamatório promovem a ativação de linfócitos T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$ , resultando em morte celular tumoral e *epitope spreading*. (6) Esses processos culminam no aumento do recrutamento de células imunes efetoras e na amplificação da resposta antitumoral.

Fonte: adaptado de Mishra; Malonia, 2023.

Nesse contexto, estratégias capazes de induzir a polarização funcional de macrófagos para um perfil pró-inflamatório e antitumoral emergem como abordagens terapêuticas promissoras. Estudos pioneiros demonstraram que a expressão de receptores CAR em macrófagos é capaz de induzir não apenas o reconhecimento alvo-específico de células tumorais, mas também a repolarização dessas células para um fenótipo funcional semelhante ao M1. Klichinsky e colaboradores (2020) demonstraram que macrófagos CAR específicos para o antígeno HER2 apresentaram aumento da fagocitose, secreção de citocinas pró-inflamatórias e capacidade de remodelar o microambiente tumoral de forma favorável à resposta antitumoral.

### 1.6 Moléculas com potencial de ativação e polarização pró-inflamatória de macrófagos CAR direcionados ao CD19

A tecnologia CAR-M baseia-se, portanto, na tentativa de reproduzir e potencializar eventos fisiológicos de ativação mieloide, incluindo a formação de uma sinapse fagocítica funcional, ativação de vias inflamatórias e apresentação cruzada de antígenos tumorais, favorecendo a ativação subsequente de linfócitos T endógenos. Nesse sentido, a escolha adequada de domínios intracelulares capazes de explorar vias de sinalização mieloides torna-se um aspecto crítico para o sucesso dessa abordagem (Morrissey *et al.*, 2018).

O receptor Dectina-1 pertence à classe dos receptores de lectina do tipo C e é amplamente expresso em células mieloides, incluindo monócitos e macrófagos. Estruturalmente, Dectina-1 é um receptor transmembrana do tipo II, caracterizado por um domínio extracelular do tipo lectina C responsável pelo reconhecimento de ligantes, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática contendo um motif de ativação semelhante a ITAM (hemITAM). Diferentemente dos ITAMs clássicos, que contêm dois motifs de tirosina separados capazes de recrutar proteínas sinalizadoras, o hemITAM de Dectina-1 apresenta um único motif, cuja ativação depende do agrupamento do receptor e da fosforilação das tirosinas por quinases da família Src. A fosforilação do hemITAM cria sítios de recrutamento para a tirosina quinase SYK, iniciando uma cascata de sinalização intracelular que constitui uma das principais características funcionais desse receptor (Brown *et al.*, 2006; Landmann *et al.*, 2007; Goodridge *et al.*, 2012).

Em condições fisiológicas, Dectina-1 reconhece principalmente  $\beta$ -glucanos presentes na parede celular de fungos, promovendo sua internalização e desencadeando respostas imunes inatas. Após a ativação do receptor, a fosforilação do hemITAM promove o recrutamento e a ativação de SYK, que, por sua vez, regula múltiplas vias *downstream*. Entre elas, destaca-se a ativação de PLC $\gamma$ 2, com consequente geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), mobilização intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação de NFAT. Paralelamente, a atividade de SYK promove a ativação do complexo CARD9-BCL10-MALT1, culminando na ativação do complexo IKK e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Dectina-1 também pode ativar NF- $\kappa$ B por mecanismos dependentes de RAF-1, demonstrando que sua sinalização não se restringe a uma única cascata intracelular. A integração dessas vias promove a expressão de genes envolvidos na resposta pró-inflamatória, incluindo aqueles relacionados à produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além de contribuir para a produção

de espécies reativas de oxigênio e outras funções efetoras das células mieloides (Goodridge *et al.*, 2012; Campuzano *et al.*, 2020).

Dessa forma, a sinalização desencadeada por Dectina-1 conecta diretamente o reconhecimento de estruturas extracelulares à ativação de programas celulares associados à fagocitose, produção de mediadores inflamatórios e processamento de antígenos. Estudos experimentais demonstraram que macrófagos deficientes em Dectina-1 apresentam redução significativa na produção de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, resultando em menor indução de respostas Th1 e Th17 quando comparados a macrófagos de animais selvagens (Campuzano *et al.*, 2020). Esses achados reforçam o papel funcional da Dectina-1 na interface entre imunidade inata e adaptativa, particularmente no contexto de respostas inflamatórias efetoras. Adicionalmente, o processamento e a apresentação de peptídeos antigênicos por macrófagos via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II contribuem para a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com perfil Th1, um fenótipo associado à produção de IFN- $\gamma$  e à indução de mecanismos antitumorais diretos e indiretos (Basu *et al.*, 2022).

Apesar dessas evidências, apenas um estudo na literatura investigou o uso da sinalização intracelular de Dectina-1 como domínio coestimulatório na tecnologia CAR, tendo utilizado células T como plataforma experimental. Nesse trabalho, células T expressando CD19-CAR contendo Dectina-1 como domínio coestimulatório apresentaram atividade antitumoral superior quando comparadas a células CD19-CAR contendo 4-1BB (Liang *et al.*, 2021). Contudo, a funcionalidade dessa via de sinalização no contexto de macrófagos modificados com CAR permanece amplamente inexplorada.

Os receptores Fc humanos pertencem à superfamília das imunoglobulinas e são receptores transmembrana classificados de acordo com sua afinidade pelos anticorpos. Entre esses receptores, o Fc $\gamma$ RI (CD64) destaca-se por apresentar alta afinidade pela região Fc da imunoglobulina G (IgG) e por ser constitutivamente expresso em monócitos e macrófagos, nos quais desempenha funções relacionadas ao reconhecimento e internalização de imunocomplexos, fagocitose e ativação celular (Gogesch *et al.*, 2021). Estruturalmente, o Fc $\gamma$ RI é um receptor transmembrana, apresentando três domínios extracelulares do tipo Ig-like, seguidos por uma região transmembrana e um domínio citoplasmático responsável pela transdução do sinal. A interação do Fc $\gamma$ RI com imunocomplexos promove o agrupamento do receptor e a

ativação de vias intracelulares associadas à reorganização do citoesqueleto, internalização e fagocitose, estabelecendo uma conexão direta entre o reconhecimento de estruturas opsonizadas e as funções efetoras características de células mieloides (Nimmerjahn; Ravetch, 2008; Gogesch *et al.*, 2021). A ativação de monócitos e macrófagos via FcγRI desencadeia uma complexa sinalização intracelular que envolve principalmente quinases da família Src, como SYK. A ativação de SYK constitui um evento central nesse processo, promovendo a ativação subsequente de moléculas envolvidas na formação do fagossomo e na reorganização da actina, além de contribuir para a produção de mediadores inflamatórios e outras respostas funcionais (Bruhns; Jonsson, 2015).

A capacidade do FcγRI de induzir respostas fagocíticas e inflamatórias constitui, portanto, uma característica de particular interesse para sua utilização como componente do domínio de transdução de sinal de receptores CAR em células mieloides. Nesse contexto, a utilização das regiões transmembrana e citoplasmática do FcγRI como domínios do CAR permite associar o reconhecimento específico de um antígeno tumoral, mediado pelo domínio extracelular do CAR, às vias intracelulares fisiologicamente empregadas pelo FcγRI. Essa estratégia representa uma forma de redirecionar a maquinaria efetora do receptor para um alvo tumoral específico, potencialmente favorecendo a fagocitose e a ativação de funções pró-inflamatórias independentemente da necessidade de reconhecimento de imunocomplexos. Morrissey e colaboradores (2018) demonstraram que macrófagos CD19-CAR contendo FcγR como domínio de transdução de sinal apresentaram aumento significativo da atividade fagocítica alvo-específica contra células Raji (linfoma de Burkitt; CD19<sup>+</sup>). De forma complementar, Klichinsky *et al.* (2020) compararam CARs anti-HER2 contendo FcγR ou CD3ζ como domínios de sinalização em células da linhagem THP-1 e observaram que ambos os construtos foram capazes de induzir atividades antitumorais equivalentes, reforçando a relevância dos receptores Fc como domínios coestimulatórios funcionais em modelos CAR-M.

Ainda em relação aos receptores Fc humanos, o FcεRI é o receptor de alta afinidade para imunoglobulina E (IgE) e apresenta uma estrutura multi-subunitária composta por uma subunidade α extracelular composta por dois domínios Ig-like seguida de uma região transmembrana, uma subunidade β transmembrana e duas cadeias γ associadas por pontes dissulfeto. Enquanto a cadeia α participa principalmente do reconhecimento extracelular da IgE, as cadeias γ fornecem a

maquinaria intracelular necessária para a transdução do sinal. Cada cadeia  $\gamma$  apresenta uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática contendo um motif ITAM, cuja fosforilação por quinases da família Src constitui um evento inicial da sinalização ativadora desencadeada pelo receptor (Kinet, 1999; Gilfillan; Traczyk *et al.*, 2006). A partir desse evento, são desencadeadas vias de sinalização envolvendo SYK, PLC $\gamma$ , PI3K, MAPK e outras moléculas intracelulares que regulam mobilização de cálcio, ativação de fatores de transcrição e reorganização do citoesqueleto. A integração dessas vias pode resultar em produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da capacidade de ativação das células apresentadoras de antígeno e amplificação de respostas inflamatórias. Em células mieloides, a sinalização mediada pela subunidade gama do Fc $\epsilon$ RI (Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I) também pode contribuir para a ativação funcional e para a indução de respostas adaptativas, incluindo a produção de mediadores capazes de favorecer respostas Th1 e Th17 (Yang *et al.*, 2022).

Em conjunto, essas evidências posicionam os macrófagos como uma plataforma altamente atrativa para o desenvolvimento de terapias celulares inovadoras contra o câncer. A incorporação da tecnologia CAR, associada a domínios coestimulatórios derivados de receptores mieloides, como Dectina-1 e FcR, representa uma estratégia promissora para potencializar a atividade fagocítica, inflamatória e imunomoduladora dessas células. Embora a maioria dos estudos envolvendo CAR-M tenha se concentrado em tumores sólidos, a aplicação dessa abordagem no contexto das neoplasias de células B ainda se encontra em estágio inicial, evidenciada pelo número limitado de estudos publicados. Dessa forma, o presente projeto se justifica pela geração de plataformas de manufatura de CD19-CAR-Macrófagos, e pela investigação da funcionalidade dessas células contendo domínios coestimulatórios de Dectina-1 ou FcR, emergindo como uma lacuna relevante e um campo promissor para o avanço da imunoterapia celular contra neoplasias de células B.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Geração de monócitos modificados com CD19-CAR contendo Dectina-1, FcεR1 ou FcγRI como domínios coestimulatórios para avaliar o efeito antitumoral contra células B neoplásicas.

### **2.2 Objetivos específicos**

#### **2.2.1 Expressão de luciferase em células B neoplásicas**

- a) Modificar linhagens de células B neoplásicas (Raji, Daudi e Nalm-6) para expressarem luciferase;
- b) Seleção das linhagens de células B neoplásicas estáveis para a expressão de luciferase;

#### **2.2.2 Expressão de EGFP em células B neoplásicas**

- a) Modificar linhagens de células B neoplásicas (Raji, Daudi e Nalm-6) para expressarem EGFP;
- b) Seleção das linhagens de células B neoplásicas estáveis para a expressão de EGFP;

#### **2.2.3 Modificação de linhagem de monócitos com as variantes de CD19-CAR**

- a) Subclonagem das variantes de CD19-CAR (CD19-Dectin-1-CAR, CD19-8-FcεR1-CAR, CD19-8-FcγRI-CAR e CD19-FcγRI-CAR) em vetor lentiviral seguido pela produção de partículas lentivirais em células HEK-293T;
- b) Transdução de células da linhagem THP-1 com os diferentes construtos de CD19-CAR supracitados;
- c) Realizar a seleção de população estável para a expressão das variantes de CD19-CAR, de forma separada;

#### **2.2.4 Avaliação da atividade efetora de monócitos modificados com as variantes de CD19-CAR na presença de linhagens de células B neoplásicas**

- a) Determinar por microscopia de fluorescência a interação de monócitos expressando CD19-CAR na presença de células B neoplásicas modificadas

- b) Quantificar a secreção de mediadores pró-inflamatórios produzidos por monócitos expressando CD19-CAR em resposta ao alvo
- c) Avaliar o efeito citotóxico de monócitos modificados com CD19-CAR frente a incubação *in vitro* com linhagens de células B neoplásicas

### 3. METODOLOGIA

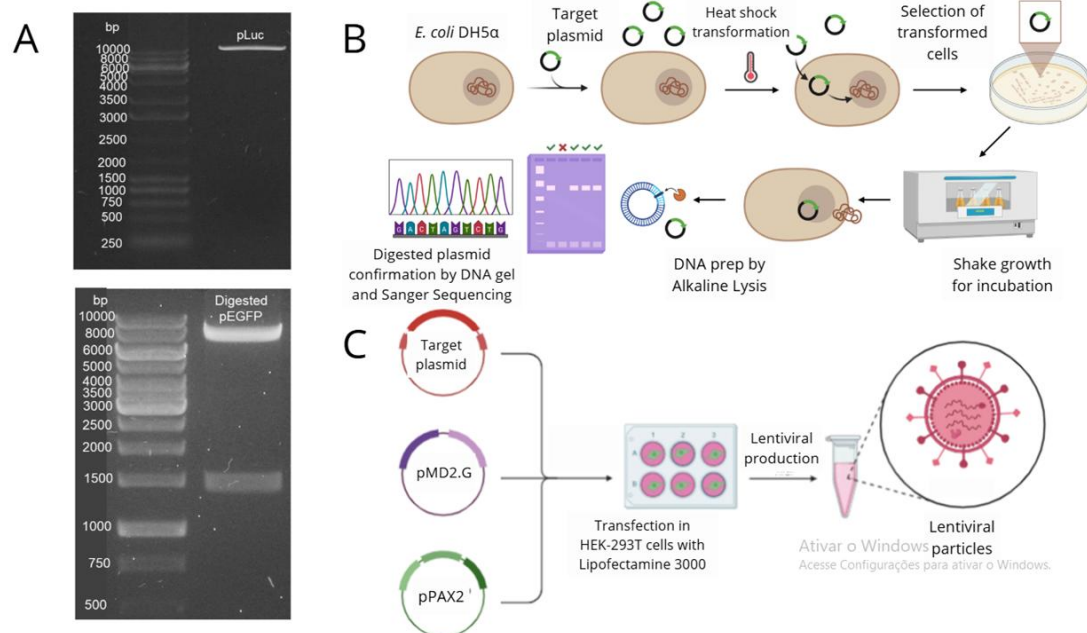
#### 3.1 Produção de partículas lentivirais contendo a sequência codificadora da luciferase ou EGFP

O plasmídeo contendo a sequência codificadora da luciferase (pLuc) foi cedido pelo Prof. Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza, do Hemocentro de Ribeirão Preto. pLuc foi confirmado pelo tamanho no gel de agarose a 1,2% a partir da digestão com a enzima BamHI (Figura 4A), resultando em um fragmento com 8616 bp como esperado. O plasmídeo pLuc foi utilizado na transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  cálcio-competente através de choque térmico, e a purificação do plasmídeo foi realizada através do método por lise alcalina (Chang *et al.*, 2017; Untergasser 2006) (Figura 4B). O plasmídeo pLuc possui uma região para induzir resistência à puromicina que está sob o mesmo promotor para induzir a expressão de luciferase, portanto, a utilização de puromicina permite a seleção de células modificadas para a expressão do transgene em estudo.

A produção de partículas lentivirais carreando a sequência codificadora de luciferase envolveu as células HEK293T, mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Gibco®) em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, como principal ferramenta utilizada na co-transfecção de plasmídeos lentivirais e acessórios. As células HEK293T foram semeadas em T-flask 25cm<sup>3</sup> (1x10<sup>6</sup> células/5 mL), e após 36-48h de cultura as células foram transfectadas. Para isso, os plasmídeos pMD2.G (expressão do envelope VSV-G; Addgene® Cat. N° 12259) e psPAX2 (expressão de proteínas para o empacotamento lentiviral; Addgene® Cat. N° 12260) foram co-transfectados com o vetor lentiviral pLuc ou pEGFP, através do reagente de transfecção Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific®, Cat. N° L3000008) como indicado pelo fabricante (Figura 4C).

Após 48 e 72 horas da transfecção, o sobrenadante contendo as partículas lentivirais codificantes de luciferase ou EGFP foi coletado e armazenado a 4°C. As partículas lentivirais foram clarificadas por centrifugação (300g, 10min, 4°C), e o sobrenadante foi incubado com o reagente Lenti-X concentrator (Takara Bio USA® Cat. N° 631232) para concentrar o estoque lentiviral, conforme as recomendações do fabricante. Os estoques de partículas lentivirais foram ressuspensos em PBS, e as alíquotas armazenadas a -80°C até o uso.

**FIGURA 4 - Fluxograma para validar os plasmídeos utilizados na produção de partículas lentivirais carreando as sequências codificadoras para a expressão de luciferase ou EGFP**



**Legenda: Figura 4 - Fluxograma para validar os plasmídeos utilizados na produção de partículas lentivirais carreando as sequências codificadoras para a expressão de luciferase ou EGFP.** (A) Plasmídeos de expressão da luciferase (pLuc) ou EGFP (pEGFP) avaliados em eletroforese de DNA em gel de agarose (1,2%), após a digestão de pLuc com as enzimas de restrição BamHI (8616bp) e a digestão de pEGFP com NheI e EcoRI (1473bp + 7933bp). (B) Fluxo de trabalho da transformação de *E. coli* DH5α cálcio competente com o plasmídeo de interesse, seleção e expansão bacteriana, lise alcalina e avaliação do plasmídeo por tamanho em eletroforese de DNA em gel de agarose após a digestão com enzimas de restrição. (C) Fluxo de trabalho da produção de partículas lentivirais contendo a sequência codificadora de interesse, utilizando o Reagente Lipofectamina 3000 para co-transfectar células HEK-293T com pMD2.G, pPAX2 e o plasmídeo de interesse.

Fonte: os esquemas foram gerados no software BioRender.

### 3.2 Modificação de células B neoplásicas com luciferase ou EGFP

Linhagens de células B neoplásicas (Raji, Daudi e Nalm-6) foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o procedimento de modificação das células B neoplásicas para a expressão de luciferase,  $1 \times 10^5$  células por poço, em triplicata, foram plaqueadas em conjunto com as partículas lentivirais carreando a sequência codificadora da luciferase, sendo volume final de 250µL em microplaca de 48 poços. A transdução das células B neoplásicas considerou o procedimento de espinoculação (900g, 65min, 25°C) (Dos Santos *et al.*, 2022).

A seleção das linhagens de células B neoplásicas expressando luciferase ocorreu após o tratamento da cultura celular com puomicina (10 µg/mL; Sigma Aldrich® Cat. Nº P8833). A quantidade de  $1 \times 10^4$  células foi distribuída por poço em

placa de 96 poços e tratadas com puromicina por 72h (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>). Esse procedimento foi repetido em três rounds, e a cada repetição as células B modificadas para a expressão de luciferase foi avaliada para a detecção de luminescência através de Luminômetro Synergy (Biotek®). A reação de luminescência ocorreu a partir da adição de D-Luciferina (100 µg/mL; Thermo Fisher Scientific® Cat. Nº 88293; substrato da enzima luciferase) e incubação por 30min a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle negativo para a expressão da luciferase, as células não modificadas com lentivírus carreando a sequência codificadora de luciferase foram utilizadas.

Para a modificação das células B neoplásicas com EGFP, as células Raji, Daudi e Nalm-6 (1x10<sup>5</sup> células/poço), na condição de triplicata, foram plaqueadas e incubadas com as partículas lentivirais contendo a sequência codificadora do EGFP, sendo volume final de 250 µL em microplaca de 48 poços. O procedimento de transdução utilizou o método de espinoculação (MOI de 5, 900g, 65 min, 25°C) (Dos Santos *et al.*, 2022). A eficiência da transdução foi determinada após 72h através de citometria de fluxo, e a porcentagem de células EGFP positivas na população celular representou o marcador de eficiência de transdução. As células Daudi e Nalm-6 expressando EGFP foram purificadas para a obtenção de uma população celular EGFP+ através da técnica de *cell sorting*, e utilizadas para imagens de microscopia de fluorescência.

