

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Guilherme Simões Diniz
Raíssa Lima Ribeiro

**ESTRATÉGIAS PARA O USO DAS CÉLULAS CAR-T COMO TERAPIA EM
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.**

São Paulo
2022

Guilherme Simões Diniz

Raíssa Lima Ribeiro

**ESTRATÉGIAS PARA O USO DAS CÉLULAS CAR-T COMO TERAPIA EM
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina no Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Adriano Pereira, como requisito parcial para obtenção do título de biomédico (a).

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Diniz, Guilherme Simões

Estratégias para o uso das células CAR-T como terapia em pacientes com leucemia mieloide aguda / Guilherme Simões Diniz, Raíssa Lima Ribeiro. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.

36 p.

Orientação de Adriano Pereira.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2022.

1. Antígenos 2. Imunoterapia 3. Imunoterapia adotiva 4. Leucemia mieloide aguda 5. Terapêutica I. Ribeiro, Raíssa Lima II. Pereira, Adriano III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 616.994

Guilherme Simões Diniz
Raíssa Lima Ribeiro

**ESTRATÉGIAS PARA O USO DAS CÉLULAS CAR-T COMO TERAPIA EM
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.**

São Paulo, 2022

Professor Orientador: Prof. Dr. Adriano Pereira

Professor Examinador:

São Paulo
2022

DEDICATÓRIA

Dedicamos este trabalho aos nossos pais, que nunca mediram esforços para que pudéssemos concluir esta etapa da nossa vida profissional. Dedicamos também aos nossos amigos e familiares, que sempre nos apoiaram e nunca nos deixaram desistir.

Sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos nossa família por todo apoio e confiança, por estarem conosco nos momentos mais difíceis e sempre acreditarem em nós.

Agradecemos aos nossos amigos e colegas de classe, por estarem conosco durante os quatro anos, nos ajudando em cada fase e tornando todo o aprendizado, pessoal e profissional, mais leve.

Agradecemos a todos os nossos professores, por todo o conhecimento compartilhado, toda a paciência e dedicação em nos ensinar, sem vocês não teríamos conseguido.

Em especial, agradecemos ao nosso orientador Prof. Adriano Pereira, por nos auxiliar durante a realização deste trabalho, pela paciência, incentivo e por compartilhar todo o conhecimento que foi indispensável para nossa formação.

RESUMO

A LMA é uma neoplasia agressiva que afeta as células-tronco mieloides. Estas sofrem mutações e resultam no crescimento descontrolado de células hematopoiéticas anormais e pouco diferenciadas. Tendo em vista que as terapias atuais são agressivas e que a recidiva é bastante frequente, novas vertentes terapêuticas estão sendo estudadas para as leucemias mieloides, entre elas, a terapia celular utilizando as células CAR-T. O principal desafio encontrado na aplicação dessa terapia para LMA é a ausência de um antígeno específico para células neoplásicas, pois estes são frequentemente coexpressos em células normais. Por conta desses fatores, existem uma série de alvos que estão sendo estudados em busca do sucesso, nesta revisão foram expostos os mais promissores. **Objetivo:** Realizar uma revisão literária, a fim de analisar os estudos mais recentes a respeito da terapia com células CAR-T na LMA e discutir sobre as estratégias que estão sendo tomadas para implementar a imunoterapia utilizando receptor de antígeno quimérico **Metodologia:** A revisão foi realizada por meio de pesquisas em livros e bancos de dados digitais. A busca foi feita por meio dos assuntos relacionados à LMA, CAR T cell, imunoterapia, leucemia e onco-hematológicas. Foram incluídos artigos que apresentaram informações relevantes e atualizadas sobre o assunto e com estratégias de pesquisas em desenvolvimento para a LMA e artigos com dados específicos para complementação. Foram utilizados como critérios de exclusão artigos desatualizados, artigos em discordância com a literatura, fontes não confiáveis e artigos sem informações relevantes. **Desenvolvimento:** As moléculas alvo descritas neste trabalho foram o cluster de diferenciação (CD) 7,33,38 e 123 assim como o oligossacarídeo LeY. Os receptores abordados ainda estão em fase inicial de estudos, porém a partir das pesquisas realizadas, foi demonstrado que as células CAR-T apresentam bons resultados na eliminação das células mieloides malignas ao reconhecer os antígenos-alvo propostos nesse trabalho. **Conclusão:** Apesar do sucesso da terapia com células CAR-T em outras neoplasias, alguns obstáculos ainda precisam ser elucidados para uma aplicação efetiva na LMA, como toxicidade e alvos fora do tumor. No entanto, muitos esforços estão sendo conduzidos com o propósito de melhorar o arsenal terapêutico para LMA.

Palavras-chaves: imunoterapia; CAR T cell; LMA; terapia; antígenos.