### **3.3 Produção de partículas lentivirais contendo a sequência codificadora das variantes de CD19-CAR, modificação de células THP-1 para expressarem EGFP e variantes de CD19-CAR**

Os fragmentos de DNA referentes as variantes de CD19-CAR foram sintetizados pela empresa Twist, sendo as seguintes construções: (I) CD19-8-FcεRγI-CAR; (II) CD19-Dectina-1-CAR; (III) CD19-8-FcγRI-CAR e (IV) CD19-FcγRI-CAR. A produção de partículas lentivirais de cada variante de CD19-CAR ocorreu de forma similar a produção de partículas lentivirais para a modificação de linhagem de células B neoplásicas para a expressão de EGFP, como descrito no tópico 3.2. No período de 48h após a transfecção, as células HEK-293T foram utilizadas para imagens de microscopia de fluorescência, verificando a presença de EGFP oriundo do CAR nas células.

As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e 2 g/L de glucose estéril (Gibco®, Cat. Nº A24940-01) a 1M, a 37°C e 5%

de CO<sub>2</sub>. As células THP-1 ( $1 \times 10^5$  células/poço, em triplicata) foram modificadas para a expressão de EGFP através do procedimento de espinoculação (900g, 65min, 25°C) com partículas lentivirais. A eficiência da transdução foi realizada por citometria de fluxo, verificando a porcentagem de células EGFP<sup>+</sup> na população celular. A modificação de células THP-1 com EGFP, sendo backbone lentiviral vazio, visa a utilização dessa população como células controle para comparação com as células expressando CAR.

Em um segundo momento, as células THP-1 foram submetidas à modificação para a expressão de CD19-8-137z-CAR para utilizar como controle de avaliação da expressão do CAR na superfície celular. Para isso, o anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment, Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 647 (Jackson ImmunoResearch® Cat. Nº 115606072), utilizado para detectar o scFv de CD19-CAR na superfície celular, ou a Proteína L conjugada à ficoeritrina (Proteína L-PE), que reconhece a região variável de cadeias leves de imunoglobulinas presentes no domínio scFv, permitiram a identificação da marcação em células expressando CD19-CAR de forma concomitante com a detecção da tag EGFP. A metodologia para detecção de variantes de CD19-CAR na superfície de células THP-1 modificadas está detalhada no tópico 3.4 do presente trabalho. A viabilidade do anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment em determinar a expressão de CD19-CAR na superfície celular tornou contundente a avaliação de células THP-1 modificadas com CD19-FcγRI-CAR construído a partir de fragmentos clonados, pois essa construção não apresenta EGFP como tag para determinar a taxa de transdução.

### **3.4 Marcação intracelular ou de superfície de CD19-CAR em células THP-1 modificadas**

A detecção intracelular de CD19-CAR em células THP-1 foi realizada por citometria de fluxo utilizando anticorpo AffiniPure® anti-Fab F(ab')<sub>2</sub> após fixação e permeabilização celular. Inicialmente,  $5 \times 10^5$  células por condição foram centrifugadas e submetidas a bloqueio inespecífico com *staining buffer* (PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de albumina sérica bovina (BSA)). Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o reagente Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences), conforme as recomendações do fabricante, com incubação a 4 °C por 40 minutos. Após a fixação/permeabilização, as células foram lavadas de modo a manter a permeabilidade da membrana durante as etapas subsequentes. A marcação

intracelular foi então realizada pela incubação das células com anticorpo AffiniPure® anti-Fab F(ab')<sub>2</sub>, diluído 100X em *wash buffer* (PBS suplementado com 0,1% de saponina e 1% de BSA), por 40 minutos a 4 °C, protegidas da luz. Após novas lavagens para remoção do anticorpo não ligado, as células foram ressuspensas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD Accuri C6. O protocolo experimental foi baseado nas recomendações do kit BD Cytotfix/Cytoperm™ para coloração intracelular, amplamente utilizado para detecção de proteínas citoplasmáticas e de receptores quiméricos em células geneticamente modificadas, com adaptações para o uso de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> visando reduzir ligações inespecíficas mediadas por receptores Fc em células monocíticas (Sadelain *et al.*, 2013).

Além disso, a detecção das variantes de CD19-CAR na superfície de células THP-1 modificadas foi realizada por citometria de fluxo utilizando Proteína L biotinizada ou o anticorpo AffiniPure® anti-Fab F(ab')<sub>2</sub>. Para cada condição experimental da marcação com Proteína L, 5x10<sup>5</sup> células foram incubadas com PBS suplementado com 2% de BSA e 10% de FBS por 30 minutos a 4 °C, para bloqueio de ligações inespecíficas. Após o bloqueio, as células foram centrifugadas a 300 × g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 50 µL de Proteína L biotinizada (2 µg/mL) diluída em PBS contendo 2% de BSA, e incubadas por 40 minutos a 4 °C. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 1 mL de PBS contendo 2% de BSA, mediante centrifugação a 300 × g por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 50 µL do mesmo tampão e incubadas com estreptavidina conjugada à ficoeritrina (strep-PE), por 40 minutos a 4 °C, protegidas da luz. A strep-PE foi utilizada para a detecção da biotina conjugada à Proteína L previamente ligada ao domínio de reconhecimento do CD19-CAR. Após a marcação, as células foram lavadas duas vezes com o mesmo tampão e ressuspensas em 300 µL de PBS 1X para aquisição dos eventos por citometria de fluxo. As regiões de análise (*gates*) foram realizadas no software FlowJo Vx, considerando como controle as células THP-1 não modificadas.

Para a marcação com o anticorpo AffiniPure® anti-Fab F(ab')<sub>2</sub> AlexaFluor 647, 5x10<sup>5</sup> células por condição experimental foram incubadas com PBS suplementado com 2% de BSA e 10% de FBS por 30 minutos a 4 °C, para bloqueio de ligações inespecíficas. Após o bloqueio, as células foram centrifugadas a 300× g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 100 µL de PBS suplementado com 2% de BSA, aos quais foram adicionados 0,5 µL do anticorpo AffiniPure® anti-Fab F(ab')<sub>2</sub> ou do respectivo

isotipo. As células foram incubadas por 45 minutos a 4 °C, protegidas da luz. Em seguida, foram lavadas com 1 mL de PBS contendo 2% de BSA, mediante centrifugação a 300× g por 10 minutos a 4 °C, e posteriormente ressuspensas em 300 µL de PBS 1X para aquisição dos eventos por citometria de fluxo. As *gates* foram estabelecidas utilizando o software FlowJo Vx, considerando como controle negativo as células THP-1 não modificadas marcadas com o isotipo.

### 3.5 Estratégias de regiões de análise por citometria de fluxo

A estratégia de análise dos eventos por citometria de fluxo foi padronizada para as diferentes condições experimentais. Inicialmente, os eventos foram selecionados em uma *gate* definida em um gráfico de FSC-A x SSC-A, com o objetivo de selecionar a população celular e excluir eventos fora da região de interesse. Em seguida, foi realizada a seleção de células individuais (*singlets*) por meio da relação FSC-A x FSC-H. As análises subsequentes foram realizadas a partir da população de *singlets*. Os eventos foram adquiridos em citômetro BD® Accuri C6 ou Beckman Coulter® CytoFLEX, e as análises das populações de interesse foram realizadas utilizando o software FlowJo Vx.

Para a determinação da porcentagem de células GFP<sup>+</sup>, como nas análises realizadas antes e após a técnica de *cell sorting*, o limite de positividade entre as populações GFP<sup>-</sup> e GFP<sup>+</sup> para o canal FL1, foi estabelecido utilizando a população de *singlets* das células THP-1, Nalm-6, ou Daudi não modificadas como controle negativo. Nas células modificadas, após a seleção dos *singlets*, foi realizada uma etapa adicional de seleção da população celular de interesse de acordo com cada condição, sobre a qual foi aplicado o limite de positividade previamente estabelecido no controle negativo. A porcentagem de eventos incluídos na região GFP<sup>+</sup> foi então utilizada para determinar a eficiência de expressão do marcador nas células modificadas.

Nas análises destinadas à identificação de células duplo-positivas, após a seleção da população celular e dos *singlets*, foi realizada uma etapa adicional de seleção da população de interesse nas células não modificadas. Para as marcações utilizando o anticorpo Anti-Fab conjugado à Alexa Fluor 647, a detecção do anticorpo foi realizada no canal FL4, enquanto para a marcação com Proteína L biotinilada seguida de estreptavidina-PE, a detecção foi realizada no canal FL2. Os limites de positividade para GFP e para a marcação do CAR foram estabelecidos a partir da

população de singlets das células THP-1 não modificadas utilizadas como controles negativos. Posteriormente, esses limites foram aplicados à população celular de interesse selecionada nas células modificadas, permitindo a determinação da porcentagem de células positivas para ambos os parâmetros.

Dessa forma, os critérios de positividade empregados nas análises foram definidos a partir das populações de células THP-1 não modificadas e posteriormente aplicados às respectivas populações de interesse das células modificadas, mantendo-se os mesmos critérios de análise entre as condições experimentais e reduzindo a influência da autofluorescência e de sinais inespecíficos na determinação das populações positivas.

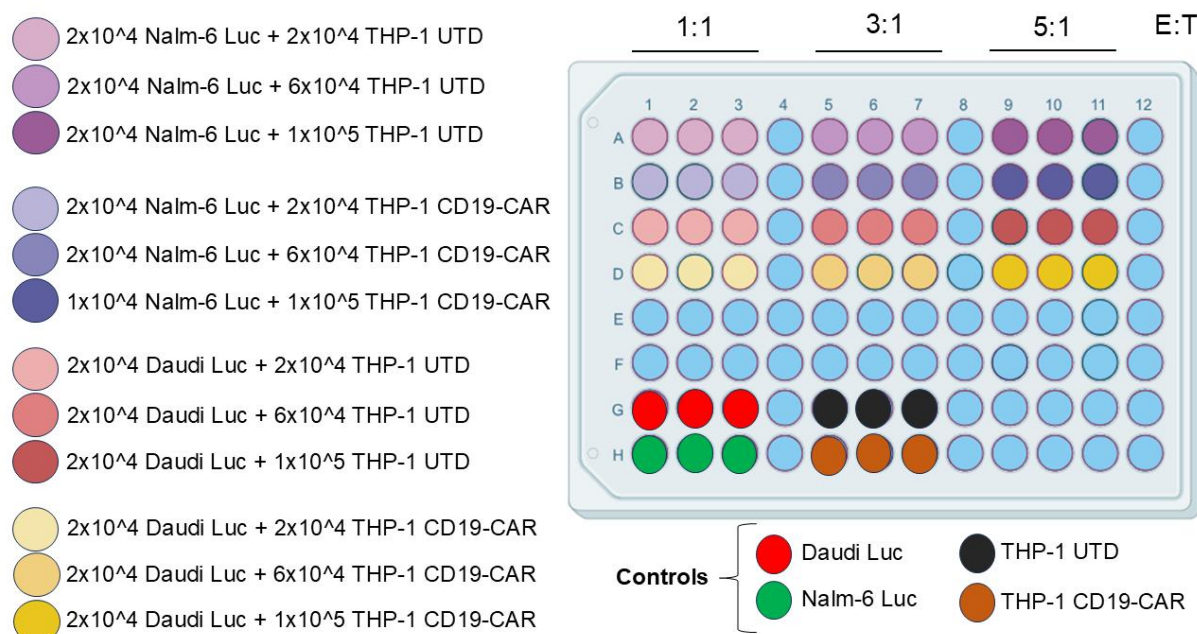
### **3.6 Utilização de plataforma luciferase expressa em linhagens de células B neoplásicas para avaliação da atividade funcional antitumoral de células CD19-THP-1-CAR**

A atividade funcional das células CD19-THP-1-CAR foi avaliada por meio de ensaios de cocultivo com linhagens de células B neoplásicas expressando luciferase de forma estável. Para isso, células THP-1 não transduzidas (UTD) ou células CD19-THP-1-CAR previamente purificadas por *cell sorting* foram cocultivadas com as linhagens Nalm-6 Luc e Daudi Luc em proporções E:T (Effector:Target) correspondentes a 1:1, 3:1 e 5:1. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, na condição de triplicata, utilizando-se  $4 \times 10^4$  ou  $2 \times 10^4$  células-alvo luciferase+ por poço para os experimentos com incubação de 6 horas ou 24 horas de co-cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), respectivamente. As células efetoras foram adicionadas de acordo com as proporções E:T estabelecidas, em um volume final de 200 µL por poço.

Ao término do período de incubação do cocultivo, foi adicionado o substrato D-luciferina à concentração final de 100 µg/mL, seguido de incubação por 30 minutos a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a emissão de luminescência foi mensurada em luminômetro Synergy (BioTek Systems®), sendo os resultados expressos em unidades relativas de luz (Relative Light Units – RLU). Nesta plataforma experimental, a intensidade do sinal luminescente é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis expressando luciferase, uma vez que a enzima catalisa a oxidação da D-luciferina resultando na emissão de luz. Dessa forma, reduções nos valores de RLU refletem diminuição da viabilidade das células-alvo e, conseqüentemente, atividade antitumoral das células efetoras. A Figura 5 apresenta um esquema representativo do

modelo de cocultivo empregado para avaliação funcional com período de incubação de 24 horas das células CD19-THP-1-CAR por meio da plataforma baseada em luciferase.

**FIGURA 5 - Representação esquemática do ensaio funcional baseado em luciferase para avaliação da atividade antitumoral de células CD19-THP-1-CAR**



**Legenda: Figura 5 - Representação esquemática do ensaio funcional baseado em luciferase para avaliação da atividade antitumoral de células CD19-THP-1-CAR.** Células THP-1 não transduzidas (UTD) ou células CD19-THP-1-CAR foram cocultivadas com as linhagens de células B neoplásicas Nalm-6 Luc ou Daudi Luc em placas de 96 poços, nas proporções E:T de 1:1, 3:1 e 5:1. Os ensaios foram realizados em triplicata e incluíram controles contendo apenas células-alvo (Nalm-6 Luc ou Daudi Luc) ou apenas células efectoras (THP-1 UTD ou CD19-THP-1-CAR). Ao término do período de cocultivo, a viabilidade das células-alvo foi determinada por quantificação da luminescência emitida após adição de D-luciferina, sendo os resultados expressos em unidades relativas de luz (RLU).

Fonte: elaborado pelo autor – software BioRender.

### 3.7 Dosagem de TNF- $\alpha$ no sobrenadante do co-cultivo de células CD19-THP-1-CAR frente a linhagens de células B neoplásicas

A produção de fator de necrose tumoral alfa humano (TNF- $\alpha$ ) foi avaliada nos sobrenadantes dos ensaios de cocultivo entre células efectoras e células-alvo. Para isso, células THP-1 não transduzidas (UTD) ou células CD19-THP-1-CAR previamente purificadas por cell sorting foram cocultivadas com as linhagens de células B neoplásicas Nalm-6 e Daudi nas proporções E:T de 1:1, 3:1 e 5:1, por um período de 24 horas, em condições padrão de incubação (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>). Adicionalmente, foram incluídos controles contendo apenas células THP-1 UTD ou CD19-THP-1-CAR, mantidos nas mesmas condições experimentais.

Após o período de cocultivo, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados para remoção de células e detritos celulares e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises. As concentrações de TNF- $\alpha$  humano foram determinadas por ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche (sandwich ELISA), utilizando o kit BD OptEIA™ Human TNF ELISA Set (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de alta ligação foram previamente sensibilizadas com o anticorpo de captura específico para TNF- $\alpha$  humano e incubadas conforme recomendado pelo fabricante. Após etapas de lavagem, amostras e padrões foram adicionados aos poços e incubados para ligação da citocina ao anticorpo de captura. Em seguida, foi adicionado o anticorpo de detecção biotinilado, seguido da incubação com estreptavidina conjugada à peroxidase (HRP). A revelação foi realizada mediante adição da solução de substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB), sendo a reação interrompida com solução ácida apropriada.

A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 450 nm, utilizando correção de fundo em 570 nm. As concentrações de TNF- $\alpha$  foram calculadas por interpolação em curva padrão gerada a partir de concentrações conhecidas da citocina recombinante fornecida no kit e expressas em pg/mL.

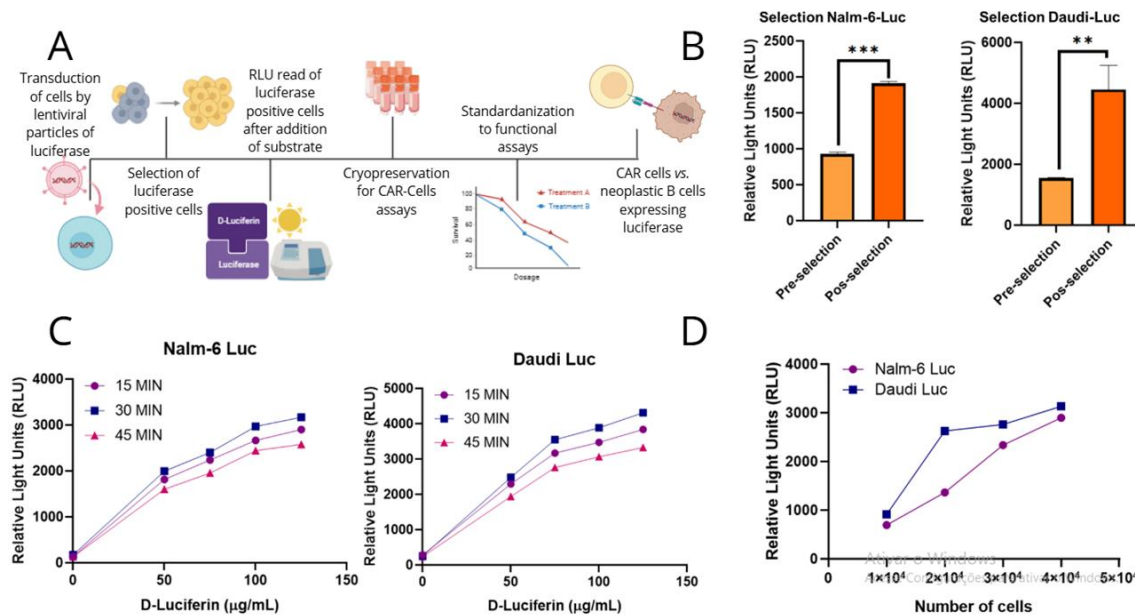
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Expressão de luciferase por linhagens de células B neoplásicas: plataforma de análise da citotoxicidade de células CD19-CAR

As células B neoplásicas modificadas com partículas lentivirais para a expressão de luciferase e após a seleção com puromicina foram analisadas para os níveis de luminescência (RLU), e as células Daudi e Nalm-6 apresentaram um aumento significativo no RLU comparado com as células não modificadas (Figura 6A-B). As células B neoplásicas expressando luciferase foram congeladas (95% SFB e 5% DMSO), e após o descongelamento os níveis de RLU mantiveram elevados em comparação com as células não modificadas com luciferase. Daudi-Luc e Nalm-6-Luc apresentaram excelente expansão celular, manutenção da luminescência através da leitura do RLU após o descongelamento.

As linhagens celulares Daudi e Nalm-6 expressando luciferase foram utilizadas na padronização da curva de leitura do RLU, conforme as seguintes variáveis: a concentração da D-Luciferina (50-125 µg/mL) e o tempo de incubação com o substrato (Figura 6C-D), o número de células plaqueadas ( $1 \times 10^4$  a  $4 \times 10^4$  células por poço) (Figura 6D). Os achados indicam que  $4 \times 10^4$  células/poço incubadas por 4h e, em seguida, adicionado 100 µg/mL de D-Luciferina com posterior incubação de 30min permitiram níveis de RLU em níveis próximos ao platô (Figura 6C, D).

**FIGURA 6 - Modificação e seleção de células B neoplásicas para expressar luciferase, e padronização das condições de cultivo para o ensaio de citotoxicidade**



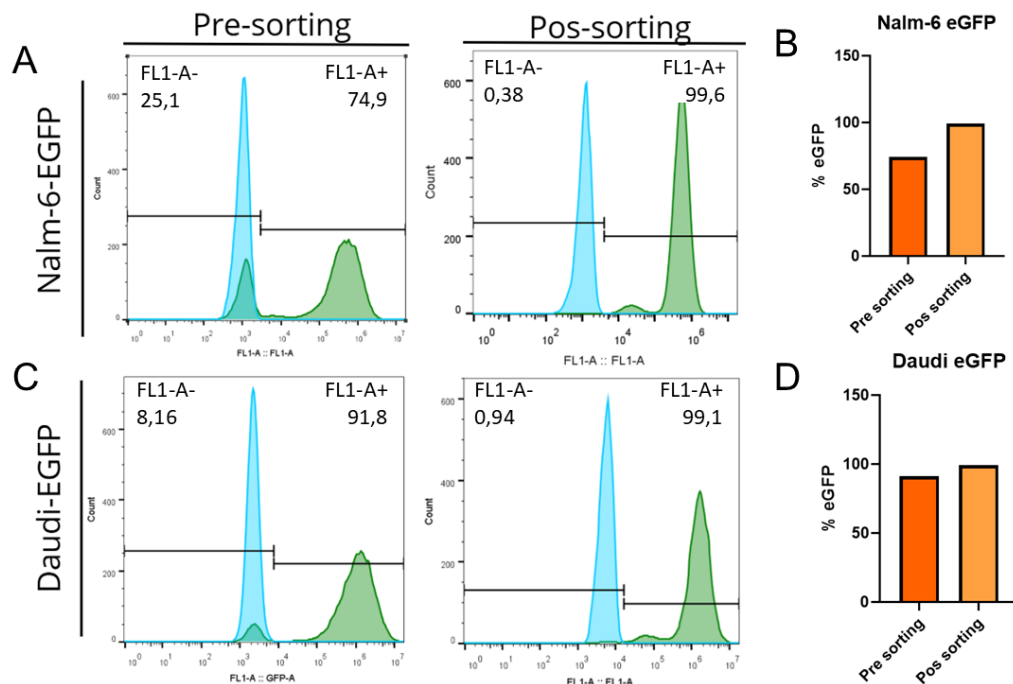
**Legenda: Figura 6 - Modificação e seleção de células B neoplásicas para expressar luciferase, e padronização das condições de cultivo para o ensaio de citotoxicidade. (A)** Esquema do fluxo de trabalho para a geração de células B neoplásicas modificadas para a expressão de luciferase, como plataforma de análise do efeito citotóxico de células CD19-CAR. O esquema foi gerado no software BioRender. **(B)** Análise da leitura do RLU em células Nalm-6-Luc e Daudi-Luc, modificadas para a expressão de luciferase, nas condições de pré- e pós-seleção através de puomicina (10 µg/mL). **(C)** Padronização da concentração de D-Luciferina e do tempo de incubação após a adição do substrato, em células Nalm-6-Luc e Daudi-Luc; **(D)** Padronização do número de células Nalm-6-Luc e Daudi-Luc para ensaio funcional de citotoxicidade tendo como parâmetros previamente definidos 100 µg/mL de D-Luciferina e 30 minutos de incubação após adição do substrato. Três experimentos independentes foram realizados em triplicatas técnicas, e as placas foram incubadas por 4 horas antes da adição do substrato. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 8, pelo método t-test (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

#### 4.2 Modificação de linhagens de células B neoplásicas para a expressão de EGFP: uma plataforma para avaliar a atividade citotóxica e fagocítica de macrófagos CD19-CAR

As células Nalm-6 modificadas para a expressão de EGFP através da transdução com lentivírus acarretou a frequência de 74% de células positivas para EGFP, após 72h da etapa de transdução. A população de células Nalm-6-EGFP foram enriquecidas pela técnica de cell sorting, e após a expansão celular foi constatado uma frequência de 99% de células Nalm-6-EGFP (Figura 7A-B). Os procedimentos citados acima para a modificação de células Nalm-6-EGFP foram aplicadas para a linhagem celular Daudi e, após 72h da etapa de transdução, uma frequência de 91% de células Daudi-EGFP foi observada, e o enriquecimento com a técnica de cell sorting resultou em 99% de células Daudi-EGFP (Figura 7C-D). As células Nalm-6-EGFP e Daudi-EGFP mativeram a taxa de expansão celular comparado com as células não modificadas, e com a manutenção da porcentagem de células positivas para EGFP

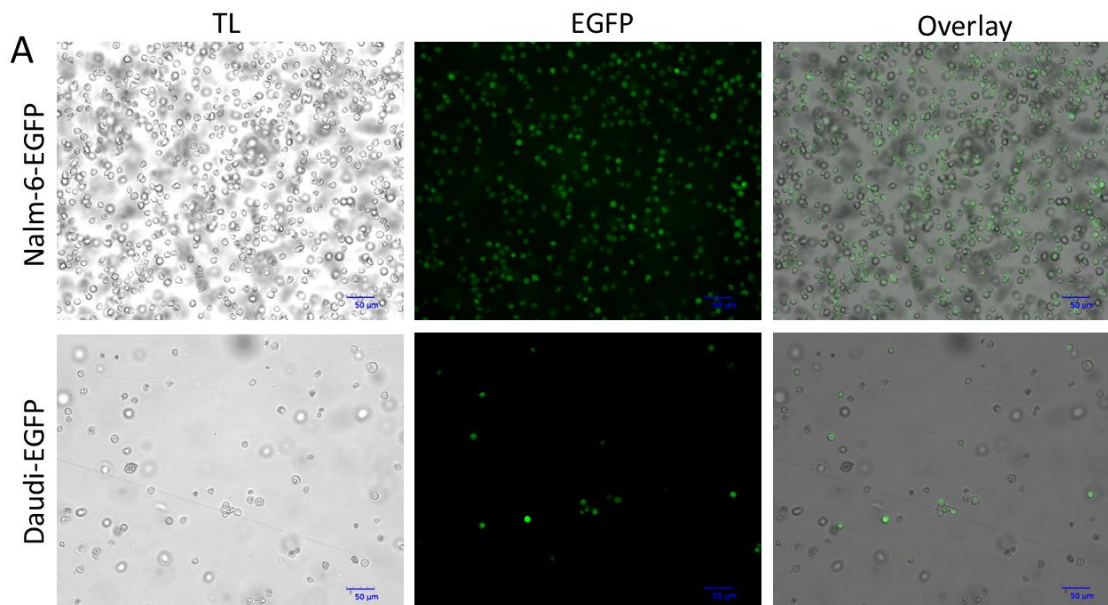
nos níveis de 99%, permitindo a formação de um banco de células. A Figura 8A representa a microscopia de fluorescência utilizando as células B neoplásicas modificadas para a expressão de EGFP, com a finalidade de utilizar como ferramenta na plataforma de avaliação da atividade citotóxica e fagocítica de macrófagos CD19-CAR. Importante destacar, as células Raji-EGFP tiveram o comprometimento da expansão celular e inviabilizou o enriquecimento da população Raji-EGFP para posterior implantação de um banco de células Raji-EGFP, no entanto, ainda será buscado a obtenção de uma população de células Raji-EGFP+.

**FIGURA 7 - Técnica de Cell Sorting para a seleção de células Nalm-6 e Daudi modificadas para a expressão de EGFP**



**Legenda: Figura 7 - Técnica de Cell Sorting para a seleção de células Nalm-6 e Daudi modificadas para a expressão de EGFP. (A-D)** Dot plot de citometria de fluxo e representação gráfica com a determinação da porcentagem de células Nalm-6 EGFP+ (A, B) e Daudi EGFP+ (C, D) antes e após a técnica de enriquecimento de população celular através de *cell sorting*. As amostras foram adquiridas no citômetro BD Accuri C6 e uma análise de 10.000 eventos foi realizada através do software FlowJo Vx.

**FIGURA 8 - Microscopia de fluorescência de células Nalm-6-EGFP ou Daudi-EGFP**



**Legenda: Figura 8 - Microscopia de fluorescência de células Nalm-6-EGFP ou Daudi-EGFP. (A)** Imagens de microscopia de fluorescência (CelenaS, Logos Byosistemas) de células Nalm-6 e Daudi modificadas para a expressão de EGFP, com as imagens em campo claro (painéis à esquerda), EGFP (painéis centrais) e Overlay (painéis à direita).

### 4.3 Construção dos vetores lentivirais contendo as sequências codificadoras das variantes de CD19-CAR

Nosso grupo de pesquisa gerou o construto CD19-CAR em vetor lentiviral contendo os seguintes domínios: scFv FMC63 como domínio de reconhecimento do antígeno, molécula CD8 $\alpha$  humana como a região hinge/transmembrana, e domínio de transdução de sinal das moléculas CD137 (4-1BB) acoplado com CD3 $\zeta$ . O construto CD19-8-137z-CAR foi utilizado como molde para a clonagem e as modificações necessárias para gerar CD19-8-Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I-CAR ou CD19-Fc $\gamma$ RI-CAR (Figura 9A). Para a clonagem dos domínios coestimulatórios provenientes de Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I (UniProt P30273, posição 19-86 aa) ou Fc $\gamma$ RI (UniProt P12314, posição 293-374 aa), o RNA de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi extraído (kit “Monarch® Spin RNA Isolation” da New England Biolabs® Cat. N° T2110S) e realizado a conversão em cDNA para a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dos fragmentos de Fc apontados acima (Figura 9B).

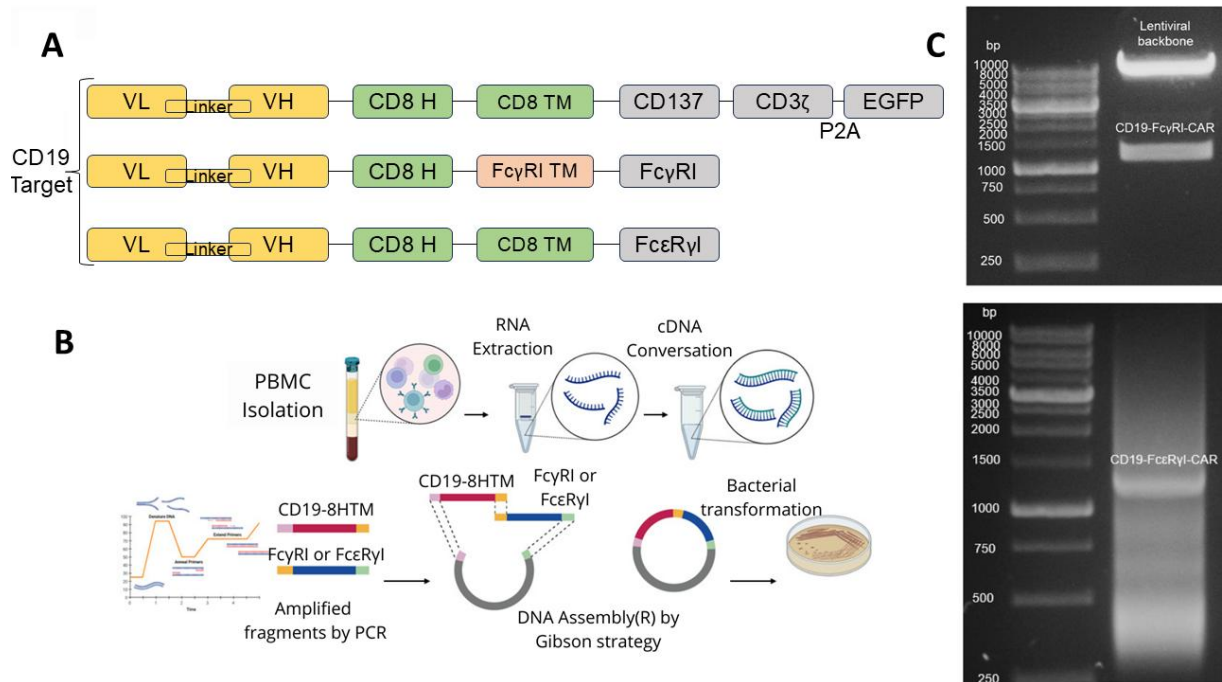
A técnica de Gibson Assembly (2x HiFi Assembly® Master Mix; New England Biolabs®, Cat. N° M5520AA) foi utilizada, inicialmente, para a construção de CD19-Fc $\gamma$ RI-CAR. O vetor lentiviral, após digestão com AfeI/EcoRI no sítio de clonagem, foi incubado com os produtos de PCR referentes ao CD19-CD8Hinge (1.058 bp) e Fc $\gamma$ RI(TM/cyto) (227 bp) contendo regiões apropriadas para a ligação entre os

fragmentos de PCR e subsequente ligação no vetor lentiviral digerido. Essas etapas de ligação entre fragmentos e subclonagem, otimizadas em uma etapa, é viabilizada pela técnica de Gibson Assembly, seguindo as recomendações do fabricante. O produto da reação de Gibson Assembly foi utilizado na transformação de bactéria competente, e com a seleção de clones foi realizado a extração de plasmídeo e digestão com enzimas de restrição para avaliar por eletroforese de DNA em gel de agarose (1,2%) a presença dos fragmentos de DNA gerados. Para finalizar a validação, o plasmídeo de CD19-Fc $\gamma$ RI-CAR foi submetido para sequenciamento por Sanger que ratificou a sequência nucleotídica esperada.

A tentativa de construção CD19-8-Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I-CAR considerou a mesma estratégia descrito acima para a construção de CD19-Fc $\gamma$ RI-CAR, no entanto, o assembly entre as sequências codificadoras de CD19-8H/TM e Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I não ocorreu com a estratégia de Gibson Assembly. Com isso, optamos pela estratégia de Overlap PCR com as sequências codificadoras de CD19-8H/TM e Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I, e a Figura 9C (painel inferior) demonstra o fragmento de 1240 bp correspondente ao produto esperado CD19-8-Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I-CAR. Esse produto foi utilizado na subclonagem no vetor lentiviral com sítio de clonagem digerido com AfeI/EcoRI.

A construção CD19-Dectin-1-CAR apresenta uma peculiaridade que impossibilita a geração da sequência codificadora através da clonagem, pois a Dectina-1 é uma proteína tipo II e para expressar com CD19-CAR era necessário transpor a expressão de Dectina-1 como proteína tipo I. A sequência codificadora de CD19-Dectin-1-CAR foi sintetizada pela empresa Twist, na forma de fragmento, e o processamento seguiu conforme descrito no tópico 4.6.

**FIGURA 9 - Construção dos vetores lentivirais para a expressão dos construtos CD19-CAR a partir de fragmentos clonados**



**Legenda: Figura 9 - Construção dos vetores lentivirais para a expressão dos construtos CD19-CAR a partir de fragmentos clonados.** (A) Esquema da composição dos domínios das variantes de CD19-CAR construídos a partir de fragmentos clonados: CD19-8-137z-CAR utilizado como template para gerar CD19-FcγRI-CAR e CD19-FcεRγI-CAR. (B) Fluxo de trabalho para a construção dos vetores CD19-CAR: amplificação dos fragmentos scFv específico para CD19, FcγRI, ou FcεRγI através de PCR tendo como template o cDNA convertido de RNA de PBMCs, e a ligação entre as sequências codificadoras desses fragmentos foi realizada através de DNA Assembly® por Gibson Protocol. A recuperação de plasmídeos após a subclonagem dos fragmentos foi realizada através da transformação bacteriana. Os esquemas foram gerados no software BioRender. (C) No painel superior, eletroforese de DNA em gel de agarose a 1,2% para confirmar o tamanho do plasmídeo CD19-FcγRI-CAR (1285 bp) e seu backbone lentiviral (8990 bp) após o Assembly e digestão com XbaI/EcoRI. No painel inferior, eletroforese de DNA em gel de agarose a 1,2% para confirmar o tamanho do produto da Overlap PCR para unir os fragmentos CD19-CD8 e FcεRγI amplificados, gerando CD19-8-FcεRγI-CAR (1240bp).

Fonte: o esquema foi elaborado utilizando o Software Biorender.

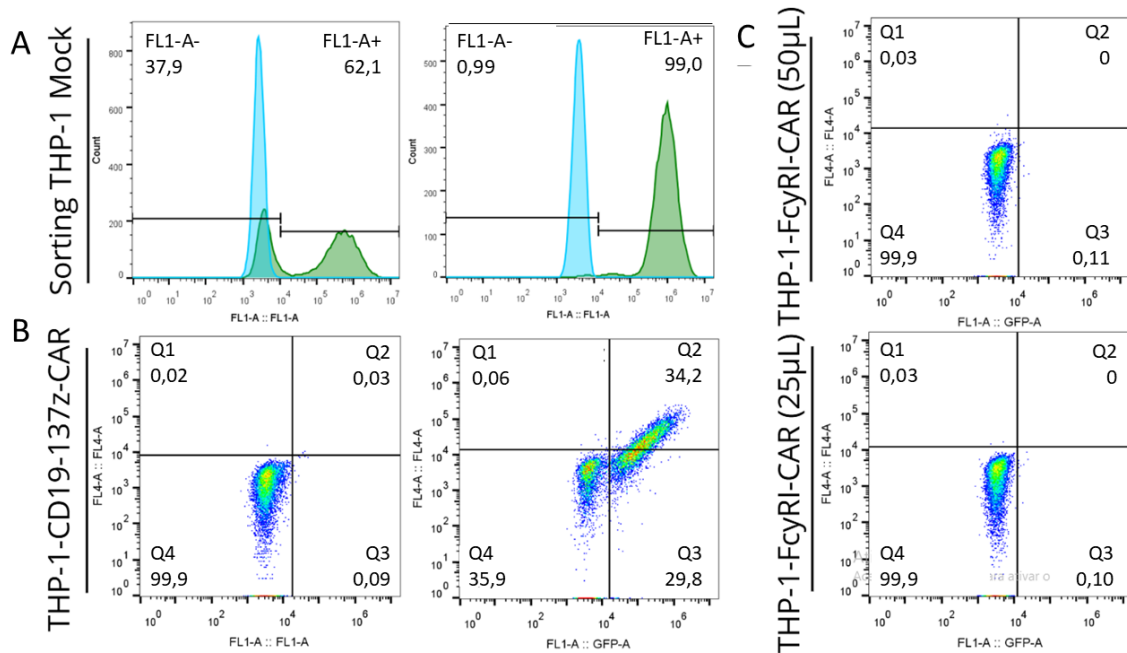
#### 4.4 Geração de células THP-1 estáveis para expressarem as variantes de CD19-CAR a partir de fragmentos clonados

Primeiramente, as células THP-1 foram submetidas à modificação para a expressão de EGFP, sendo o backbone lentiviral vazio, visando a utilização dessa população como células controle para a comparação com as células expressando as variantes de CD19-CAR. A população de células THP-1-Mock representou aproximadamente 62% de células positivas para EGFP após a etapa de transdução com partículas lentivirais (Figura 10A, painel à esquerda). Posterior ao enriquecimento pela técnica de cell sorting, a população atingiu 99% de células positivas (Figura 10A, painel à direita). Outra população de células THP-1 de importância nos grupos controles se refere a modificação com a construção CD19-8-137z-CAR, pois essa variante de CD19-CAR expressa em células THP-1 permite avaliar como as novas

variantes de CD19-CAR comportam a nível de expressão nos compartimentos celulares. Nesse sentido, as células THP-1 expressando CD19-8-137z-CAR foram utilizadas para avaliar a expressão do CAR na superfície celular, com o objetivo de considerar a variante CD19-8-137z-CAR, licenciada na terapia celular, como parâmetro na comparação da taxa de expressão na superfície celular referente às outras variantes de CD19-CAR. Para isso, o anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment, Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 647 (Jackson ImmunoResearch® Cat. Nº 115606072), utilizado para detectar o scFv de CD19-CAR na superfície celular, permitiu a identificação da marcação em células expressando CD19-CAR de forma concomitante com a detecção da tag EGFP. Essa estratégia é visualizada na Figura 10B (painel à direita) que demonstra aproximadamente 34% das células CD19-8-137z-CAR identificadas pela tag EGFP e para a marcação do scFv de CD19-CAR na superfície celular. A viabilidade do anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment em determinar a expressão de CD19-CAR na superfície celular tornou contundente a avaliação de células THP-1 modificadas com as outras variantes de CD19-CAR em estudo.

A variante CD19-FcγRI-CAR construída a partir de fragmentos clonados não apresenta EGFP como tag para determinar a taxa de modificação das células THP-1 e, com isso, a utilização do anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment permitiu avaliar a taxa de expressão de CD19-FcγRI-CAR e a taxa de expressão dessa construção na superfície celular. A Figura 10C demonstra que a expressão de CD19-FcγRI-CAR em células THP-1 não repercutiu na expressão do CAR na superfície celular, fato justificado pela ausência de marcação de CD19-CAR com anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Figura 10).