ABSTRACT

AML is an aggressive neoplasm that affects myeloid stem cells. These mutate and result in the uncontrolled growth of abnormal and poorly differentiated hematopoietic cells. Considering that current therapies are aggressive and that relapse is quite frequent, new therapeutic approaches are being studied for myeloid leukemias, including cell therapy using CAR-T cells. The main challenge found in the application of this therapy for AML is the absence of a specific antigen for neoplastic cells, as these are often co-expressed in normal cells. Due to these factors, there are a series of targets that are being studied in search of success, in this review the most promising ones were exposed. **Objective:** To carry out a literature review in order to analyze the most recent studies regarding CAR-T cell therapy in AML and to discuss the strategies that are being taken to implement immunotherapy using chimeric antigen receptor **Methodology:** The review was carried out through searches in books and digital databases. The search was carried out through subjects related to AML, CAR T cell, immunotherapy, leukemia and onco-hematology. Articles were included that presented relevant and updated information on the subject and with research strategies under development for AML and articles with specific data for complementation. Outdated articles, articles in disagreement with the literature, unreliable sources and articles without relevant information were used as exclusion criteria. **Development:** The target molecules described in this work were the differentiation cluster (CD) 7,33,38 and 123 as well as the LeY oligosaccharide. The addressed receptors are still in the initial phase of studies, but from the research carried out, it was demonstrated that the CAR-T cells present good results in the elimination of malignant myeloid cells when recognizing the target antigens proposed in this work. **Conclusion:** Despite the success of CAR-T cell therapy in other neoplasms, some obstacles still need to be elucidated for an effective application in AML, such as toxicity and targets outside the tumor. However, many efforts are being conducted with the aim of improving the therapeutic arsenal for AML. **Keywords:** immunotherapy; CAR T cell; AML; therapy; antigens.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	13
3 MÉTODOS	14
4 USO DE CÉLULAS CAR-T EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	15
4.1 IMUNOTERAPIA.....	15
4.2 CÉLULAS CAR-T: ESTRUTURA E ELABORAÇÃO.....	16
4.3 PROTOCOLO DE USO DA TERAPIA.....	19
4.4 TERAPIA DE CAR-T CELL EM DOENÇAS ONCO-HEMATOLÓGICAS.....	21
4.5 TERAPIA DE CAR-T CELL EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	22
4.5.1 Visão geral da LMA	22
4.5.2 Diretriz terapêutica convencional	23
4.5.2.1 Dificuldades na terapia convencional	23
4.5.3 Nova abordagem terapêutica: células CAR T	24
4.5.3.1 Dificuldades na aplicação da CAR T cell em LMA.....	24
4.5.4 Alvos para leucemia mieloide aguda	25
4.5.4.1 CD7.....	26
4.5.4.2 CD33.....	27
4.5.4.3 CD123.....	29
4.5.4.4 LEWIS Y	30
4.5.4.5 CD38.....	30
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
6 REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias onco-hematológicas, como leucemias e Doença de Hodgkin, foram descritas pela primeira vez no século XIX (LIN et al., 2020). Dentre elas, as leucemias são as mais encontradas, onde de acordo com os apontamentos do Instituto Nacional do Câncer são diagnosticados 10.810 novos casos por ano e relatadas 7370 mortes nesse mesmo período em 2019. Esse elevado número de mortes se deve ao fato de que essa classe de neoplasias é bastante agressiva e uma vez que se instala, evolui rapidamente. Além disso, não apresentam sintomas nas fases iniciais ou quando apresentam, estes se assemelham a outras doenças. Devido à dificuldade no diagnóstico precoce, o tratamento se torna tardio, elevando a taxa de mortalidade (INCA, 2021).

O tratamento das leucemias é determinado de acordo com o tipo. O regime terapêutico mais comum são os quimioterápicos, que embora tenham sido bastante utilizados e com taxas de resposta bem-sucedidas, a recidiva após a terapia convencional é bastante comum (EPPERT et al., 2011). Além disso, apresentam atividade citotóxica ou citocida sem ter toxicidade seletiva, podendo danificar não apenas as células cancerosas, mas também o tecido normal do paciente (TAGUCHI, 1995). Tais efeitos podem além de causar diversos sintomas no indivíduo em tratamento, afetam a tolerabilidade e a continuação da terapia, desse modo diminuem a qualidade de vida do paciente (IKI, 2000).

Com isso, atualmente, novos métodos de tratamento vêm sendo estudados e utilizados, como no caso do uso da terapia de células T com receptor de antígeno quimérico (células CAR-T) (HOFMANN et al., 2019).

A terapia com células CAR-T consiste na modificação das células T do próprio paciente, onde serão expressos receptores artificiais específicos para o antígeno tumoral. Estes receptores são compostos por quatro domínios, um domínio de ligação extracelular, que é derivado de um fragmento variável de cadeia única de um anticorpo (scFv), um domínio hinge, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização de células T intracelular (HOFMANN et al., 2019).

As células CAR-T vêm se mostrando uma ferramenta promissora para a futura imunoterapia adotiva contra o câncer (HAN et al., 2021), já tendo obtido sucesso em

outros tipos de leucemia, como a leucemia linfoblástica aguda e o linfoma não-Hodgkin. Com isso, vários esforços têm sido feitos para desenvolver imunoterapias celulares ou baseadas em anticorpos para leucemia mieloide aguda (HOFMANN et al., 2019), uma vez que esta representa 36% das 63 mil mortes ocasionadas por Leucemia em dez anos, 2008-2017 (Tabela 1) (Observatório de Oncologia, 2020).