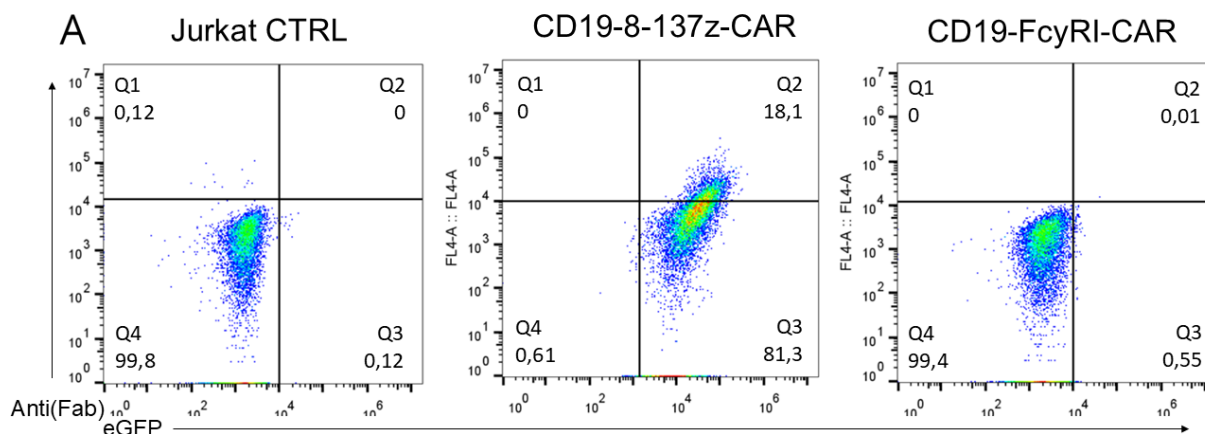
**FIGURA 10 - Avaliação da modificação de células THP-1 para a expressão de EGFP ou variantes de CD19-CAR construídas a partir de fragmentos clonados**



**Legenda: Figura 10 - Avaliação da modificação de células THP-1 para a expressão de EGFP ou variantes de CD19-CAR construídas a partir de fragmentos clonados. (A)** Histogramas com a porcentagem de células THP-1-Mock EGFP+ nos períodos pré- (painel à esquerda) e pós-seleção (painel à direita) pela técnica de enriquecimento por cell sorting. **(B)** Eficiência da transdução de CD19-8-137z-CAR EGFP+ em células THP-1 através de uma plataforma lentiviral. As células foram marcadas com o anticorpo Anti-(Fab')<sub>2</sub> Jackson ImmunoResearch® para detecção do CAR na superfície celular. **(C)** Eficiência de transdução de células THP-1 para a expressão de CD19-FcγRI-CAR EGFP modificadas com 50 μL ou 25 μL do sobrenadante concentrado de partículas lentivirais carregando a sequência codificadora da variante de CD19-CAR. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas, com aquisição e análise de 10.000 eventos no citômetro BD Accuri C6. As gates foram realizadas utilizando o software FlowJo Vx.

A construção CD19-FcγRI-CAR, como esquematizado na Figura 9A, apresenta a molécula CD8α humana como hinge/stalk e FcγRI como transmembrana e intracelular, o que pode influenciar na exposição do CD19-CAR a depender da população celular, e essa situação poderia ser influenciada nas células THP-1. Com isso, a construção CD19-FcγRI-CAR foi expressa nas células Jurkat, uma linhagem de células T amplamente utilizada em plataformas de avaliação com CAR, e a Figura 11A (último painel à direita) demonstra a ausência de detecção do CD19-FcγRI-CAR na superfície após a marcação com anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment. Como controle positivo, a Figura 11A (painel central) apresenta células Jurkat expressando CD19-8-137z-CAR com a presença do receptor na superfície celular como demonstrado pela detecção com anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment.

**FIGURA 11 - Avaliação da expressão de CD19-8-137z-CAR ou CD19-FcγRI-CAR na superfície celular de Jurkat modificadas**

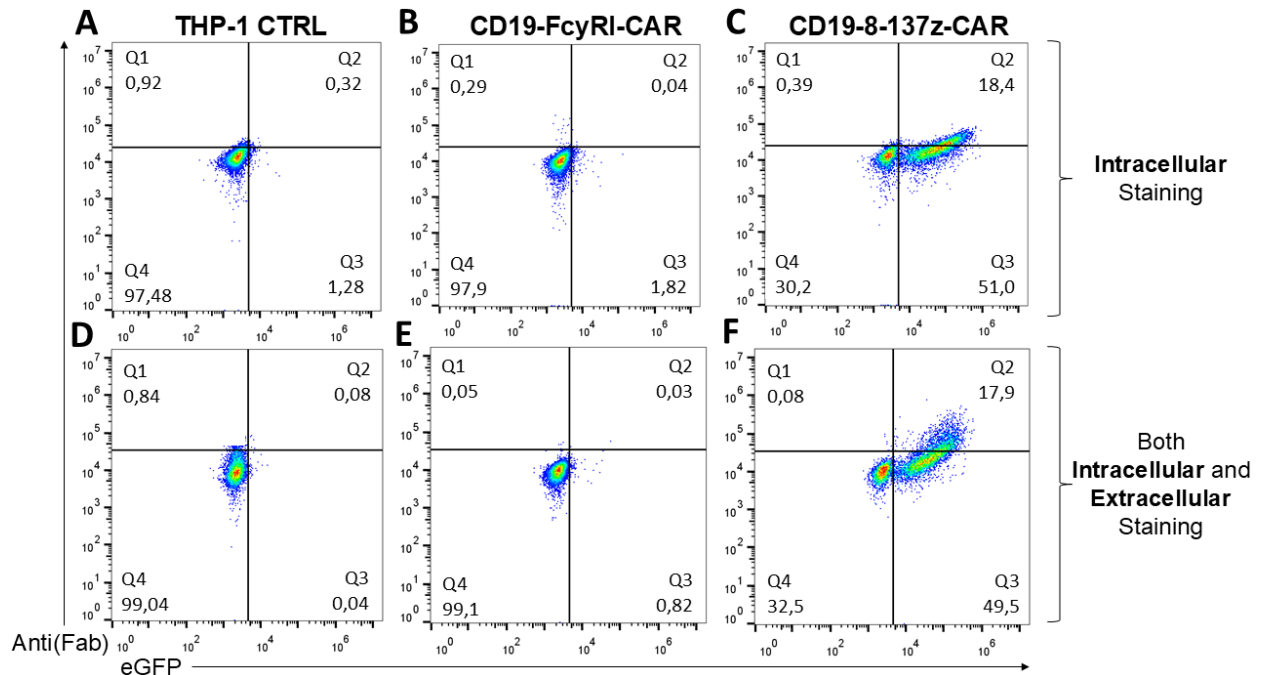


**Legenda: Figura 11 - Avaliação da expressão de CD19-8-137z-CAR ou CD19-FcγRI-CAR na superfície celular de Jurkat modificadas. (A)** Eficiência de transdução em células Jurkat modificadas com o sobrenadante concentrado de partículas lentivirais carreando a sequência codificadora de CD19-8-137z-CAR EGFP+ ou CD19-FcγRI-CAR EGFP-. As células foram marcadas com o Anticorpo Anti(Fab')<sub>2</sub> Jackson ImmunoResearch® para detecção do CAR na superfície celular. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas, com aquisição e análise de 10.000 eventos no citômetro BD Accuri C6. As gates foram realizadas utilizando o software FlowJo Vx.

#### 4.5 Detecção intracelular de CD19-CAR em células THP-1 modificadas

Ainda em continuidade com a avaliação da expressão de CD19-FcγRI-CAR construído a partir de fragmentos clonados, as células THP-1 modificadas foram utilizadas para o ensaio de marcação intracelular com anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment. A variante de CD19-CAR, CD19-FcγRI-CAR, não foi detectada após o protocolo de marcação intracelular nas células THP-1 modificadas (Figura 12B, E). Como controle positivo do processo de marcação extracelular e/ou intracelular, as células THP-1 expressando CD19-8-137z-CAR foram utilizadas e validou a eficácia de detecção do CD19-CAR no espaço intracelular através da metodologia adotada (Figura 12C, F). Portanto, a construção CD19-FcγRI-CAR não foi expressa em células THP-1 e os seguintes motivos são possíveis: (i) reduzido título de partículas lentivirais contendo a sequência codificadora para a expressão do CAR; (ii) a associação da molécula CD8 como hinge com FcγRI na porção transmembrana não propicia a expressão do CAR; (iii) não foi possível gerar células CD19-FcγRI-THP-1-CAR a partir de fragmentos clonados. Diante desse fato, no próximo tópico é descrito um direcionamento para a expressão das variantes de CD19-CAR.

**FIGURA 12 - Marcação intracelular de células THP-1 modificadas para a expressão de CD19-FcγRI-CAR construído a partir de fragmentos clonados ou CD19-8-137z-CAR**

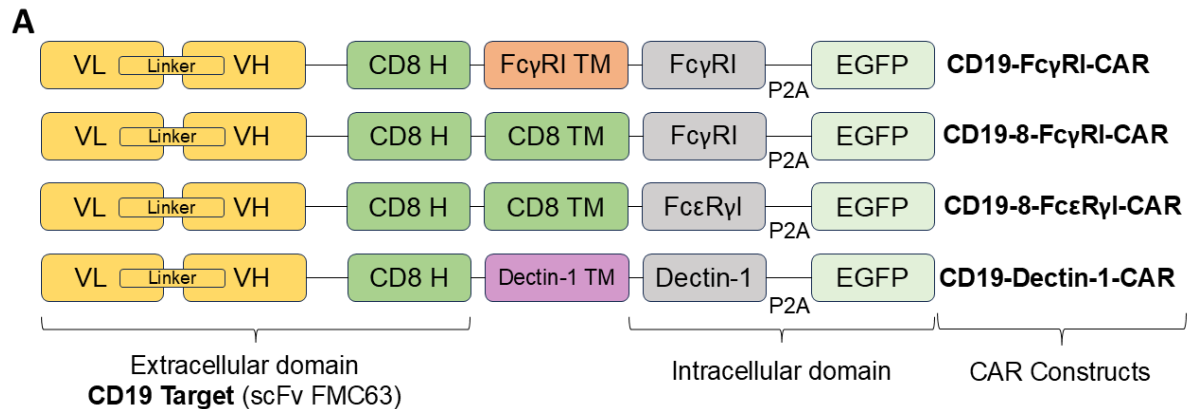


**Legenda: Figura 12 - Marcação intracelular de células THP-1 modificadas para a expressão de CD19-FcγRI-CAR construído a partir de fragmentos clonados ou CD19-8-137z-CAR. (A-F)** Dot plots da citometria de fluxo de células THP-1 CTRL (A, D) ou modificadas para expressarem CD19-FcγRI-CAR (B, E) ou CD19-8-137z-CAR (C, F) através da marcação intracelular (A-C) ou extracelular e intracelular (D-F) do CAR utilizando o anticorpo AffiniPure Anti(Fab') Fragment. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas, com aquisição e análise de 10.000 eventos no citômetro BD Accuri C6. As gates foram realizadas utilizando o software FlowJo Vx.

#### 4.6 Construção de variantes de CD19-CAR com novas modificações nos domínios hinge/transmembrana

Esse conjunto de achados indicam que o domínio hinge e transmembrana do CD19-FcγRI-CAR são as regiões para avaliar a construção de novas variantes para favorecer a expressão do CAR e o ancoramento na superfície celular. Dessa forma, uma nova variante (CD19-8-FcγRI-CAR), contendo a molécula CD8 como domínios hinge e transmembrana, foi delineada e a sequência codificadora foi sintetizada pela empresa Twist. As sequências codificadoras para CD19-FcγRI-CAR, contendo o hinge proveniente da molécula CD8 e FcγRI como a região transmembrana e intracelular, CD19-8-FcεRγI-CAR e CD19-Dectin-1-CAR foram sintetizadas pela empresa Twist. A composição dos domínios das variantes de CD19-CAR geradas a partir de fragmentos sintetizados e subclonados em vetor lentiviral estão representados na Figura 13.

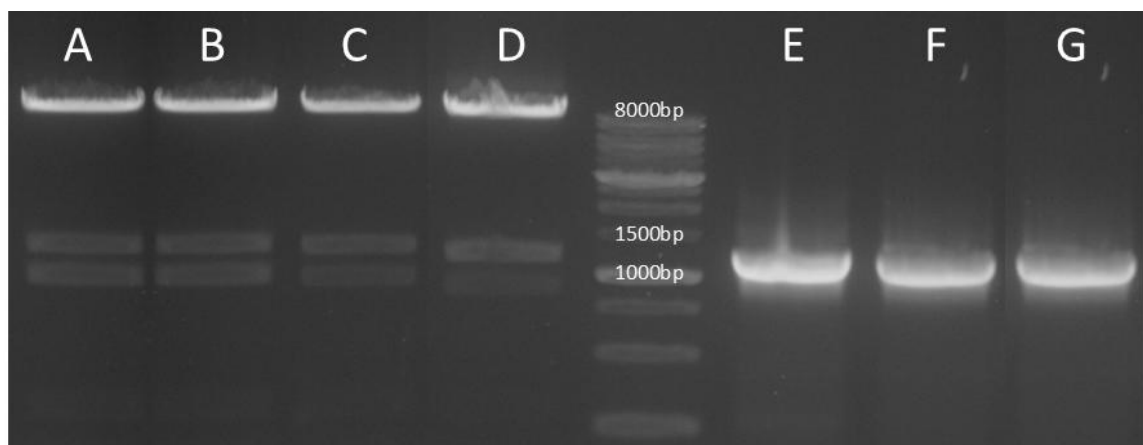
**FIGURA 13 - Representação esquemática da composição dos domínios das variantes de CD19-CAR construídos a partir de fragmentos sintetizados**



**Legenda: Figura 13 - Representação esquemática da composição dos domínios das variantes de CD19-CAR construídos a partir de fragmentos sintetizados. (A)** O domínio de reconhecimento ao antígeno, presente na porção extracelular do CAR, é composto em todos os construtos pelo scFv derivado do anticorpo FMC63 anti-CD19, seguido do domínio hinge oriundo da molécula CD8α humana. O construto CD19-FcyRI-CAR apresenta a molécula FcyRI na composição dos domínios transmembrana e de transdução de sinal, que difere do construto CD19-8-FcyRI-CAR, o qual apresenta o domínio transmembrana oriundo da molécula CD8α humana. O construto CD19-8-FcεRγI-CAR apresenta a molécula CD8 humana como domínio transmembrana e FcεRγI como domínio de transdução de sinal. O construto CD19-Dectin-1-CAR apresenta os domínios transmembrana e de transdução de sinal oriundos da molécula Dectina-1. Todos os construtos possuem EGFP como tag fluorescente, coexpresso com o CAR por meio da sequência P2A e regulados pelo mesmo promotor EF1-α.

Os fragmentos de DNA sintetizados foram subclonados em um backbone de vetor lentiviral EGFP em uso no laboratório (Figura 14). A Figura 14 demonstra a eletroforese de DNA em gel de agarose (1,2%) das variantes de CD19-CAR após subclonagem em vetor lentiviral EGFP, após a digestão com as enzimas de restrição XcmI/BamHI, sendo sítios relacionados com o processo de subclonagem, resultando nos fragmentos de aproximadamente 1.290bp e 895bp (CD19-CAR) e 8.990bp (*backbone* do vetor lentiviral).

**Figura 14 - Validação dos plasmídeos contendo a sequência codificadora das variantes de CD19-CAR construídos a partir de fragmentos sintetizados**

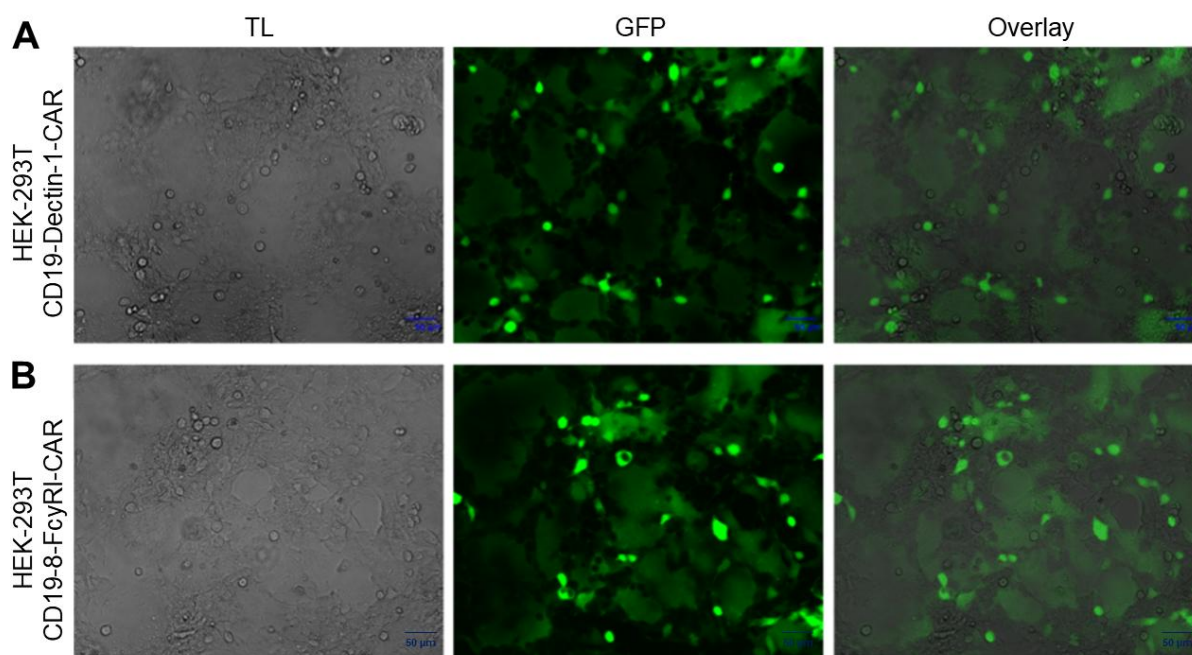


**Legenda: Figura 14 - Validação dos plasmídeos contendo a sequência codificadora das variantes de CD19-CAR construídos a partir de fragmentos sintetizados.** Eletroforese de DNA em gel de agarose a 1,2% das variantes de CD19-CAR após ligação no *backbone* lentiviral EGFP e digestão com XcmI e BamHI, e PCRs para validar os construtos CD19-CAR após ligados no backbone lentiviral. **(A-D)** Os fragmentos inferiores (~1200bp e 895bp) correspondem ao CD19-CAR e o fragmento superior corresponde ao backbone lentiviral (~8900bp), sendo **(A)** CD19-8-FcγRI-CAR, **(B)** CD19-FcγRI-CAR, **(C)** CD19-8-FcεRyl-CAR e **(D)** CD19-Dectin-1-CAR (~1200bp). **(E-G)** Produtos de PCR referentes, respectivamente, ao CD19-8-FcγRI-CAR, CD19-FcγRI-CAR e CD19-8-FcεRyl-CAR amplificados, cada produto de PCR com aproximadamente 1200bp.

#### 4.7 Produção e titulação de partículas lentivirais carreando a sequência codificadora de variantes de CD19-CAR

Os plasmídeos CD19-Dectin-1-CAR, CD19-8-FcγRI-CAR, CD19-FcγRI-CAR e CD19-8-FcεRyl-CAR foram utilizados de forma separada para a produção lentiviral em células HEK-293T. A Figura 15 demonstra as imagens de microscopia de fluorescência das células HEK-293T 48 h após a transfecção com o plasmídeo CD19-Dectin-1-CAR ou CD19-8-FcγRI-CAR, de forma separada, com a detecção de EGFP como reporter nas células HEK transfectadas. A transfecção para as construções CD19-FcγRI-CAR e CD19-8-FcεRyl-CAR apresenta um perfil semelhante ao demonstrado com as construções anteriores (dados não mostrados).

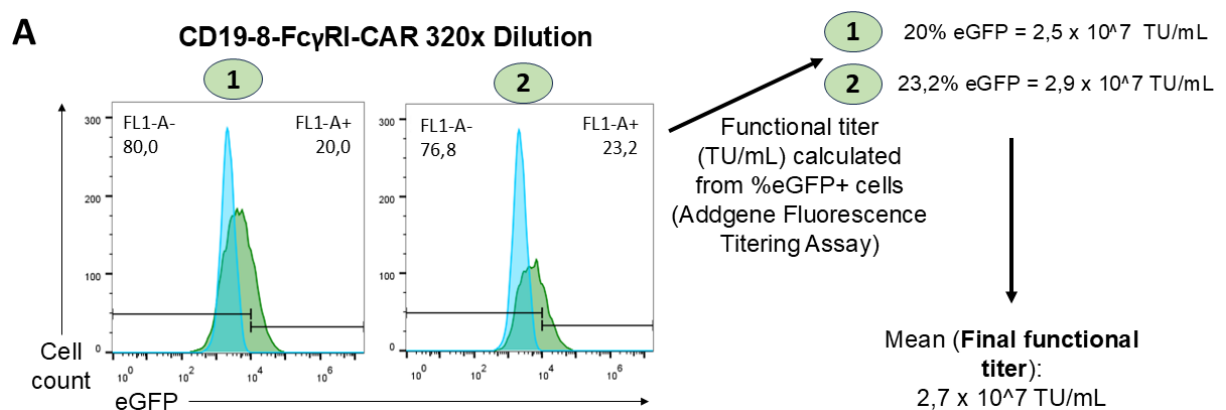
**FIGURA 15 - Microscopia de fluorescência de células HEK-293T CD19-Dectin-1-CAR e CD19-8-FcγRI-CAR**

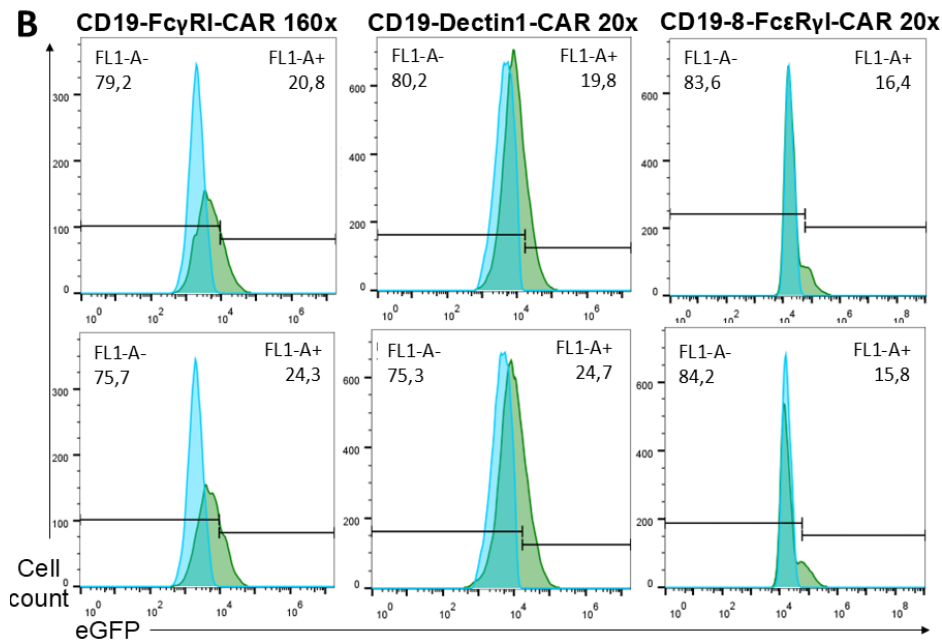


**Legenda: Figura 15 - Microscopia de fluorescência de células HEK-293T CD19-Dectin-1-CAR e CD19-8-FcγRI-CAR.** **(A)** Imagens de microscopia de fluorescência (CelenaS, Logos Byosistemas) de células HEK-293T modificadas para a expressão de CD19-Dectin-1-CAR, com as imagens em campo claro (painéis à esquerda), EGFP (painéis centrais) e Overlay (painéis à direita).

Após a produção de partículas lentivirais contendo as sequências codificadoras dos quatro construtos CD19-CAR avaliados neste estudo, foram realizadas as titulações dos sobrenadantes concentrados de partículas por meio da transdução de células Jurkat. A Figura 16A apresenta a estratégia utilizada para determinação do título final do construto CD19-8-FcγRI-CAR, calculado conforme o protocolo *Fluorescence Titering Assay* da Addgene® (repositório internacional de plasmídeos), que estima o título viral com base na porcentagem de células tag fluorescentes positivas (neste caso, eGFP+) determinada por citometria de fluxo após a transdução. A mesma metodologia foi aplicada aos demais construtos, com base nas porcentagens de eGFP das duplicatas de cada construto (Figura 16B). Dessa forma, os títulos finais obtidos para os construtos CD19-8-FcγRI-CAR, CD19-FcγRI-CAR, CD19-Dectin-1-CAR e CD19-8-FcεRγI-CAR foram de  $2,7 \times 10^7$  TU/mL,  $1,4 \times 10^7$  TU/mL,  $1,7 \times 10^6$  TU/mL e  $1,2 \times 10^6$  TU/mL, respectivamente (Figura 16C). Observou-se que os vetores CD19-Dectin-1-CAR e CD19-8-FcεRγI-CAR apresentaram títulos aproximadamente uma escala logarítmica inferior aos observados para os construtos contendo FcγRI. Apesar disso, os títulos obtidos foram suficientes para viabilizar a etapa subsequente de transdução celular.

**FIGURA 16 - Titulação dos sobrenadantes concentrados de partículas lentivirais dos construtos CD19-CAR em células Jurkat**





**C**

| CAR Construct     | TU/mL             |
|-------------------|-------------------|
| CD19-8-FcγRI-CAR  | $2,7 \times 10^7$ |
| CD19-FcγRI-CAR    | $1,4 \times 10^7$ |
| CD19-Dectin-1-CAR | $1,7 \times 10^6$ |
| CD19-8-FcεRγI-CAR | $1,2 \times 10^6$ |

**Legenda: Figura 16 - Titulação dos sobrenadantes concentrados de partículas lentivirais dos construtos CD19-CAR em células Jurkat. (A)** Estratégia para determinação do título funcional final do construto CD19-8-FcγRI-CAR. Células Jurkat foram transduzidas com diluições seriadas (20x – 640x) do sobrenadante concentrado de partículas lentivirais e a porcentagem de células eGFP<sup>+</sup> foi determinada por citometria de fluxo. O título funcional final (TU/mL) foi calculado a partir da porcentagem de células eGFP<sup>+</sup>, conforme o protocolo *Fluorescence Titering Assay* da Addgene®. Os valores obtidos nas duplicatas foram utilizados para determinação do título final do construto. A mesma estratégia foi aplicada aos demais construtos CD19-CAR, sendo que a porcentagem de eGFP<sup>+</sup> das duplicatas estão representados nos histogramas de citometria de fluxo **(B)**. **(C)** Títulos funcionais dos vetores lentivirais contendo os construtos CD19-8-FcγRI-CAR, CD19-FcγRI-CAR, CD19-Dectin-1-CAR e CD19-8-FcεRγI-CAR, expressos em unidades de transdução por mililitro (TU/mL).

#### 4.8 Geração de células THP-1 modificadas com variantes de CD19-CAR contendo modificações nos domínios hinge e transmembrana

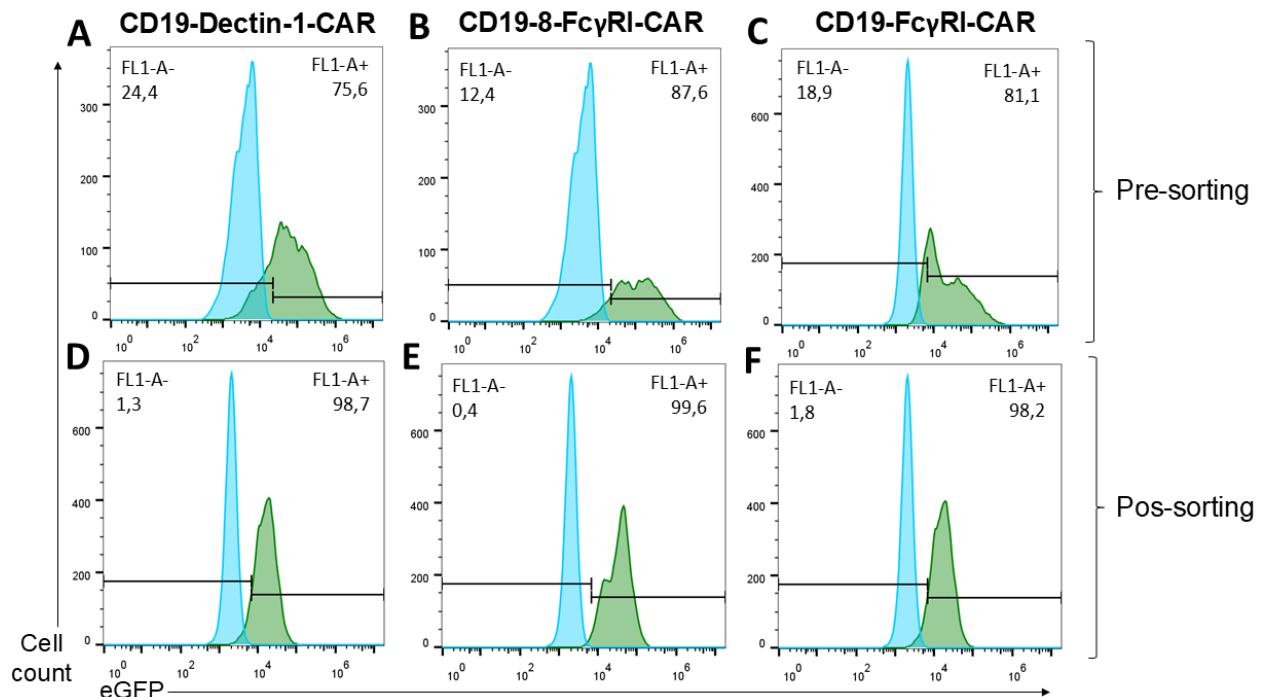
De forma subsequente à obtenção dos títulos funcionais finais do sobrenadante concentrado de partículas lentivirais, células THP-1 foram transduzidas com os construtos CD19-Dectin-1-CAR, CD19-8-FcγRI-CAR e CD19-FcγRI-CAR utilizando MOI de 5. A análise por citometria de fluxo demonstrou eficiências de transdução de 75,6%, 87,6% e 81,1% de células EGFP<sup>+</sup>, respectivamente (Figura 17A–C), evidenciando a geração bem-sucedida das linhagens modificadas. Com o objetivo de obter populações purificadas para os experimentos subsequentes, as células THP-1

modificadas foram submetidas à técnica de *cell sorting* com base na expressão de eGFP. Após a purificação, as populações CD19-Dectin-1-THP-1-CAR, CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR e CD19-FcγRI-THP-1-CAR apresentaram aproximadamente 99% de células eGFP+, confirmando o enriquecimento das linhagens modificadas (Figura 17D–F).

Durante a expansão celular, as linhagens THP-1 modificadas mantiveram características morfológicas compatíveis com as células THP-1 parentais, incluindo a formação de agrupamentos celulares típicos da linhagem, particularmente evidentes nas células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR. Adicionalmente, não foram observadas alterações aparentes na viabilidade celular ou no potencial de expansão em cultura após a expressão dos diferentes construtos CAR. Essas características permitiram o estabelecimento e a criopreservação das linhagens de células THP-1 CD19-CAR para utilização nos experimentos subsequentes.

As células THP-1 foram modificadas com a construção CD19-8-FcεRγI-CAR que resultou em reduzida taxa de transdução, e o enriquecimento com a técnica de cell sorting resultou em elevada taxa de células THP-1-CAR. No entanto, a população celular enriquecida apresentou uma expansão reduzida associada à uma redução na viabilidade celular, fato que inviabilizou a manutenção das células expressando CD19-8-FcεRγI-CAR. Um novo processo de modificação das células THP-1 e enriquecimento está em andamento.

**FIGURA 17 - Geração de células THP-1 modificadas para expressão das variantes de CD19-CAR contendo modificações nos domínios hinge e transmembrana**



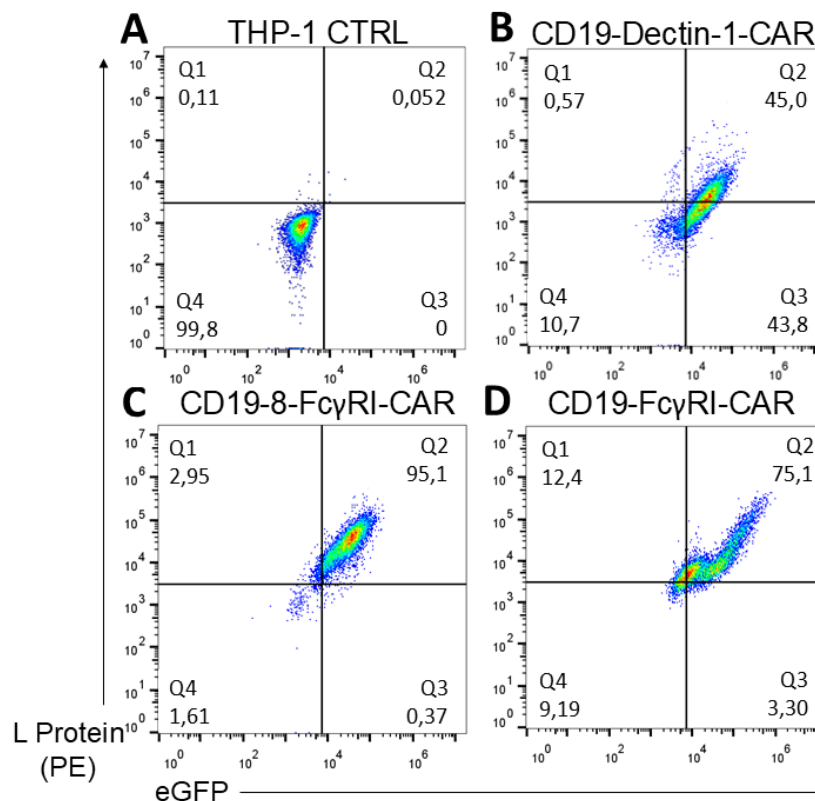
**Legenda: Figura 17 - Geração de células THP-1 modificadas para expressão das variantes de CD19-CAR contendo modificações nos domínios hinge e transmembrana.** Células THP-1 foram transduzidas com o sobrenadante concentrado de partículas lentivirais contendo as sequências codificadoras dos construtos CD19-Dectin-1-CAR, CD19-8-FcγRI-CAR e CD19-FcγRI-CAR utilizando MOI de 5. **(A–F)** Histogramas da eficiência de transdução das populações celulares antes **(A–C)** e após **(D–F)** a purificação celular pela técnica de *cell sorting* de células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR, CD19-8-FcγRI-THP1-CAR e CD19-FcγRI-THP-1-CAR. Os histogramas em azul representam células THP-1 não modificadas (controle negativo), enquanto os histogramas em verde representam as células THP-1 transduzidas com os respectivos construtos CD19-CAR. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas, com aquisição e análise de 10.000 eventos no citômetro BD Accuri C6. As gates foram realizadas utilizando o software FlowJo Vx.

#### 4.9 Detecção de variantes de CD19-CAR na superfície de células THP-1 modificadas

Após a geração e purificação das linhagens de células THP-1 modificadas, procedeu-se com a avaliação da expressão das variantes de CD19-CAR na superfície celular. Para isso, as células foram marcadas com Proteína-L conjugada com biotina (Protein-L-biotina) e revelado com streptavidina-ficoeritrina (strep-PE). Proteína-L reconhece especificamente a região variável de cadeias leves de imunoglobulinas presentes no domínio scFv dos construtos CD19-CAR, permitindo a detecção da expressão do receptor na superfície celular por citometria de fluxo. A análise das populações duplo positivas para EGFP e Proteína L-PE confirmou a expressão na superfície celular referentes às construções avaliadas (Figura 18A-D). A suspensão celular expressando CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR apresentou a maior porcentagem de células positivas para Proteína-L, atingindo aproximadamente 95% de células com

expressão do CAR na superfície (Figura 18C). A população de células CD19-FcγRI-THP-1-CAR apresentou uma taxa de 75,1% de células positivas para Proteína-L (Figura 18D), enquanto 45% de células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR apresentou a expressão do CAR na membrana plasmática (Figura 18B). Assim sendo, os vetores lentivirais carreando as variantes de CD19-CAR promoveram a expressão estável de CD19-CAR na superfície de células THP-1, mesmo em diferentes taxas de expressão. Esta etapa de detecção do CAR na superfície celular é essencial para o reconhecimento do antígeno-alvo e para a avaliação funcional subsequente das células THP-1 modificadas. A validação da taxa de expressão das variantes de CD19-CAR na superfície celular será realizada através de anticorpo monoclonal anti-linker (região entre VL e VH do scFv), que garante melhor taxa de interação antígeno-anticorpo e valida o CD19-CAR na superfície celular.

**FIGURA 18 - Detecção de variantes de CD19-CAR na superfície de células THP-1 modificadas através do reconhecimento de Proteína-L**



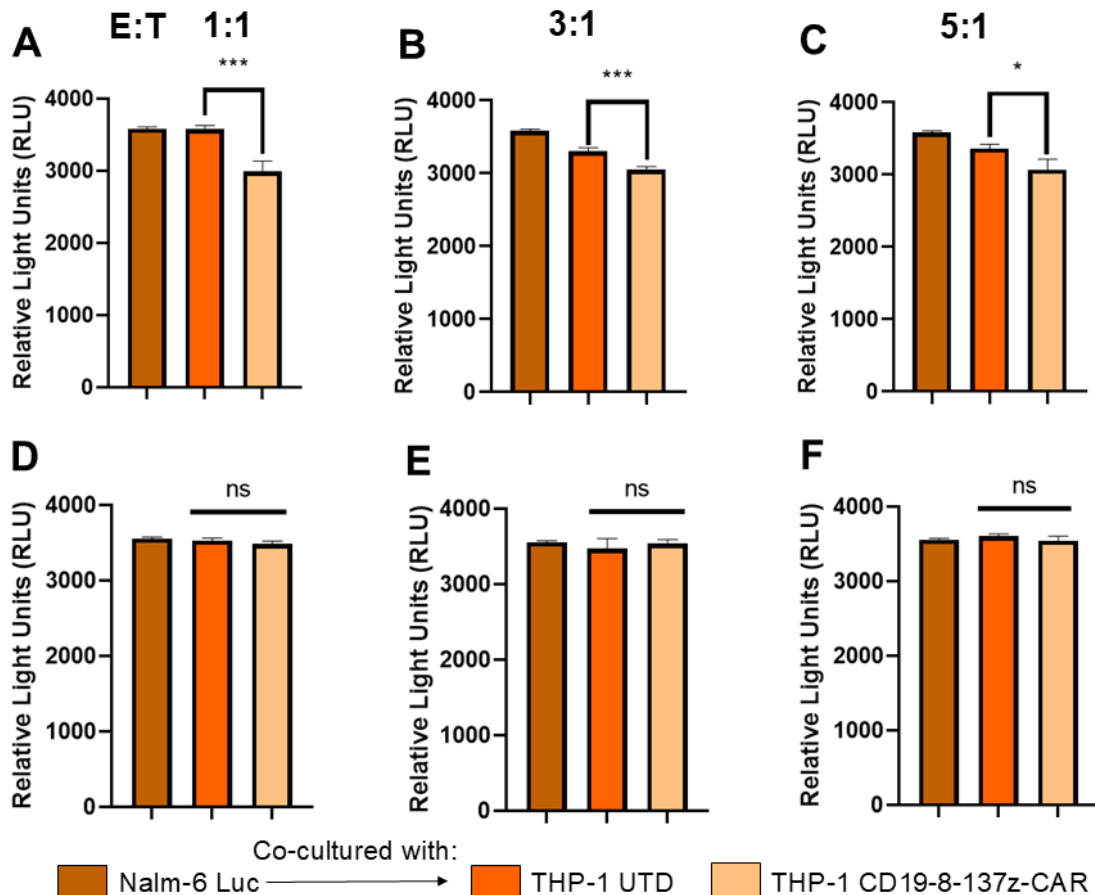
**Legenda: Figura 18 - Detecção de variantes de CD19-CAR na superfície de células THP-1 modificadas através do reconhecimento de Proteína-L.** As células THP-1 foram marcadas com Proteína L conjugada com PE e analisadas por citometria de fluxo. **(A-D)** Dot plots da citometria de fluxo de células THP-1 não modificadas **(A)**, CD19-Dectin-1-THP-1-CAR **(B)**, CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR **(C)** e CD19-FcγRI-THP-1-CAR **(D)**. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas, com

aquisição e análise de 10.000 eventos no citômetro CytoFLEX Beckman Coulter®. As gates foram realizadas utilizando o software FlowJo Vx.