Com base nos conhecimentos obtidos até os dias de hoje sobre sua caracterização molecular, muitos estudos estão sendo conduzidos com o intuito de encontrar um antígeno ideal para o tratamento da LMA. Entretanto, ainda existem dificuldades na procura deste alvo, uma vez que para se tornar um antígeno alvo ideal, ou seja, para que este tenha o potencial de induzir efeitos clínicos, sua expressão deve ser restrita a células malignas e deve ser expresso em todas elas, incluindo células-tronco malignas. Além disso, muitos pacientes devem testar positivo para o antígeno escolhido (CHEEVER et al., 2009).

Tabela 1: Número e proporção de óbitos por Leucemia, de acordo com o tipo de Leucemia, entre 2008 e 2017, no Brasil.

Tipo de Leucemia	≡	Número de óbitos	Proporção de óbitos
Leucemia Mieloide Aguda		22.704	36%
Outras Leucemias Não Especificadas		14.823	23%
Leucemia Linfoide Aguda		10.945	17%
Leucemia Linfocítica Crônica		5.835	9%
Leucemia Mieloide Crônica		4.497	7%
Outras Leucemias Mieloides		2.339	4%
Outras Leucemias Linfoides		1.862	3%
Leucemia Pró-Mielocítica Aguda		447	1%
Total Geral		63.452	100%

Fonte: Observatório de Oncologia, 2020.

2. OBJETIVO

Realizar uma revisão literária, a fim de analisar os estudos mais recentes a respeito da terapia com células CAR-T na LMA e discutir sobre as estratégias que estão sendo tomadas para implementar a imunoterapia utilizando receptor de antígeno quimérico, visando a obtenção de um método terapêutico mais eficaz e menos invasivo.

3. MÉTODOS

O estudo consiste em uma revisão integrativa, onde a busca de informações foi realizada por meio de pesquisas em livros e bancos de dados digitais, como SCIELO, PubMed, Google Acadêmico e LILACS. A busca foi feita por meio dos assuntos relacionados à LMA, CAR T cell, imunoterapia, leucemia e onco-hematológicas.

Foram incluídos artigos publicados durante o período dos anos 2000 até 2022, com idioma em inglês, que apresentaram informações relevantes e atualizadas sobre o assunto, artigos com estratégias de pesquisas em desenvolvimento para a doença em questão e artigos com dados específicos para complementação. Foram utilizados como critérios de exclusão artigos desatualizados, artigos em discordância com a literatura, artigos de fontes não confiáveis e artigos sem informações relevantes.

4. USO DE CÉLULAS CAR-T EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

4.1 IMUNOTERAPIA

A imunoterapia é definida como uma alternativa terapêutica que aumenta e/ou restabelece a capacidade do próprio sistema imunológico de identificar e combater determinada doença. Um dos objetivos deste método é manter o equilíbrio entre o combate a células cancerosas e a autoimunidade excessiva (ABBOTT et al., 2019).

Para compreender como a imunoterapia se tornou um pilar da terapia do câncer, é necessário que seja compreendida a interação das células cancerosas com o sistema imunológico. A imunidade inata induz uma resposta inespecífica, sendo a primeira linha de defesa do organismo, são rápidas e independem de estímulos não próprios. Já o sistema imunológico adaptativo, desempenha um papel muito mais significativo na resposta contra as células cancerosas, devido a sua especificidade e por se desenvolver ao longo do tempo por meio da exposição a antígenos não próprios (ABBOTT et al., 2019).

Hoje, existe um termo chamado de imunoedição utilizado para elucidar todas as fases de interação entre o câncer o sistema imune. Sabe-se, que durante um período as células cancerosas podem ser e são reconhecidas pelo sistema imunológico, devido às diferenças bioquímicas comparadas às células normais. Entretanto, durante a última fase chamada de escape, as células malignas podem crescer e metastatizar através de vários mecanismos que permitem sua fuga e evitam sua eliminação (ABBOTT et al., 2019).

Vários métodos de terapia imunológica foram desenvolvidos. Em 1890, o cirurgião William B. Coley, que atualmente é considerado o pai da imunoterapia, foi quem primeiro tentou utilizar o sistema imunológico direcionado para tratamento do câncer. Suas conquistas passaram despercebidas por mais de cinquenta anos, e várias descobertas no campo da imunologia, como a existência de células T e seu papel crucial na imunidade, intensificaram a pesquisa para a imunoterapia do câncer conhecida hoje (DOBOSZ et al., 2019).

Houve o surgimento de tecnologias que auxiliaram na caracterização molecular das células-alvo, design e fabricação de anticorpos, bem como na edição de genomas (NOH et al., 2020). Estes avanços permitiram a descoberta das bases moleculares das células tumorais, várias imunoterapias para cânceres, incluindo anticorpos monoclonais, conjugados anticorpo-droga, acopladores de células T biespecíficos,

inibidores de checkpoint e terapias de células T do receptor de antígeno quimérico (CAR) evoluíram e adquiriram rapidamente a aprovação da Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) (LIN et al., 2020).

A imunoterapia revolucionou o tratamento do câncer e rejuvenesceu o campo da imunologia tumoral. Vários tipos de imunoterapia, incluindo transferência de células adotivas (ACT) e inibidores de checkpoint imunológico (ICIs), obtiveram respostas clínicas duráveis (ZANG et al., 2020).

Embora não seja a cura, porque nem todos os tumores respondem e nem todos os pacientes sobrevivem, a imunoterapia tem se tornado um pilar da terapia do câncer, juntamente com quimioterapia, cirurgia, radiação e terapias direcionadas. Ainda há promessa de maior desenvolvimento e eficácia no futuro (RILEY et al., 2019).

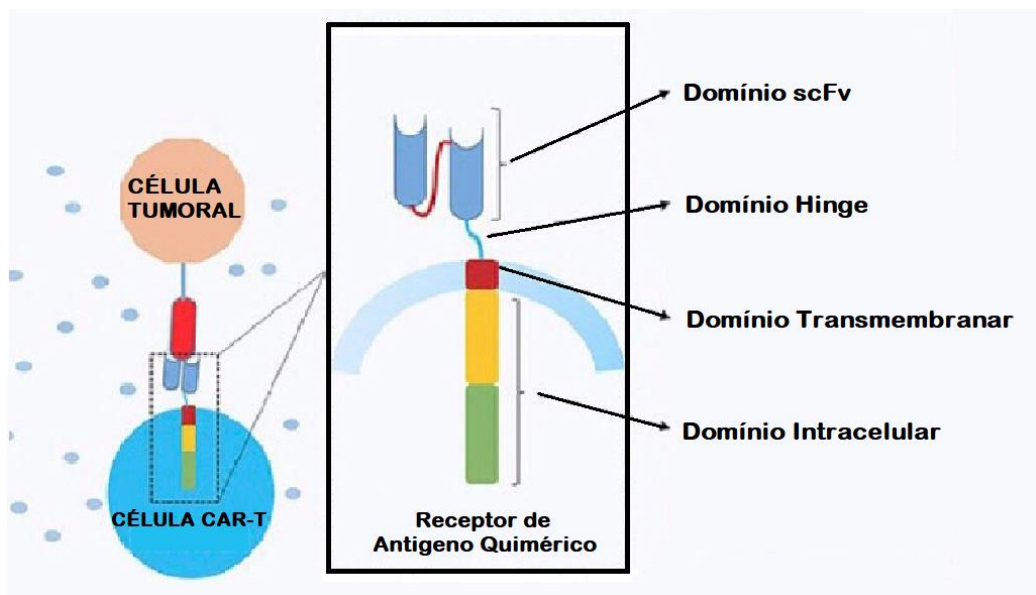
4.2 CÉLULAS CAR-T: ESTRUTURA E ELABORAÇÃO

No início dos anos 2000, as células T foram estudadas para desenvolver novas terapias, incluindo o desenvolvimento do receptor de antígeno quimérico (CAR) (ABBOTT et al., 2019). Os CARs são receptores sintéticos de membrana capazes de reconhecer moléculas e transportar sinais que otimizam a capacidade destrutiva dos linfócitos (ZHANG et al., 2017).

O CAR é desenhado e formado por 4 domínios com funções específicas: um domínio extracelular proveniente de uma cadeia simples do fragmento variável (scFv) de anticorpos monoclonais específicos, responsáveis por reconhecer o antígeno-alvo. A afinidade e a avidéz de scFv podem ser moduladas para melhorar o reconhecimento seletivo de células alvo, reduzindo assim os efeitos fora do tumor (JAYARAMAN et al., 2020). O segundo domínio encontrado é o *Hinge*, ou dobradiça, que conecta o scFv ao domínio transmembranar e confere flexibilidade ao scFv ajudando a melhorar sua eficácia. A modulação do domínio *Hinge* pode ser usada para regular as distâncias das fendas sinápticas e, portanto, sinalizar fenômenos como a segregação cinética. Para manter a distância ideal da sinapse, os epítomos distais da membrana geralmente requerem dobradiças mais curtas, enquanto os epítomos proximais da membrana requerem dobradiças mais longas (HUDECEK et al., 2013). Outro domínio encontrado é o transmembranar, que serve como um fulcro para a transdução de sinais de reconhecimento de ligantes para o domínio citoplasmático intracelular. Em uma célula T fisiológica, os domínios transmembranares do complexo TCR-CD3

desempenham um papel imperativo na montagem do complexo (JAYARAMAN et al., 2020). A porção mais interna do receptor CAR é formada pelos domínios intracelulares, que são os responsáveis pela sinalização intracelular do complexo TCR-CD3 que transduz o sinal de ativação necessário para iniciar a cascata de sinalização. Receptores coestimuladores, especialmente CD28, transmitem os sinais coestimulatórios que é importante para a sinalização sustentada, prevenção de anergia e proliferação (Figura 1) (BETTINI et al., 2017) (WEINKOVE et al., 2019).

Figura 1: Figura representativa da estrutura geral dos receptores de antígenos quiméricos e seus domínios.