#### **4.10 Avaliação do potencial antitumoral de células THP-1 expressando CD19-CAR contra linhagens de células B neoplásicas**

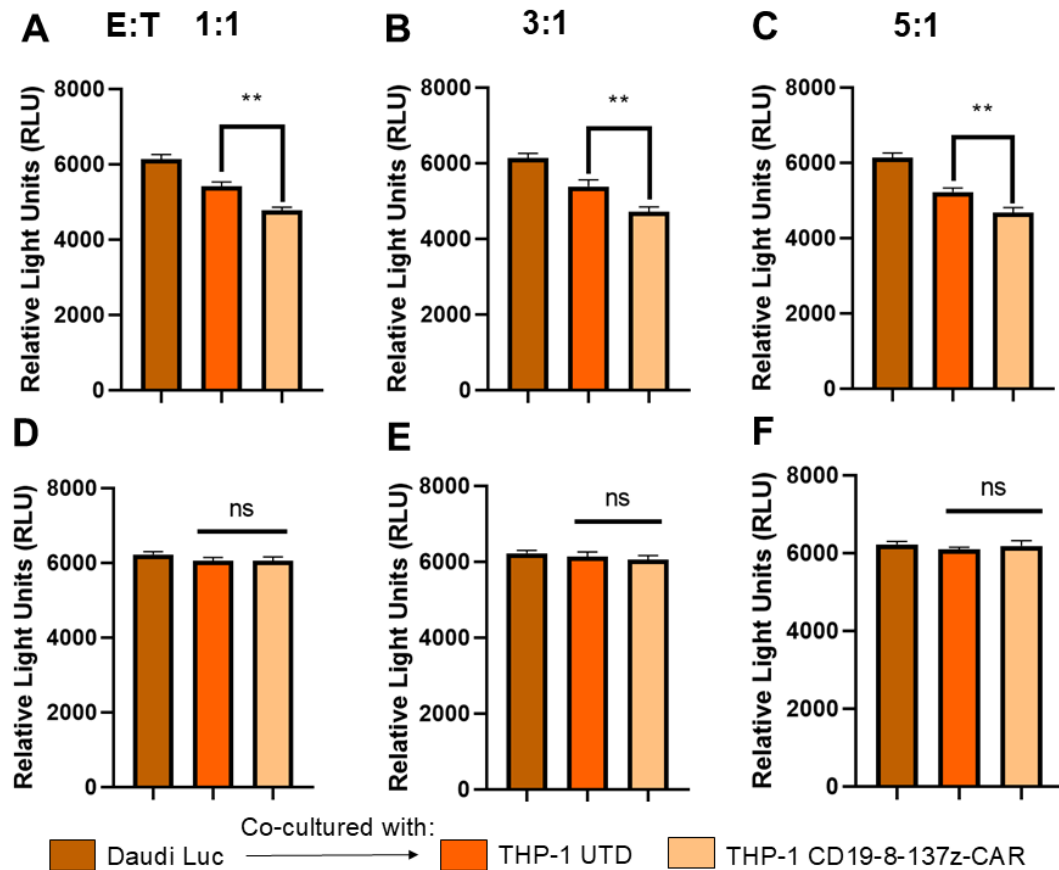
Primeiramente, a padronização dos ensaios funcionais utilizando células CD19-8-137z-THP-1-CAR foi realizada, sendo que este construto possui como alvo o CD19, assim como os 4 construtos testados no presente trabalho. No entanto, CD19-8-137z não possui moléculas coestimulatórias clássicas de ativação de monócitos/macrófagos, pois CD137 acoplado com CD3 $\zeta$  induzir alta taxa de ativação de células T. Dessa forma, a utilização dessas células serviu como um dos controles de células THP-1 modificadas do presente trabalho, e ressalta-se que será incluído o controle de células THP-1-Mock, que foi modificada com o vetor lentiviral EGFP+ vazio. A plataforma experimental destes ensaios funcionais teve como base a expressão de luciferase em linhagens de células B neoplásicas, como as células Nalm-6 Luc e Daudi Luc. Nessa plataforma, a viabilidade das células B neoplásicas é proporcional a taxa de luminescência (RLU, *Relative Light Units*), pois essas células emitem luz proveniente da oxidação do substrato pela luciferase, seguido pela mensuração pelo luminômetro. As células CD19-8-137z-THP-1-CAR induziram uma diminuição significativa da viabilidade de células Nalm-6 Luc (Figura 19) e Daudi Luc (Figura 20) nas proporções E:T (Effector:Target) 1:1 (Figura 19A; Figura 20A), 3:1 (Figura 19B; Figura 20B) e 5:1 (Figura 19C; Figura 20C) em 6 horas de co-cultivo quando comparadas com células THP-1 não transduzidas (UTD, *Untransduced*). O mesmo efeito não foi observado em 24 horas em nenhuma das proporções E:T testadas (Figura 19D-F; Figura 20D-F).

#### **FIGURA 19 - Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-8-137z-THP-1-CAR contra células Nalm-6 Luc**



**Legenda: Figura 19 - Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-8-137z-THP-1-CAR contra células Nalm-6 Luc.** As células CD19-8-137z-THP-1-CAR ou THP-1 não transduzidas (UTD) foram co-cultivadas separadamente com células Nalm-6 Luc nas proporções E:T 1:1, 3:1 e 5:1 por 6 e 24 horas e analisadas em luminômetro Synergy Biotek® após adição do substrato D-Luciferina (100 µg/mL – 30min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Os dados foram expressos em Unidades Relativas de Luz (RLU). (A-F) Gráficos do RLU obtido de células Nalm-6 Luc e co-cultivadas por 6 (A-C) ou 24 horas (D-F) com células THP-1 UTD ou CD19-8-137z-THP-1-CAR nas proporções E:T 1:1 (A, D), 3:1 (B, E) e 5:1 (C, F). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism V8, utilizando o teste One-way ANOVA e sendo consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

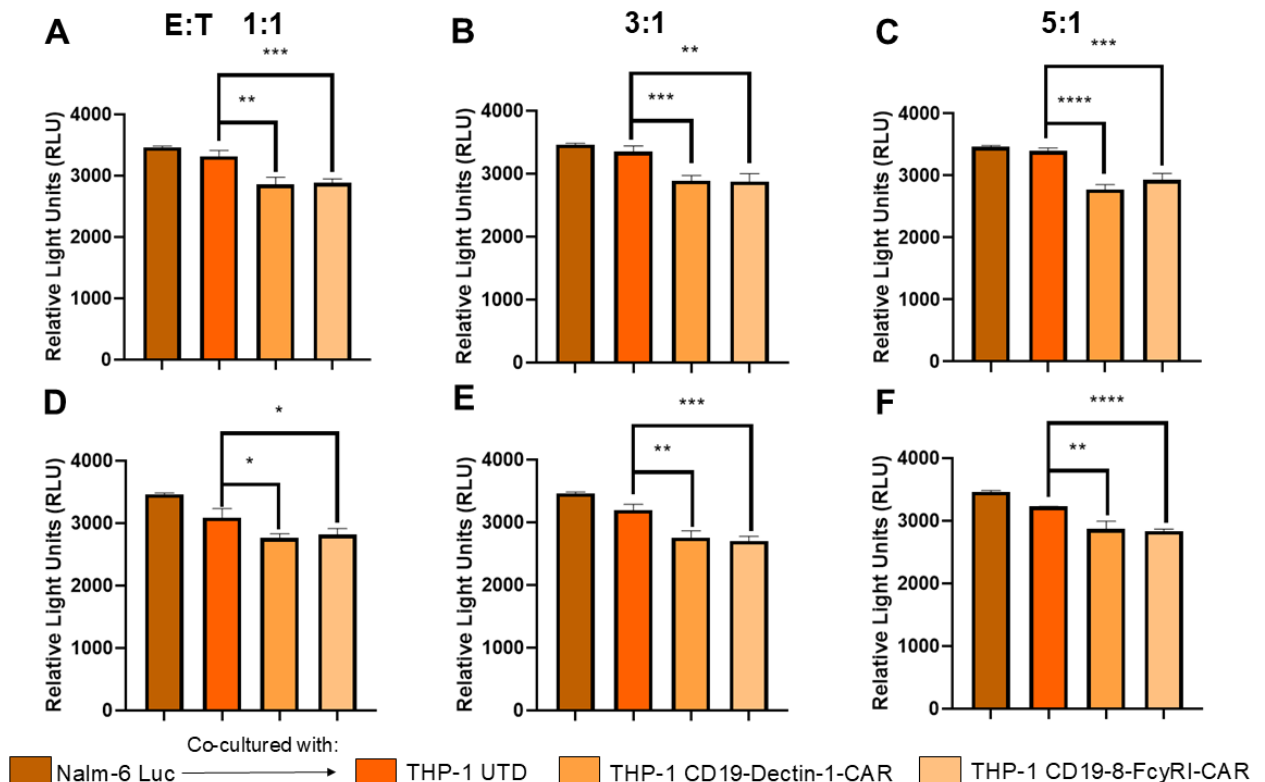
**FIGURA 20 - Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-8-137z-THP-1-CAR contra células Daudi Luc**



**Legenda: Figura 20 - Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-8-137z-THP-1-CAR contra células Daudi Luc.** As células CD19-8-137z-THP-1-CAR ou THP-1 não transduzidas (UTD) foram co-cultivadas separadamente com células Daudi Luc nas proporções E:T 1:1, 3:1 e 5:1 por 6 e 24 horas e analisadas em luminômetro Synergy Biotek® após adição do substrato D-Luciferina (100 µg/mL – 30min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Os dados foram expressos em Unidades Relativas de Luz (RLU). (A-F) Gráficos do RLU obtido de células Daudi Luc e co-cultivadas por 6 (A-C) ou 24 horas (D-F) com células THP-1 UTD ou CD19-8-137z-THP-1-CAR nas proporções E:T 1:1 (A, D), 3:1 (B, E) e 5:1 (C, F). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism V8, utilizando o teste One-way ANOVA e sendo consideradas estatisticamente significativas quando p<0,05.

Após a padronização do ensaio de citotoxicidade utilizando células B neoplásicas expressando luciferase em co-cultivo com células CD19-8-137z-THP-1-CAR, os ensaios funcionais utilizando as células THP-1 expressando separadamente as variantes de CD19-CAR foram realizados. As células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR induziram uma redução significativa da viabilidade de células Nalm-6 Luc (Figura 21) nas proporções E:T 1:1 (Figura 21A, D), 3:1 (Figura 21B, E) e 5:1 (Figura 21C, F) em 6 horas (Figura 21A-C) e 24 horas (Figura 21D-F) de co-cultivo, comparado com as células THP-1 não transduzidas. Ressalta-se que as células CD19-FcγRI-THP-1-CAR estão nesta etapa de avaliação do potencial citotóxico por meio da plataforma luciferase+, e que as células CD19-8-FcεRγI-THP-1-CAR, após geradas e purificadas, também passarão por esta etapa.

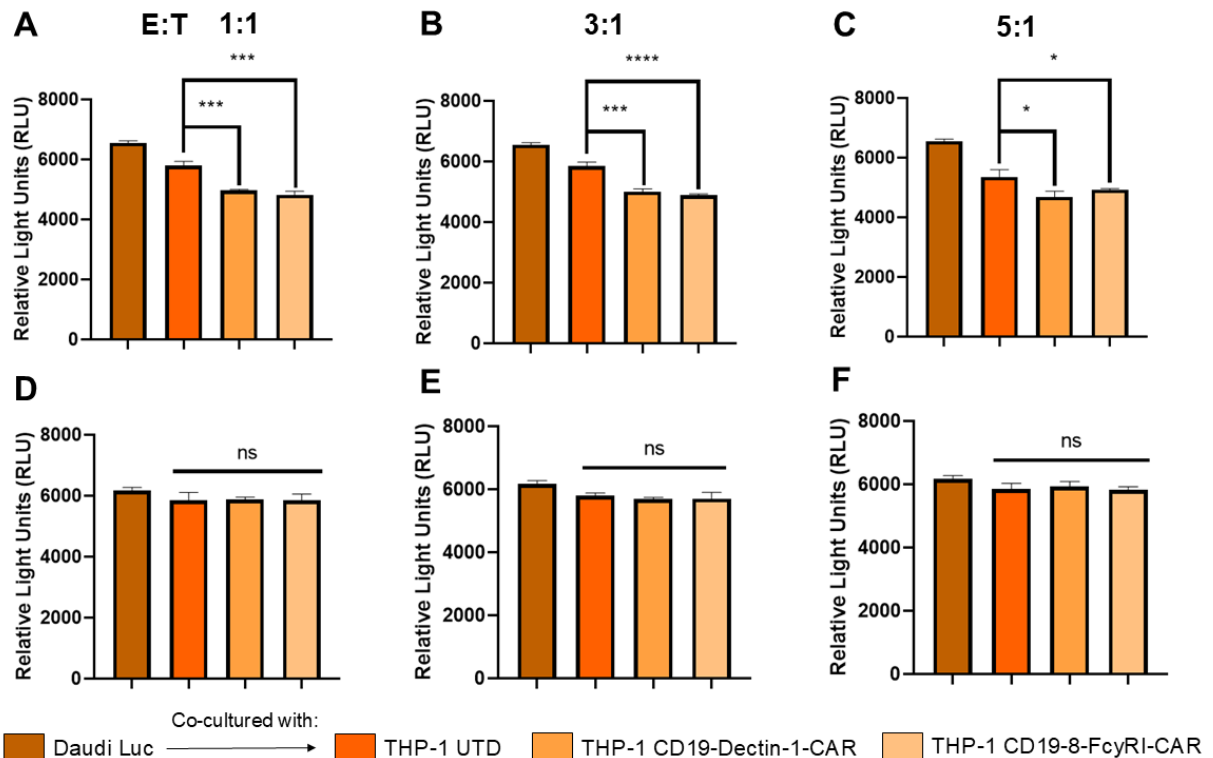
**FIGURA 21 - Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcyRI-THP-1-CAR frente a células Nalm-6 Luc**



**Legenda: Figura 21 - Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcyRI-THP-1-CAR frente a células Nalm-6 Luc.** As células CD19-THP-1-CAR ou THP-1 não transduzidas (UTD) foram co-cultivadas separadamente com células Nalm-6 Luc nas proporções E:T 1:1, 3:1 e 5:1 por 6 e 24 horas e analisadas em luminômetro Synergy Biotek® após adição do substrato D-Luciferina (100 µg/mL – 30min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Os dados foram expressos em Unidades Relativas de Luz (RLU). **(A-F)** Gráficos do RLU obtido de células Nalm-6 Luc e co-cultivadas por 6 **(A-C)** ou 24 horas **(D-F)** com células THP-1 UTD, CD19-Dectin-1-THP-1-CAR ou CD19-8-FcyRI-THP-1-CAR nas proporções E:T 1:1 **(A, D)**, 3:1 **(B, E)** e 5:1 **(C, F)**. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism V8, utilizando o teste One-way ANOVA e sendo consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

Quanto ao ensaio funcional contra células Daudi Luc (Figura 22), as células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcyRI-THP-1-CAR reduziram de forma significativa a viabilidade das células-alvo nas proporções E:T 1:1 (Figura 22A), 3:1 (Figura 22B) e 5:1 (Figura 22C) em 6 horas de co-cultivo, quando comparadas com células THP-1 não transduzidas. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre células THP-1-CAR e células THP-1 não transduzidas frente as células Daudi Luc em 24 horas de co-cultivo (Figura 22D-F).

**FIGURA 22 - Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcyRI-THP-1-CAR frente a células Daudi Luc**



**Legenda: Figura 22 - Avaliação do potencial citotóxico de células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR frente a células Daudi Luc.** As células CD19-THP-1-CAR ou THP-1 não transduzidas (UTD) foram co-cultivadas separadamente com células Daudi Luc nas proporções E:T 1:1, 3:1 e 5:1 por 6 e 24 horas e analisadas em luminômetro Synergy Biotek® após adição do substrato D-Luciferina (100 µg/mL – 30min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Os dados foram expressos em Unidades Relativas de Luz (RLU). (A-F) Gráficos do RLU obtido de células Daudi Luc e co-cultivadas por 6 (A-C) ou 24 horas (D-F) com células THP-1 UTD, CD19-Dectin-1-THP-1-CAR ou CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR nas proporções E:T 1:1 (A, D), 3:1 (B, E) e 5:1 (C, F). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism V8, utilizando o teste One-way ANOVA e sendo consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.11 Avaliação da produção de TNF-α no sobrenadante do co-cultivo de células CD19-THP-1-CAR frente as linhagens de células B neoplásicas

A produção de TNF-α pelas células THP-1 não modificadas, CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR foi determinada no sobrenadante do cocultivo com as linhagens de células B neoplásicas Nalm-6 e Daudi através da técnica de ELISA. Entretanto, as células THP-1 modificadas ou não com CAR apresentaram níveis de TNF-α sem alterações significativas entre os grupos nas condições na presença ou ausência das células alvo. Cabe destacar que os ensaios foram realizados utilizando células THP-1 não diferenciadas em macrófago-like. Considerando que a diferenciação dessas células em um fenótipo semelhante ao de macrófagos está associada ao aumento da capacidade secretora e à amplificação de respostas inflamatórias, e a ausência de TNF-α detectável pode estar relacionada ao estado de diferenciação celular adotado neste experimento. Dessa forma, os

resultados sugerem que a expressão dos construtos CD19-CAR em células THP-1 não diferenciadas não promoveu produção mensurável de TNF- $\alpha$  frente às células Nalm-6 ou Daudi nas condições avaliadas.

As células THP-1 modificadas com as variantes de CD19-CAR seguem em ensaios experimentais para o processo de diferenciação em macrófagos para determinar a atividade citotóxica contra as células Nalm-6 e Daudi.

## 5. DISCUSSÃO

A utilização de linhagens de células B neoplásicas expressando luciferase representa uma plataforma amplamente consolidada para a avaliação pré-clínica da atividade citotóxica de imunoterapias baseadas em receptores antigênicos quiméricos, especialmente na terapia celular com CAR específica para células B neoplásicas através do reconhecimento de CD19. No presente estudo, as linhagens Nalm-6-Luc e Daudi-Luc são modelos de células alvo para a análise funcional de células CD19-CAR, alinhando-se a modelos experimentais extensivamente utilizados no desenvolvimento de terapias celulares para neoplasias de células B (Edinger *et al.*, 2002; Maude *et al.*, 2014). Nesse sentido, a expressão estável de luciferase permite uma quantificação sensível e específica da viabilidade das células alvo, e a redução do sinal de luminescência é proporcional à eliminação tumoral em ensaios *in vitro*. Essa abordagem é amplamente empregada em estudos com CAR-T anti-CD19 e configura como um método robusto para a avaliação funcional da eficácia antitumoral (Sadelain *et al.*, 2017; Kiesgen *et al.*, 2021). As linhagens celulares Nalm-6 e Daudi, expressando luciferase, constituem modelos altamente relevantes para estudos *in vivo*, e a bioluminescência possibilita o monitoramento temporal da carga tumoral associado com a eficácia da terapia celular no controle da progressão das células neoplásicas (Edinger *et al.*, 2002; Merle *et al.*, 2026). No contexto da pesquisa translacional, células tumorais luciferase-positivas atuam na validação do efeito da terapia celular ao transpor os achados laboratoriais observados em modelos *in vitro* para estudos pré-clínicos. Essa estratégia experimental alicerçou o avanço das terapias CAR-T e viabilizam o avanço nos estudos pré-clínicos com células NK e macrófagos expressando CAR (June *et al.*, 2018; Cohen *et al.*, 2017).

No cenário da avaliação terapêutica de células CD19-CAR derivadas de macrófagos, as células B neoplásicas luciferase-positivas como alvo propiciam a determinação do efeito da terapia celular na indução de morte celular e indiretamente no aumento da fagocitose com reflexo na contenção tumoral, de forma sensível e específica através da mensuração de luminescência. Estudos recentes demonstram que modelos baseados em bioluminescência são adequados para capturar a atividade antitumoral de CAR-macrófagos em estudos *in vitro* e *in vivo*, reforçando a relevância dessa plataforma para abordagens terapêuticas emergentes (Klichinsky *et al.*, 2020; Alrehaili *et al.*, 2025). Portanto, os esforços do presente estudo em gerar as linhagens

Nalm-6-Luc e Daudi-Luc para utilizar os ensaios de bioluminescência como plataforma da atividade citotóxica e fagocítica de CAR-macrófagos permite maior robustez aos dados e estabelece uma ponte natural e racional para futuros estudos em modelos *in vivo*.

A geração de populações estáveis de células B neoplásicas expressando EGFP representa uma estratégia complementar e altamente relevante para o presente estudo, pois a capacidade de CAR-macrófagos em reconhecer as células B e a cinética para tal evento são pré-requisitos na caracterização funcional do CAR nesse tipo celular. Esse tipo de abordagem é amplamente descrito na literatura como essencial para a análise confiável de interações célula–célula, especialmente quando o objetivo é avaliar mecanismos efetores dependentes de contato físico, como fagocitose e morte celular mediada por macrófagos (Weiskopf *et al.*, 2013; Morrissey *et al.*, 2018; Bak *et al.*, 2017; Klichinsky *et al.*, 2020). Com isso, no presente estudo as linhagens Nalm-6-EGFP e Daudi-EGFP foram geradas e estão aptas para ensaios *in vitro* na presença de CAR-macrófagos. Tendo em vista o fácil manuseio das células Nalm-6 e Daudi para a modificação com tag fluorescente, essas células serão modificadas com mCherry para ampliar a combinação de espectros de fluorescência em ensaios que exijam CAR-macrófagos marcados com EGFP. Importante ressaltar que o presente estudo deparou com obstáculos intrínsecos às células Raji no processo de modificação com EGFP, e as características inerentes à linhagem referentes à taxa de proliferação, sensibilidade ao estresse celular e resposta à transdução lentiviral inviabilizaram o estabelecimento das células Raji-EGFP nas condições do laboratório. Os obstáculos na modificação de linhagens B neoplásicas são aspectos já descritos na literatura (Shah *et al.*, 2020).