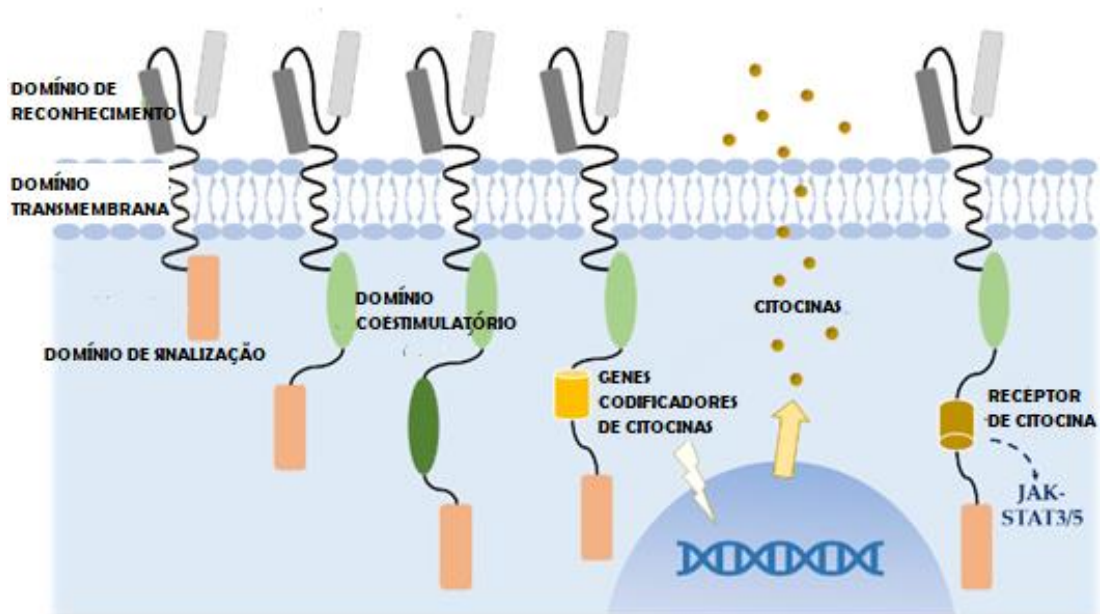
Fonte: adaptado de DWIVEDI et al., 2019. Domínios do receptor de antígeno Quimérico (CAR): (1) Domínio scFv apresenta alta especificidade com afinidade ajustável, além de determinar a imunogenicidade do CAR. (2) Domínio Hinge proporciona flexibilidade e comprimento auxiliando no posicionamento do CAR. (3) Domínio Transmembranar tem função na estabilidade e na liberação de citocinas. (4) Domínio Intracelular fornece ativação das células T além de sinalização intracelular.

Ao longo do desenvolvimento do CAR, a molécula sofreu alguns acréscimos que variavam de acordo com o número, tipo e a ordem dos domínios coestimuladores, passando a ser dividida em gerações (Figura 2) (JAYARAMAN et al., 2020).

Os CARs de primeira geração são tipicamente projetados com o intuito de promover sinalizações primárias, responsáveis por fornecerem o sinal de ativação após o acoplamento do ligante. Os CARs de segunda e terceira geração são

projetados para fornecer um ou mais sinais coestimulatórios juntamente com o sinal de ativação após o acoplamento do ligante (BROCKER, 2000). Já para a quarta geração, além da imunidade adaptativa, a interleucina-12 (IL-12) ou outras citocinas (como IL-8, 9, 15 e 18) foi atrelada ao endodomínio da segunda geração, na tentativa de para ativar a imunidade inata ao mesmo tempo. Essa manipulação levou ao recrutamento de células T infiltrantes de tumor (TILs) e células *natural killer* que foram capazes de eliminar células cancerosas antígeno-negativas. A ativação de citocinas não apenas modifica os microambientes tumorais, mas também resulta em prolongar a ativação de CARs e protege as células T da morte celular induzida pela ativação. Este achado está atualmente em sua fase inicial de ensaios clínicos. Recentemente, a quinta geração de CARs foi proposta como produto da inserção de um domínio da cadeia β do receptor de IL-2, com sítio de ligação para o fator de transcrição STAT3 (LIN et al., 2020).

Figura 2: Figura representativa das gerações do receptor de antígeno quimérico.



Fonte: adaptado de LIN et al., 2020. Cinco gerações do receptor de antígeno quimérico (CAR). Estruturas de cinco gerações de terapia com células CAR T. O domínio de ligação ao antígeno extracelular normalmente compreende um fragmento variável de cadeia única (scFv) a partir de um anticorpo monoclonal. O ectodomínio é então acoplado ao endodomínio através do domínio transmembranar. Na primeira geração, o domínio intracelular é tipicamente equipado com CD3 ζ do receptor de células T. Na segunda geração, o CD28 ou 4-1BB é adicionado ao domínio intracelular. A terceira geração modificada contém ambos. A nova quarta geração contém genes codificados para citocinas para expressão transgênica, como IL-12 e IL18, que podem ativar ainda mais citocinas. A