A geração de monócitos derivados da linhagem THP-1 expressando variantes de CD19-CAR representa uma etapa central para a investigação funcional de terapia celular avançada baseadas em células apresentadoras de antígenos. A proposta de utilizar células THP-1 modificadas com vetor lentiviral vazio, contendo somente a sequência codificadora de EGFP, viabilizou a geração da linhagem THP-1-Mock que fortalece as inferências sobre os efeitos atribuídos à modificação genética com lentivírus em comparação com a atividade desencadeada de forma específica pelo CAR (Klichinsky *et al.*, 2020; Morrissey *et al.*, 2018). A facilidade no manuseio e modificação demonstrados na geração das células THP-1-Mock evidencia uma plataforma celular importante para a expressão das variantes de CD19-CAR em

monócitos e, com a possibilidade de diferenciar em macrófagos, através da transdução com lentivírus. Isso reforça a adequação da linhagem THP-1 como modelo experimental para estudos de CAR-Macrófagos. Ainda na construção de ferramentas que suportem as conclusões experimentais oriundas da atividade de células THP-1 expressando as variantes de CD19-CAR contendo Dectina-1 ou receptores Fc como domínios de ativação, o presente estudo gerou células THP-1 expressando CD19-8-CD137 $\zeta$ -CAR que é a estrutura licenciada para a aplicação clínica. As células THP-1 modificadas com CD19-8-137z-CAR, inicialmente, apresentaram uma fração significativa da população com a presença do CAR na superfície celular através da detecção do domínio extracelular do CD19-CAR pelo anticorpo AffiniPure® F(ab')<sub>2</sub> Fragment. Esses dados reforçam a viabilidade da plataforma lentiviral e da arquitetura do CAR para expressão funcional em células THP-1, e essas células atuam como controle para avaliar a taxa de expressão e níveis de ativação induzidos pelas variantes de CD19-CAR ao considerar o impacto dos domínios extracelular e intracelular das diferentes construções. Um estudo demonstrou que CARs contendo o domínio CD3 $\zeta$  podem desencadear fagocitose em macrófagos, em um processo que depende de mecanismos intracelulares semelhantes aos envolvidos na fagocitose mediada por FcR (ADCP) — incluindo dependência de Syk e reorganização de actina — mesmo em células THP-1 modificadas com CD19-137 $\zeta$ , em oposição a CARs truncados ou controles não transduzidos. Isso sugere que domínios tipo  $\zeta$  (como CD3 $\zeta$ /137 $\zeta$ ) são funcionalmente competentes para ativar macrófagos CAR (Klichinsky *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2024; Hong *et al.*, 2026).

A arquitetura estrutural de um receptor antigênico quimérico não é limitada ao domínio de reconhecimento antigênico e ao domínio de sinalização intracelular, mas inclui os domínios *hinge* e transmembrana, que desempenham papéis cruciais na expressão estável e funcional do receptor na superfície da célula efetora. Estudos em modelos de CAR-T demonstram que o domínio transmembrana é determinante para a estabilidade e a taxa de expressão de CAR na membrana celular, e esse impacto na expressão do CAR é frequentemente comparado ao possível efeito do domínio *hinge* (CD4, CD8 $\alpha$ , CD28) na expressão do receptor (Fujiwara *et al.*, 2020). No caso de CAR-macrófagos que incorporam domínios derivados de receptores Fc, como Fc $\gamma$ RI, os estudos ainda não abordaram de forma sistemática o impacto da utilização de Fc $\gamma$ RI como domínio transmembrana em comparação aos domínios tradicionalmente empregados em plataformas CAR (como CD8 $\alpha$ , CD28, IgG1 e IgG4).

Entretanto, trabalhos prévios reforçam que domínios transmembrana convencionais são frequentemente selecionados por promoverem maior estabilidade estrutural do receptor, adequada expressão de superfície e menor propensão à formação de complexos indesejados com proteínas endógenas (Guedan *et al.*, 2018; Hudecek *et al.*, 2015).

Inicialmente, o presente estudo buscou gerar os construtos CD19-FcγRI-CAR e CD19-8-FcεRγI-CAR por técnicas convencionais de clonagem molecular. Embora a construção CD19-FcγRI-CAR tenha sido obtida com sucesso, sua expressão não foi detectada em células THP-1 ou Jurkat após transdução lentiviral. Adicionalmente, a obtenção do construto CD19-8-FcεRγI-CAR por clonagem convencional não foi bem-sucedida. Curiosamente, quando o construto CD19-FcγRI-CAR foi adquirido posteriormente por síntese gênica comercial contendo a mesma sequência codificadora planejada originalmente, observou-se expressão eficiente do receptor em células THP-1. Esse achado sugere que a ausência inicial de expressão pode estar relacionada com possíveis eventos ocorridos durante as etapas de clonagem, montagem molecular ou produção do vetor, ou ainda, relacionada à composição estrutural do CAR. Estudos de engenharia genética demonstram que pequenas alterações introduzidas durante procedimentos de amplificação e clonagem podem comprometer a estabilidade, a tradução ou o tráfego intracelular de proteínas recombinantes, mesmo quando não são imediatamente detectadas durante as etapas iniciais de validação molecular (Goodman *et al.*, 2013; Ghassemi *et al.*, 2018).

Dessa forma, os resultados obtidos redirecionaram o foco do presente trabalho para a avaliação funcional dos construtos obtidos a partir de fragmentos sintetizados, permitindo investigar de forma confiável a influência dos domínios FcγRI, FcεRγI e Dectina-1 sobre a expressão e a atividade biológica dos receptores CD19-CAR. Nesse contexto, o presente estudo buscou elucidar as diferenças entre receptores contendo domínio transmembrana proveniente de CD8α ou FcγRI, bem como avaliar o impacto de distintos domínios intracelulares associados à ativação de sinalização mieloide sobre funções efetoras relevantes, incluindo citotoxicidade e fagocitose.

A obtenção de títulos lentivirais funcionais adequados representa uma etapa fundamental para a geração eficiente de células modificadas geneticamente, uma vez que a quantidade de partículas infecciosas disponíveis influencia diretamente a eficiência de transdução e a viabilidade das etapas subsequentes de expansão celular (Milone; O'doherty, 2018; Levine *et al.*, 2017). No presente estudo, todos os construtos

avaliados apresentaram títulos compatíveis com a utilização em experimentos de transdução, demonstrando que as estratégias de produção, concentração e quantificação viral empregadas foram capazes de gerar vetores lentivirais funcionais. Entretanto, observou-se uma diferença expressiva entre os títulos obtidos para os diferentes construtos. Embora diferenças dessa magnitude possam estar associadas às características intrínsecas do transgene, os resultados subsequentes de transdução e expressão dos receptores em células THP-1 sugerem que os menores títulos observados para os construtos CD19-Dectin-1-CAR e CD19-8-Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I-CAR podem estar relacionados a variações técnicas ocorridas durante as etapas de produção lentiviral por transfecção em células HEK ou concentração das partículas lentivirais. Dessa forma, novas produções lentivirais serão realizadas com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos resultados e, se necessário, obter preparações com títulos mais elevados. Apesar dos menores títulos obtidos, os valores observados não comprometeram a etapa subsequente de transdução, permitindo a geração eficiente de células THP-1 modificadas para os experimentos realizados neste estudo. Esse achado demonstra que, embora diferenças quantitativas na produção viral possam existir entre distintas arquiteturas de CAR, tais variações não necessariamente constituem um fator limitante para a obtenção de populações celulares geneticamente modificadas quando protocolos adequados de produção e concentração lentiviral são empregados.

A geração eficiente de células THP-1 geneticamente modificadas constitui uma etapa crítica no desenvolvimento de plataformas baseadas em CAR-Macrófagos. No presente estudo, as elevadas taxas de transdução observadas para os construtos CD19-Dectin-1-CAR, CD19-8-Fc $\gamma$ RI-CAR e CD19-Fc $\gamma$ RI-CAR (75,6%, 87,6% e 81,1%, respectivamente) demonstram a facilidade de modificação genética da linhagem THP-1 mediada por plataformas lentivirais. A utilização de vetores lentivirais tem sido amplamente empregada na geração de células CAR devido à capacidade de promover integração estável do transgene, expressão sustentada e elevada eficiência de transdução em diferentes tipos celulares, incluindo monócitos e macrófagos (Milone; O'doherty, 2018; Levine *et al.*, 2017). Interessantemente, mesmo o construto CD19-Dectin-1-CAR, que apresentou baixo título lentiviral, foi capaz de gerar uma população celular altamente transduzida, indicando que os valores obtidos foram suficientes para a modificação eficiente das células THP-1.

As eficiências de transdução observadas neste estudo são compatíveis com valores relatados em trabalhos que utilizaram células THP-1 como plataforma inicial para avaliação de receptores antigênicos quiméricos. Morrissey *et al.*, (2018) e Hong *et al.*, (2026) demonstraram que células THP-1 podem ser eficientemente modificadas para expressar diferentes arquiteturas de CAR contendo domínios intracelulares derivados de receptores com potencial ativação mieloide, constituindo um modelo experimental robusto para análises preliminares de expressão e funcionalidade. Nesse contexto, os resultados obtidos corroboram a adequação da linhagem THP-1 como sistema para investigação de novas arquiteturas de CAR direcionadas a células mieloides.

A purificação das populações celulares por *cell sorting* permitiu a obtenção de linhagens altamente enriquecidas, com aproximadamente 99% de células eGFP+, reduzindo a heterogeneidade experimental e possibilitando que as análises subsequentes fossem realizadas predominantemente em células CAR-modificadas. Em estudos envolvendo CAR-T, CAR-NK e CAR-macrófagos, a utilização de populações altamente purificadas é frequentemente recomendada para minimizar a interferência de células não transduzidas na interpretação de ensaios funcionais, especialmente aqueles relacionados à citotoxicidade, fagocitose e secreção de citocinas (Sadelain *et al.*, 2013; Klichinsky *et al.*, 2020).

Outro aspecto relevante observado foi a manutenção das características morfológicas e da capacidade de expansão das células THP-1 após a expressão dos diferentes construtos. Alterações estruturais em CARs podem, em determinadas circunstâncias, induzir sinalização tônica (*tonic signaling*), levando à redução da viabilidade celular, alterações metabólicas ou prejuízo proliferativo mesmo na ausência do antígeno-alvo (Long *et al.*, 2015; Ajina; Maher, 2018). No entanto, nenhuma evidência de comprometimento da expansão celular ou perda aparente de viabilidade foi observada nas linhagens geradas neste estudo, sugerindo que os receptores avaliados não induziram níveis detectáveis de sinalização tônica capazes de impactar negativamente a manutenção das células CD19-THP-1-CAR em cultura.

Além disso, a preservação das características fenotípicas típicas da linhagem THP-1 após a modificação genética representa um aspecto particularmente relevante para estudos envolvendo CAR-macrófagos. Considerando que a funcionalidade dessas células depende da manutenção de programas biológicos relacionados principalmente à fagocitose, reconhecimento de padrões moleculares e resposta

inflamatória, a ausência de alterações morfológicas evidentes sugere que a introdução dos construtos não comprometeu de maneira significativa a identidade celular basal das células THP-1. No entanto, a caracterização fenotípica é necessária e será executada em breve. Dessa forma, os resultados obtidos forneceram uma base experimental confiável para as etapas subsequentes de caracterização da expressão dos CARs e avaliação funcional das células modificadas.

A expressão do receptor antigênico quimérico na superfície celular constitui um dos principais indicadores de sucesso na geração de células CAR, uma vez que a integração do transgene não garante a adequada tradução, processamento intracelular e exposição do receptor na membrana plasmática (Fujiwara *et al.*, 2020). Dessa forma, a avaliação da expressão de superfície representa uma etapa indispensável para confirmar o potencial funcional das células modificadas, visto que o reconhecimento do antígeno-alvo depende diretamente da disponibilidade do domínio de ligação ao antígeno na superfície celular (Sadelain *et al.*, 2013).

No presente estudo, a marcação com Proteína-L permitiu confirmar a expressão das diferentes variantes de CD19-CAR na superfície das células THP-1. A Proteína-L é amplamente empregada para detecção de receptores quiméricos contendo domínios scFv, uma vez que reconhece especificamente cadeias leves de imunoglobulinas independentemente da especificidade antigênica do receptor, constituindo uma estratégia frequentemente utilizada para a avaliação da expressão de CAR por citometria de fluxo (Zheng *et al.*, 2012; De Oliveira *et al.*, 2013). Os valores determinados por citometria de fluxo para expressar a taxa de detecção de CD19-CAR na superfície celular será validada através da utilização de anticorpo monoclonal anti-linker, sendo esta uma estrutura presente no scFv e trará confiabilidade na real expressão de CD19-CAR após a detecção/mensuração por citometria de fluxo.

As três linhagens celulares avaliadas apresentaram expressão detectável do receptor na superfície celular, demonstrando que os vetores lentivirais empregados foram capazes de promover não apenas a integração estável do transgene, mas também a produção de receptores estruturalmente compatíveis com o transporte e inserção na membrana plasmática. Entretanto, diferenças expressivas foram observadas entre os construtos. As células CD19-8-FcγRI-THP-1-CAR apresentaram aproximadamente 95% de células duplo positivas, seguidas pelas células CD19-FcγRI-THP-1-CAR (75,1%), enquanto as células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR apresentaram aproximadamente 45% de expressão de superfície. Esse achado é

particularmente interessante porque todas as populações avaliadas apresentavam aproximadamente 99% de células eGFP+ após o processo de purificação por *cell sorting*. Dessa forma, a diferença observada entre a frequência de células eGFP+ (portadoras do transgene) e a frequência de células positivas para Proteína-L sugere que a presença não necessariamente resulta em níveis equivalentes de expressão do receptor na superfície celular. Estudos prévios demonstram que a eficiência de exposição de CARs na membrana pode ser influenciada por múltiplos fatores, incluindo a composição dos domínios *hinge* e transmembrana, estabilidade conformacional do scFv, eficiência de dobramento proteico, tráfego intracelular e retenção em compartimentos do retículo endoplasmático ou complexo de Golgi (Alabaude *et al.*, 2018; Guedan *et al.*, 2019; Fujiwara *et al.*, 2020). Apesar dessas diferenças quantitativas, todas as linhagens apresentaram populações detectáveis de células CAR+, confirmando a funcionalidade das construções desenvolvidas e possibilitando a realização dos ensaios funcionais subsequentes.

Os primeiros ensaios funcionais realizados no presente estudo tiveram como objetivo estabelecer e validar a plataforma experimental baseada em células B neoplásicas expressando luciferase, bem como avaliar o comportamento de células THP-1 modificadas com um CAR contendo domínios intracelulares utilizados para aplicação clínica em células T. Para isso, foi empregada a linhagem CD19-8-137z-THP-1-CAR, cuja arquitetura incorpora os domínios coestimulatório CD137 (4-1BB) e de ativação CD3 $\zeta$  (Sadelain *et al.*, 2013; Maude *et al.*, 2014; FDA, 2026).

A utilização desse construto como controle experimental baseou-se no fato de que CD137 e CD3 $\zeta$  não constituem moléculas fisiologicamente associadas à ativação de monócitos ou macrófagos. Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que as células CD19-8-137z-THP-1-CAR foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade de células Nalm-6 Luc e Daudi Luc após 6 horas de cocultivo em todas as proporções E:T avaliadas. Embora a plataforma de luciferase não permita determinar diretamente os mecanismos envolvidos nesse fenômeno, a diminuição da luminescência sugere uma redução inicial da viabilidade tumoral, potencialmente associada às atividades citotóxicas e/ou fagocíticas iniciais mediadas pelas células THP-1 modificadas.

Esse resultado encontra respaldo em estudos pioneiros de CAR-macrófagos. Morrissey *et al.*, (2018) demonstraram que domínios intracelulares contendo motifs ITAM derivados de CD3 $\zeta$  são capazes de desencadear fagocitose dependente de

antígeno em monócitos e macrófagos. Os autores verificaram que os ITAMs presentes em CD3 $\zeta$  podem ser fosforilados após o reconhecimento do antígeno, promovendo o recrutamento de moléculas de sinalização tradicionalmente associadas à fagocitose, incluindo SYK, PI3K e outros componentes envolvidos na reorganização do citoesqueleto. De forma semelhante, Klichinsky *et al.*, (2020) demonstraram que CARs contendo domínios associados à ativação mieloide podem explorar vias intracelulares convergentes com aquelas ativadas por receptores fagocíticos endógenos, permitindo que células monocíticas e macrófagos exerçam funções efectoras após o reconhecimento tumoral.

Nesse contexto, embora CD3 $\zeta$  tenha sido originalmente desenvolvido para ativação de linfócitos T, os três motifs ITAM constituem plataformas de sinalização capazes de interagir com proteínas amplamente expressas em células mieloides. Dessa forma, é plausível que a atividade observada nas células CD19-8-137z-THP-1-CAR decorra da ativação dessas vias intracelulares compartilhadas, culminando na indução de mecanismos iniciais de eliminação tumoral. Essa interpretação é particularmente relevante considerando que a linhagem THP-1 mantém a expressão de moléculas envolvidas em sinalização mediada por ITAM, incluindo SYK, cuja ativação representa um evento central em processos de fagocitose e ativação inflamatória de monócitos e macrófagos (Underhill; Goodridge, 2012).

Outro aspecto importante refere-se às diferenças biológicas entre as células-alvo utilizadas. As células Nalm-6 derivam de uma leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras, caracterizada pela expansão de blastos altamente dependente de sinais proliferativos e metabólicos específicos (PUI *et al.*, 2008) enquanto as células Daudi derivam de um linfoma de Burkitt, neoplasia agressiva de células B maduras associada à ativação constitutiva de MYC (proto-oncogene) e a profundas alterações metabólicas e transcricionais (Schmitz *et al.*, 2012). Embora ambas expressem CD19 e sejam amplamente empregadas na avaliação de terapias anti-CD19, apresentam perfis fenotípicos, metabólicos e transcricionais distintos (Taub *et al.*, 1982; Maude *et al.*, 2014). Dessa forma, a observação de redução da viabilidade em ambas as linhagens sugere que a atividade das células CD19-8-137z-THP-1-CAR não esteve restrita a um único contexto biológico tumoral, mas foi capaz de atuar frente a modelos representativos de diferentes neoplasias de células B.

Curiosamente, o efeito observado após 6 horas de cocultivo não foi mantido após 24 horas. Uma possível explicação para esse comportamento reside na própria

natureza da resposta mieloide. Diferentemente dos linfócitos T, que frequentemente apresentam expansão clonal e respostas sustentadas após ativação antigênica, monócitos e macrófagos integram a imunidade inata e caracterizam-se por respostas rápidas e precoces ao estímulo, frequentemente concentradas nas primeiras horas após o reconhecimento do alvo (Gordon; Pluddemann, 2017). Assim, é possível que a redução inicial da viabilidade tumoral reflita eventos precoces de interação efetora mediados pelas células THP-1-CAR, enquanto mecanismos compensatórios das células tumorais, limitações intrínsecas da sinalização baseada em CD137/CD3 $\zeta$  em células mieloides ou a ausência de domínios especificamente adaptados à biologia de macrófagos tenham contribuído para a perda do efeito observado em períodos mais prolongados.

Além disso, a ausência de atividade sustentada em 24 horas reforça uma das principais hipóteses que motivaram o desenvolvimento dos construtos avaliados neste trabalho. Enquanto a arquitetura CD137/CD3 $\zeta$  foi originalmente otimizada para células T, receptores contendo domínios derivados de moléculas mieloides, como Fc $\gamma$ RI, Fc $\epsilon$ R $\gamma$ I e Dectina-1, podem promover uma ativação mais compatível com os programas biológicos naturais de monócitos e macrófagos, potencialmente resultando em respostas efetoras mais robustas e duradouras no contexto de células THP-1 modificadas.

Após a validação da plataforma experimental, os ensaios funcionais foram conduzidos utilizando células THP-1 expressando CARs contendo domínios de transdução de sinal associados à biologia de monócitos e macrófagos. Os resultados demonstraram que tanto as células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR quanto as células CD19-8-Fc $\gamma$ RI-THP-1-CAR foram capazes de reduzir a viabilidade de células Nalm-6 Luc nas três proporções E:T avaliadas, mantendo esse efeito após 24 horas de cocultivo. Embora o ensaio de luciferase não permita determinar diretamente os mecanismos responsáveis por essa redução da viabilidade tumoral, os dados sugerem a ocorrência de atividade efetora antitumoral precoce e sustentada, potencialmente relacionada a processos de fagocitose, citotoxicidade mediada por contato celular ou combinação de múltiplos mecanismos efetores característicos de monócitos e macrófagos.