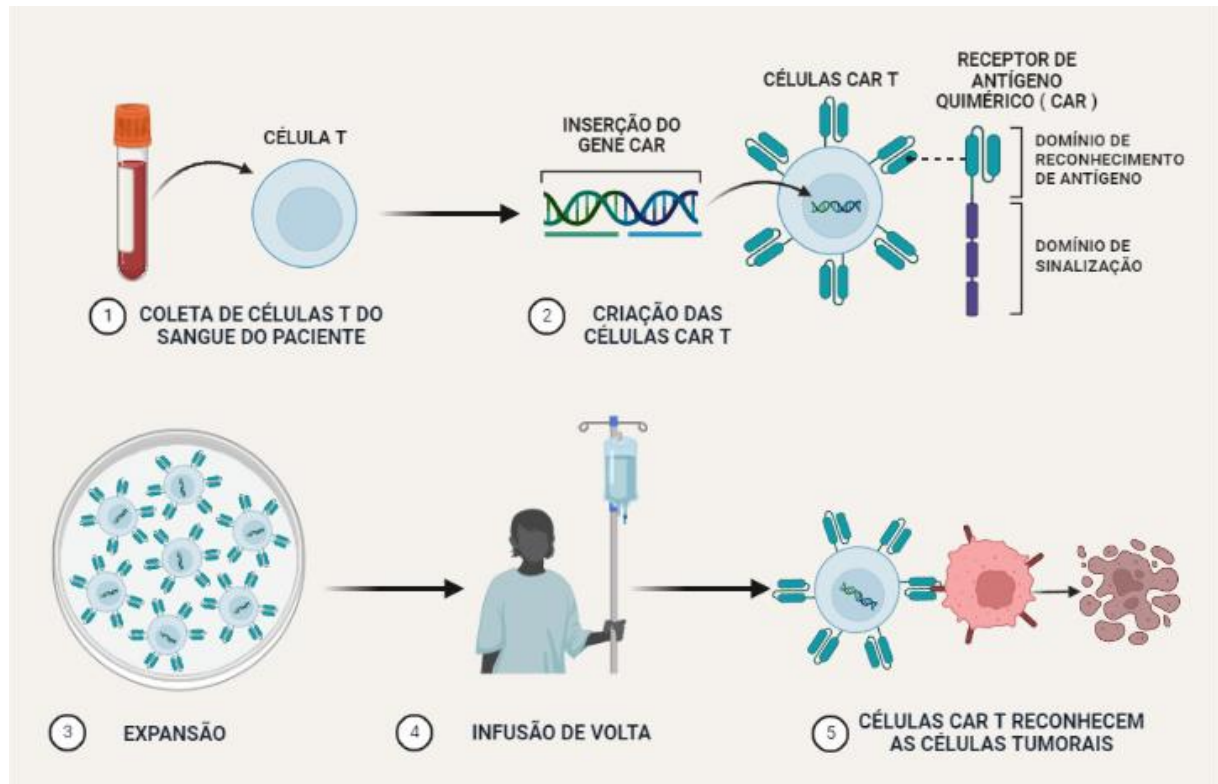
quinta geração em desenvolvimento compreende o domínio da cadeia β do receptor de IL-2 que promove ainda mais o cassete de citocinas.

4.3 PROTOCOLO DE USO DA TERAPIA

Em um processo natural do organismo, células mutantes e células cancerosas podem ser reconhecidas e eliminadas por células imunes. As células T dependem da estrutura do TCR, presente em suas membranas, e da apresentação do MHC para identificar os antígenos tumorais expressos nas células cancerígenas, enquanto as células CAR-T dependem apenas da estrutura do CAR projetada (HAN et al., 2021).

As terapias com células T CAR geralmente utilizam células T autólogas, pois as terapias alogênicas podem apresentar um risco maior de reações imunogênicas por serem provenientes de um doador não próprio. O processo inicia com a leucaférese para isolar os glóbulos brancos do paciente. A leucaférese geralmente ocorre ao longo de várias horas, durante as quais o sangue do paciente é tratado com anticoagulantes e centrifugado para remover o excesso de hemácias e plaquetas. Uma vez que os leucócitos tenham sido isolados, através de citometria de fluxo, serão encaminhados para ativação, transdução viral e expansão. Para desencadear mecanismos de morte de células T, as células T CAR devem ser ativadas por meio do reconhecimento de antígeno. O processo de ativação mais comumente usado é independente da apresentação do antígeno e envolve a cultura de células T com grânulos revestidos com fragmentos de anticorpos CD3/CD28, juntamente com suplementação de IL-2 (PISCOPO et al., 2018). Posteriormente, para que ocorra a inserção dos genes codificadores do CAR na célula-alvo, são necessários veículos conhecidos como vetores, que são divididos quanto sua forma de construção. Esses vetores são moléculas que possuem capacidade de carrear, transferir e expressar genes heterólogos para células-alvo do hospedeiro (OLIVEIRA, 2018). Para esta etapa, podem ser utilizados vetores não virais (plasmídeos, eletroporação) ou virais (via lentivírus, retrovírus etc.) Por fim, pega-se um clone desta célula T modificada e após a confirmação da expressão do receptor CAR, as células T CAR modificadas serão multiplicadas in vitro para uma quantidade suficiente antes de ser infundida de volta ao paciente. Antes da transfusão, o paciente recebe quimioterapia linfodepletora, que demonstrou aumentar a persistência da terapia com células T CAR (Figura 3) (LIN et al., 2020).