O resultado observado corrobora a hipótese central do presente trabalho de que a incorporação de domínios naturalmente envolvidos na ativação de monócitos e macrófagos pode favorecer o desempenho funcional de células THP-1-CAR.

Diferentemente dos receptores contendo CD3 $\zeta$ , os domínios derivados de Dectina-1 e Fc $\gamma$ RI estão fisiologicamente associados a vias de reconhecimento e eliminação de partículas, microrganismos e células-alvo por células da imunidade inata (Goodridge *et al.*, 2009; Underhill; Goodridge, 2012). Dessa forma, a manutenção da atividade observada após 24 horas sugere que esses receptores podem promover uma ativação mais compatível com os programas biológicos endógenos da linhagem THP-1.

A Dectina-1 constitui um receptor de reconhecimento padrão pertencente à família dos receptores de lectina tipo C, capaz de sinalizar por meio de um motif hemITAM presente em sua região citoplasmática. Após o reconhecimento do ligante ( $\beta$ -glucanos), ocorre recrutamento e ativação de SYK, culminando na ativação de múltiplas vias intracelulares, incluindo NF- $\kappa$ B, MAPK e fatores associados à reorganização do citoesqueleto e à fagocitose (Goodridge *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2018). De maneira semelhante, Fc $\gamma$ RI, pertencente à família das imunoglobulinas, participa fisiologicamente do reconhecimento de imunocomplexos e promove ativação celular através de moléculas adaptadoras contendo ITAMs, que convergem para vias dependentes de SYK e PI3K (Nimmerjahn; Ravetch, 2008). Assim, embora os construtos desenvolvidos neste estudo reconheçam CD19 em vez de ligantes fisiológicos desses receptores, os domínios intracelulares mantêm a capacidade de acionar programas de sinalização característicos de células mieloides.

Os resultados também podem ser interpretados sob visão de trabalhos pioneiros de CAR-macrófagos. Klichinsky *et al.*, (2020) demonstraram que macrófagos geneticamente modificados com CAR podem promover eliminação tumoral (inclusive em modelos *in vivo*), remodelamento do microambiente e ativação de vias pró-inflamatórias após o reconhecimento do antígeno-alvo, reforçando a ideia de que receptores projetados para explorar vias de sinalização próprias da imunidade inata podem representar uma estratégia particularmente eficiente para potencializar funções efectoras de monócitos e macrófagos.

Como descrito anteriormente, as diferenças biológicas entre as neoplasias oriundas das linhagens Nalm-6 e Daudi podem influenciar a susceptibilidade das células tumorais ao reconhecimento e eliminação por células efectoras, contribuindo para os padrões distintos observados nos ensaios funcionais. De fato, enquanto as células CD19-Dectin-1-THP-1-CAR e CD19-8-Fc $\gamma$ RI-THP-1-CAR mantiveram redução significativa da viabilidade de células Nalm-6 após 24 horas, o mesmo não foi observado frente às células Daudi. Em ambas as linhagens CAR, houve redução

da viabilidade tumoral após 6 horas de cocultivo, nas três proporções E:T testadas, sugerindo a ocorrência de uma resposta efetora inicial. Entretanto, não houve manutenção do mesmo efeito em células Daudi em 24 horas, o que pode indicar que os mecanismos funcionais envolvidos foram insuficientes para sustentar a eliminação tumoral ao longo do tempo nesse modelo específico de linfoma. Considerando a natureza agressiva do linfoma de Burkitt, caracterizada por elevada taxa proliferativa e intensa atividade metabólica dependente de MYC, é possível que as células Daudi apresentem maior capacidade de compensar ou superar os efeitos iniciais promovidos pelas células THP-1-CAR (Schmitz *et al.*, 2012).

Embora os resultados sugiram fortemente a ocorrência de atividade efetora mediada pelos CARs, a distinção entre morte celular, fagocitose e outros mecanismos de eliminação tumoral requer análises complementares específicas, as quais serão fundamentais para elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos observados.

A produção de citocinas pró-inflamatórias constitui um importante parâmetro para avaliação da ativação funcional de células mieloides, uma vez que moléculas como TNF- $\alpha$  participam da amplificação da resposta inflamatória, do recrutamento de células imunes e da atividade antitumoral mediada por monócitos e macrófagos (Murray, 2017). Entretanto, apesar da atividade observada nos ensaios de viabilidade tumoral, não foi detectada produção mensurável de TNF- $\alpha$  em nenhuma das condições experimentais avaliadas.

A ausência de TNF- $\alpha$  detectável não necessariamente indica ausência de ativação celular. Diversos estudos demonstram que a produção de citocinas por células monocíticas depende de múltiplos fatores, incluindo o estado de diferenciação, a intensidade do estímulo, a duração da interação célula-célula e as características do microambiente (Auffray; Sieweke; Geissmann, 2009; Murray, 2017). Nesse contexto, um aspecto relevante do presente estudo é que os experimentos foram realizados utilizando células THP-1 não diferenciadas. Embora essa linhagem constitua um modelo amplamente utilizado para estudos de monócitos humanos, sabe-se que células THP-1 em estado basal apresentam perfil funcional distinto daquele observado após diferenciação para células macrófago-like, incluindo menor capacidade secretora e menor produção de mediadores inflamatórios em determinadas condições experimentais (Park *et al.*, 2007; Daigneault *et al.*, 2010).

De fato, a diferenciação de células THP-1 por agentes como PMA promove alterações fenotípicas profundas, incluindo aumento da aderência celular,

reorganização do citoesqueleto, modificação do perfil transcricional e amplificação da produção de citocinas pró-inflamatórias após estimulação (Daigneault *et al.*, 2010). Dessa forma, é plausível que o estado não diferenciado das células utilizadas tenha limitado a produção de TNF- $\alpha$  a níveis inferiores ao limite de detecção do ensaio empregado.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial da linhagem THP-1 como plataforma experimental para o desenvolvimento e validação inicial de novas arquiteturas de CARs direcionados a células mieloides. Historicamente, linhagens celulares imortalizadas têm desempenhado papel fundamental na otimização de estratégias de engenharia celular antes da transição para células primárias humanas. Nesse contexto, células Jurkat foram amplamente utilizadas ao longo das últimas décadas como modelo inicial para avaliação de expressão, sinalização e funcionalidade de receptores quiméricos em linfócitos T, contribuindo significativamente para o desenvolvimento das atuais plataformas de células CAR-T (Gommerman *et al.*, 2000; Sadelain *et al.*, 2013). De maneira análoga, os resultados do presente estudo reforçam a aplicabilidade das células THP-1 como uma plataforma de triagem para avaliação preliminar de construtos destinados à modificação de monócitos e macrófagos humanos primários.

Além disso, este trabalho descreve, até onde é de nosso conhecimento, a primeira geração e caracterização de células THP-1 expressando um CAR contendo o domínio intracelular oriundo de Dectina-1 direcionado ao antígeno CD19. Considerando que a Dectina-1 constitui um importante receptor de reconhecimento padrão envolvido na ativação de vias mieloides dependentes de SYK e na indução de funções efetoras relacionadas à imunidade inata, sua incorporação em arquiteturas CAR representa uma estratégia promissora para exploração de mecanismos alternativos de ativação em monócitos e macrófagos. Dessa forma, os resultados apresentados estabelecem uma base conceitual e experimental para futuros estudos envolvendo células primárias humanas, permitindo que construtos previamente selecionados e caracterizados em THP-1 sejam posteriormente avaliados em monócitos derivados de sangue periférico ou macrófagos diferenciados. Assim, além de contribuir para a expansão do conhecimento sobre plataformas CAR direcionadas à imunidade mioelide, este trabalho fornece subsídios para o desenvolvimento racional de novas estratégias de imunoterapia celular voltadas ao tratamento de neoplasias de células B.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho estabeleceu, de forma integrada, plataformas celulares robustas com ênfase na caracterização da atividade citotóxica e fagocítica de macrófagos CD19-CAR derivados da linhagem THP-1. Os receptores Fc influenciam diretamente na expressão do CAR, evidenciando a importância da escolha adequada das regiões hinge, transmembrana e dos domínios intracelulares. As variantes CD19-CAR contendo FcγR ou Dectina-1 como domínios de transdução de sinal mediam uma atividade citotóxica *in vitro* contra células B leucêmicas ou de linfoma de forma mais duradoura comparado com domínio CD137z.

Como perspectiva, o trabalho fornece uma base experimental consistente para a investigação mecanística e translacional de CD19-CAR-macrófagos com domínios inerentes à atividade citotóxica dessa população celular na resposta contra tumores.

## REFERÊNCIAS

ALREHAILI, M. *et al.* CAR-macrophages in solid tumors: promise, progress, and prospects. **Nature Precision Oncology**, v. 9, n. 1, e382, 2025. DOI:

10.1038/s41698-025-01170-7. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41698-025-01170-7>. Acesso em: 07 mai. 2026.

AUB, R. *et al.* Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 79, n. 24, p. 7837–7841, 1982. DOI: 10.1073/pnas.79.24.7837. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6818551/>. Acesso em: 15 mar. 2026.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 27, p. 669–692, 2009. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19132917/>. Acesso em: 08 mar. 2026.

BASU, A. *et al.* Differentiation and regulation of Th cells: a balancing act for cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 669474, 2021. DOI:

10.3389/fimmu.2021.669474. Disponível em:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8126720/>. Acesso em: 28 abr. 2026.

BASU, A. *et al.* Identification of immunogenic MHC class II human HER3 peptides that mediate anti-HER3 CD4<sup>+</sup> Th1 responses and potential use as a cancer vaccine. **Cancer Immunology Research**, v. 10, n. 1, p. 108–125, 2022. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-21-0454. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34785506/>. Acesso em: 15 jun. 2026.

BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 6, n. 1, p. 33–43, 2006. DOI: 10.1038/nri1745. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16341139/>. Acesso em: 25 set. 2024.

BROWN, G. D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23253612/>. Acesso em: 02 mai. 2026.

BRUHNS, P.; JÖNSSON, F. Mouse and human FcR effector functions. **Immunological Reviews**, v. 268, n. 1, p. 25–51, 2015. DOI: 10.1111/imr.12350. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26497511/>. Acesso em: 13 jun. 2026.

CAMPUZANO, A. *et al.* CARD9-Associated Dectin-1 and Dectin-2 Are Required for Protective Immunity of a Multivalent Vaccine against *Coccidioides posadasii* Infection. **Journal of Immunology**, v. 205, p. 169–180, 2020. DOI: 10.1038/nri1745. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jimmunol/article-abstract/204/12/3296/7943792>. Acesso em: 07 mai. 2026.

CHIFFOLEAU, E. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets. **Frontiers in Immunology**, v.

9, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29497419/>. Acesso em: 20 fev. 2026.

COHEN, J. E. *et al.* Adoptive cell therapy: past, present and future. **Immunotherapy**, v. 72, p. 123–139, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28128715/>. Acesso em: 21 mar. 2026.

DAIGNEAULT, M. *et al.* The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 1, e8668, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0008668. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20084270/>. Acesso em: 09 jan. 2026.

DOTTI, G.; GOTTERI, S.; SAVOLDO, B. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. **Immunological Reviews**, v. 22, p. 1–14, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24329793/>. Acesso em: 29 mar. 2026.

EDINGER, M. *et al.* Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 16, p. 2128–2136, 2002. DOI: 10.1016/S0959-8049(02)00410-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959804902004100>. Acesso em: 12 fev. 2026.

FU, X. *et al.* Macrophage polarization in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma: from mechanistic insights to translational therapies. **Cancer Control**, v. 32, 2025. DOI: 10.1177/10732748251406674. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12709032/>. Acesso em: 20 abr. 2026.

FUJIWARA, Kento *et al.* Hinge and transmembrane domains of chimeric antigen receptor regulate receptor expression and signaling threshold. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1182, 2020. DOI: 10.3390/cells9051182. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32397414/>. Acesso em: 01 jun. 2026.

GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 218–230, 2006. DOI: 10.1038/nri1782. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16470226/>. Acesso em: 03 abr. 2026.

GOGESCH, P. *et al.* The role of Fc receptors on the effectiveness of therapeutic monoclonal antibodies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, 8947, 2021. DOI: 10.3390/ijms22168947. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445651/>. Acesso em: 20 abr. 2026.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 230, n. 1, p. 38–50, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19594628/>. Acesso em: 15 jun. 2026.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. **BMC Biology**, London, v. 15, n. 1, p. 53, 2017. DOI: 10.1186/s12915-017-0392-4.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28662662/>. Acesso em: 22 mai. 2026.

GUEDAN, S. *et al.* Engineering and design of chimeric antigen receptors. **Molecular Therapy**, New York, v. 12, p. 145–156, 2019. DOI: 10.1016/j.omtm.2018.12.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30666307/>. Acesso em: 08 mar. 2026.

HENZE, A. T.; MAZZONE, M. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, p. 3672–3679, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27482883/>. Acesso em: 21 jan. 2026.

Jl, Y. *et al.* Macrophage polarization: molecular mechanisms, disease implications, and targeted therapeutic strategies. **Frontiers in Immunology**, v. 16, e1732718, 2025. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1732718. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12740920/>. Acesso em: 12 mar. 2026.

JUNE, C. H. *et al.* CAR T cell immunotherapy for human cancer. **Science**, v. 359, p. 1361–1365, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29567707/>. Acesso em: 18 mai. 2026.

KIESGEN, S. *et al.* Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 16, n. 3, p. 1331–1342, 2021. DOI: 10.1038/s41596-020-00467-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41596-020-00467-0>. Acesso em: 23 mar. 2026.

KINET, J. P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 931–972, 1999. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.931. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10358778/>. Acesso em: 05 jun. 2026.

KLEIN, U.; DALLA-FAVERA, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 1, p. 22–33, 2008. DOI: 10.1038/nri2217. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18097447/>. Acesso em: 12 abr. 2026.

KLICHINSKY, M. *et al.* Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. **Nature Biotechnology**, New York, v. 38, n. 8, p. 947–953, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0462-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0462-y>. Acesso em: 27 abr. 2026.

LANDMANN, S. *et al.* Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 8, p. 630–638, 2007. DOI: 10.1038/ni1460. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17450144/>. Acesso em: 01 mai. 2026.

LEVAL, L.; JAFFE, E. S. Lymphoma classification. **The Cancer Journal**, v. 17, p. 718–735, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32496451/>. Acesso em: 04 jan. 2026.

LEVINE, B. L. *et al.* Global manufacturing of CAR T cell therapy. **Molecular Therapy – Methods & Clinical Development**, New York, v. 4, p. 92–101, 2017. DOI: 10.1016/j.omtm.2016.12.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344995/>. Acesso em: 14 abr. 2026.

LIANG, X. *et al.* Distinct functions of CAR-T cells possessing a dectin-1 intracellular signaling domain. **Gene Therapy**, v. 30, p. 411–420, 2021. DOI: 10.1038/s41434-021-00257-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33953316/>. Acesso em: 25 mai. 2026.

LONG, A. H. *et al.* 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. **Nature Medicine**, New York, v. 21, n. 6, p. 581–590, 2015. DOI: 10.1038/nm.3838. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25939063/>. Acesso em: 11 mar. 2026.

MARIE, J. P. Drug resistance in hematologic malignancies. **Current Opinion in Oncology**, v. 13, n. 6, p. 463–469, 2001. DOI: 10.1097/00001622-200111000-00008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11673686/>. Acesso em: 07 abr. 2026.

MAUDE, S. L. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 371, n. 16, p. 1507–1517, 2014. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1407222>. Acesso em: 04 abr. 2026.

MERLE, N. *et al.* Secreted luciferases as a minimally invasive 3R-compliant tool for accurate monitoring of tumor burden. **Nature Protocols**, 2026. DOI: 10.1038/s41596-025-01315-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41634147/>. Acesso em: 03 jan. 2026.

MILONE, M. C.; O'DOHERTY, U. Clinical use of lentiviral vectors. **Leukemia**, London, v. 32, n. 7, p. 1529–1541, 2018. DOI: 10.1038/s41375-018-0106-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29654266/>. Acesso em: 20 abr. 2026.

MISHRA, A. K.; MALONIA, S. K. Advancing cellular immunotherapy with macrophages. **Life Sciences**, v. 328, p. 121857, 2023. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.121857. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37307965/>. Acesso em: 02 jun. 2026.

MORRISSEY, M. A. *et al.* Chimeric antigen receptors that trigger phagocytosis. **eLife**, Cambridge, v. 7, e36688, 2018. DOI: 10.7554/eLife.36688. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29862966/>. Acesso em: 14 abr. 2026.

MURRAY, P. J. Macrophage polarization. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 79, p. 541–566, 2017. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>. Acesso em: 27 mai. 2026.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, n. 1, p. 34–47, 2008. DOI:

10.1038/nri2206. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2206>. Acesso em: 09 abr. 2026.

ORR, M. T.; LANIER, L. L. Natural killer cell education and tolerance. **Cell**, v. 10, p. 219–231, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20850008/>. Acesso em: 16 jun. 2026.

PARK, E. K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation Research**, Basel, v. 56, n. 1, p. 45–50, 2007. DOI: 10.1007/s00011-007-6115-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17334670/>. Acesso em: 10 fev. 2026.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, London, v. 371, n. 9617, p. 1030–1043, 2008. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60457-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18358930/>. Acesso em: 25 mai. 2026.

RAFIQ, S.; HACKETT, C. S.; BRENTJENS, R. J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 3, p. 147-167, 2020. DOI: 10.1038/s41571-019-0297-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31848460/>. Acesso em: 14 mai. 2026.

RAZA, I. G. A.; CLARKE, A. J. B cell metabolism and autophagy in autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, e681105, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.681105. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.681105/full>. Acesso em: 29 fev. 2026.

SADELAIN, M.; BRENTJENS, R.; RIVIÈRE, I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. **Cancer Discovery**, Philadelphia, v. 3, n. 4, p. 388–398, 2013. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23550147/>. Acesso em: 03 mai. 2026.

SCHEUERMANN, R. H.; RACILA, E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. **Leukemia & Lymphoma**, v. 18, n. 5-6, p. 385-397, 1995. DOI: 10.3109/10428199509059636. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8528044/>. Acesso em: 19 mai. 2026.

SCHMITZ, R. *et al.* Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. **Nature**, London, v. 490, n. 7418, p. 116–120, 2012. DOI: 10.1038/nature11378. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22885699/>. Acesso em: 28 abr. 2026.

SHARMA, A.; JASROTIA, S.; KUMAR, A. Effects of chemotherapy on the immune system: implications for cancer treatment and patient outcomes. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 397, n. 5, p. 2551-2566, 2024. DOI: 10.1007/s00210-023-02781-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37906273/>. Acesso em: 11 mai. 2026.

TOGHRAIE, F. S. *et al.* Tumor-infiltrating myeloid cells; mechanisms, functional significance, and targeting in cancer therapy. **Nature Cellular Oncology**, v. 48, n. 3, p. 559-590, 2025. DOI: 10.1007/s13402-025-01051-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13402-025-01051-y>. Acesso em: 06 mar. 2026.

TUSSIWAND, R. *et al.* Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 9, p. 2317-2324, 2009. DOI: 10.1002/eji.200939633. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19714572/>. Acesso em: 22 jan. 2026.

UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S. Information processing during phagocytosis. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 12, n. 7, p. 492–502, 2012. DOI: 10.1038/nri3244. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3244>. Acesso em: 13 mai. 2026.

WAGER, C. M. L.; WORMLEY JR., F. L. Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. **Nature Mucosal Immunology**, v. 7, p. 1023-1035, 2014. DOI: 10.1038/mi.2014.65. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/mi201465>. Acesso em: 18 mai. 2026.

WALID, M. *et al.* The tumor microenvironment in hematologic malignancies: immune evasion, metabolic reprogramming, and therapeutic resistance. **Blood Science**, v. 8, n. 1, e00270, 2026. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000270. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12919749/>. Acesso em: 28 mar. 2026.

WANG, Y. *et al.* B cell development and maturation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1254, p. 1-22, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-3532-1\_1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32323265/>. Acesso em: 02 mai. 2026.

XU, X. *et al.* Mechanisms of relapse after CD19 CAR T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia and its prevention and treatment strategies. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2664, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02664. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6863137/>. Acesso em: 17 mai. 2026.