Figura 3: Desenho esquemático do protocolo de uso da terapia com células T CAR.



Fonte: Esquema criado pelos autores do trabalho. Protocolo de terapia de células T CAR: (1) células T coletadas do sangue periférico do paciente. (2) Antígeno artificial e domínios coestimuladores são projetados em células T. (3) Amplificação de células T CAR em quantidade suficiente. (4) Infundir células T CAR de volta ao corpo do paciente após a linfodepleção. (5) Células CAR-T reconhecem e destroem células tumorais.

Quando são transfundidas no paciente e se ligam a antígenos tumorais específicos, as células CAR-T iniciam a ativação por meio de fosforilação e proliferação em grande número. A resposta anticancerígena é principalmente via citotoxicidade e secreção de citocinas. As células CAR-T positivas para CD8 desempenham um papel essencial na destruição de células tumorais. As células CAR-T CD4-positivas executam um papel auxiliar que pode fortalecer a reação imune antitumoral. As células CAR-T realizam citotoxicidade secretando granzima e perforina que podem danificar as células tumorais. A outra forma de citotoxicidade é estimular a apoptose induzida pela ativação de vias de sinalização apoptótica dentro das células cancerígenas. As citocinas liberadas pelas células CAR-T aumentam a eliminação do tumor através da ativação de múltiplas células imunes e gerando efeitos de sinergia (HAN et al., 2021).

4.4 TERAPIA DE CAR-T CELL EM DOENÇAS ONCO-HEMATOLÓGICAS

Nos últimos anos, a imunoterapia com células CAR-T alcançou resultados altamente eficazes no tratamento de malignidades hematológicas e teve um alto progresso na busca por antígenos alvo, domínios de sinal intracelular e a aplicação combinada de células imunes e drogas sintéticas de moléculas pequenas (PEREIRA et al., 2019). Kymriah e Yescarta foram o primeiro lote de medicamentos para células T CAR a serem recomendados pela FDA nos Estados Unidos para o tratamento de leucemia e linfoma em agosto de 2017 e outubro de 2017, respectivamente (MA et al., 2019).

Segundo o portal de notícias do Ministério da Saúde, recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) também aprovou o primeiro registro sanitário no Brasil para produto de terapia gênica baseada em células T de receptores de antígenos quiméricos (CAR). O Kymriah® (tisagenlecleucel), da empresa Novartis Biociências S.A, é um produto de terapia avançada para pacientes pediátricos e adultos jovens (até 25 anos de idade) com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) de células B, refratária ou a partir da segunda recidiva. O tratamento está igualmente indicado para pacientes adultos com Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) recidivado ou refratário, após duas ou mais linhas de terapia sistêmica. Além da Anvisa, o produto também foi aprovado por outras autoridades regulatórias como a European Medicines Agency (EMA) na Europa e a Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) no Japão (Ministério da Saúde, 2022).

Embora a imunoterapia tenha mostrado sucesso em uma ampla variedade de cânceres, incluindo alguns tumores sólidos, existem algumas características únicas de malignidades hematológicas neste cenário que favorecem esses cânceres como alvos da imunoterapia (BACHIREDDY et al., 2015). A primeira é a sensibilidade ao ataque imunológico, além disso, as células do sistema imunológico e as células da malignidade estão em constante contato umas com as outras dentro do sistema hematopoiético, tornando o ambiente propício à vigilância imunológica constante (IM et al., 2017). Atualmente, vários ensaios estão em andamento, e uma lista de antígenos atuais visando diferentes malignidades hematológicas estão sendo estudados, tal como novos antígenos para leucemia linfóide aguda e busca de

antígenos específicos para tratamento de mieloma múltiplo, linfomas, leucemia mieloide crônica, leucemia mieloide aguda, entre outros (LIN et al., 2020).

4.5. TERAPIA DE CAR-T CELL EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

4.5.1. Visão geral da LMA

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as leucemias agudas resultam de uma transformação maligna das células hematopoéticas primitivas, seguida de uma proliferação clonal e conseqüente acúmulo dessas células transformadas. A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) sofre, caracteristicamente, uma parada maturativa celular na fase de blastos e promielócitos, levando à redução de células normais no sangue periférico. O evento inicial que determina a proliferação neoplásica é desconhecido, mas é resultante de mutação somática e ocorre na célula-tronco (stem cell) comprometendo a maturação mielóide. A incidência da LMA ajustada por idade é de 3,6 casos novos por 100.000 habitantes por ano, com uma idade mediana ao diagnóstico de 66 anos (INCA, 2021).

As deficiências da hematopoiese na medula óssea, com a substituição das células normais por células imaturas que nela se acumulam, resultam numa insuficiência funcional da medula óssea que, em conseqüência, se expressa clinicamente por anemia, sangramento, infecções e síndrome de hiperviscosidade. A medula óssea e o sangue periférico são principalmente caracterizados por leucocitose com predomínio de células imaturas (INCA, 2021).

A etiologia da LMA é heterogênea. Em alguns pacientes, a exposição prévia a agentes terapêuticos, ocupacionais ou ambientais que danificam o DNA está implicada, mas a maioria dos casos de LMA permanece sem uma etiologia elucidada. A LMA é a forma mais comum de leucemia aguda em adultos e tem a sobrevida mais curta (sobrevida em 5 anos = 24%) (SHALLIS, 2019). Por conta disso, a identificação da doença em seu estágio inicial e o encaminhamento ágil e adequado para o atendimento especializado corroboram por um melhor resultado terapêutico e prognóstico dos casos (INCA, 2021).

4.5.2. Diretriz terapêutica convencional

Atualmente, o tratamento da LMA exige uma quimioterapia inicial de indução de remissão, com o objetivo de atingir remissão completa (RC) da doença e consequente restauração das células sanguíneas normais. Esta fase é seguida por uma terapia de pós-remissão para erradicar a doença residual mínima (DRM). A cura da LMA ocorre ainda numa minoria de pacientes adultos que se submetem aos diversos protocolos de quimioterapia e, nos casos de prognóstico intermediário ou desfavorável, os resultados do transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (alo-TCTH) ou autólogo (auto- TCTH) são melhores do que os obtidos com a quimioterapia padrão. As indicações de TCTH devem seguir os critérios do Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes (INCA,2021).

A recaída após a quimioterapia convencional continua sendo um grande problema em pacientes com malignidades mieloides, e a principal causa de morte após o diagnóstico de LMA é a doença recidivante. A única opção de tratamento potencialmente curativo atualmente disponível é o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, que por meio de seus efeitos enxerto versus leucemia tem a capacidade de eliminar células leucêmicas residuais. Apesar de sua longa história de sucesso, a recidiva após alo-TCTH ainda é um grande desafio e está associada a mau prognóstico (MARDIANA, 2020).

Independentemente da idade, o objetivo inicial do tratamento da LMA é atingir a RC (medula óssea com menos de 5% de mieloblastos e, no sangue periférico, neutrófilos acima de 1.000/mm³ e plaquetas acima de 100.000/mm³) para o controle da hematopoese. Para ser considerado potencialmente curado, os pacientes devem permanecer em RC por 2 a 3 anos, quando, então, o risco de recaída da LMA diminui seguramente para menos de 10% (INCA, 2021)

4.5.2.1. Dificuldades na terapia convencional

Como citado anteriormente, a LMA requer uma quimioterapia intensiva para tratamento, muitas vezes em conjunto com transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e terapias molecularmente direcionadas. Uma combinação de dois agentes altamente citotóxicos, citarabina e daunorrubicina, tem sido o tratamento padrão para pacientes com LMA por mais de quatro décadas e apesar do

uso de terapia altamente tóxica, a atual sobrevida global em 5 anos de pacientes com LMA é inferior a 30% (PRATAP e ZHAO, 2020).

Além disso, geralmente são aplicáveis a uma minoria de pacientes que são mais jovens e aptos, enquanto a maioria dos indivíduos mais velhos apresenta prognóstico e sobrevida ruins. As diferenças nos resultados dos pacientes são influenciadas pelas características da doença, acesso aos cuidados, incluindo terapias ativas e cuidados de suporte, e outros fatores. Após muitos anos sem avanços terapêuticos, várias novas terapias foram aprovadas e espera-se que impactem os resultados dos pacientes, especialmente para pacientes mais velhos e aqueles com doença refratária (SHALLIS, 2019).

Os maus resultados apresentados pelos pacientes destacam o fato de que a atual diretriz terapêutica contra a LMA é restrita e há uma necessidade urgente de descobrir novas modalidades terapêuticas (PRATAP e ZHAO, 2020).

4.5.3. Nova abordagem terapêutica: células CAR T

Tendo em vista que a LMA continua sendo uma malignidade rara, mas altamente letal e que a compreensão da doença progrediu significativamente, novas terapias em evolução, como a aplicação de células CAR T, buscam por uma melhor sobrevida e um tratamento menos tóxico (MARDIANA, 2020).

No campo da terapia adotiva, o maior êxito na terapia celular utilizando CAR até o momento, dirigiu-se ao tratamento de neoplasias hematológicas, principalmente células T CAR CD19 empregadas para LLA-B, com taxas de respostas de 94%, para linfomas não Hodgkin com 66% de eliminação clonal e 91% para leucemia linfóide crônica (PEREIRA, 2019). Esforços têm sido destinados a aplicar esse sucesso para malignidades mielóides, embora seu principal desafio seja a ausência de um antígeno específico para células neoplásicas, pois estes são frequentemente coexpressos em células normais (SHALLIS, 2019).

4.5.3.1. Dificuldades na aplicação da CAR T cell em LMA

Como citado anteriormente, no caso da leucemia mieloide aguda, identificar o alvo ideal continua sendo um grande desafio. Esses alvos não devem ser expressos em tecidos normais a fim de minimizar a toxicidade sistêmica fora do tumor. Além disso, devem ser expressos em todas as células tumorais e apresentar coexpressão

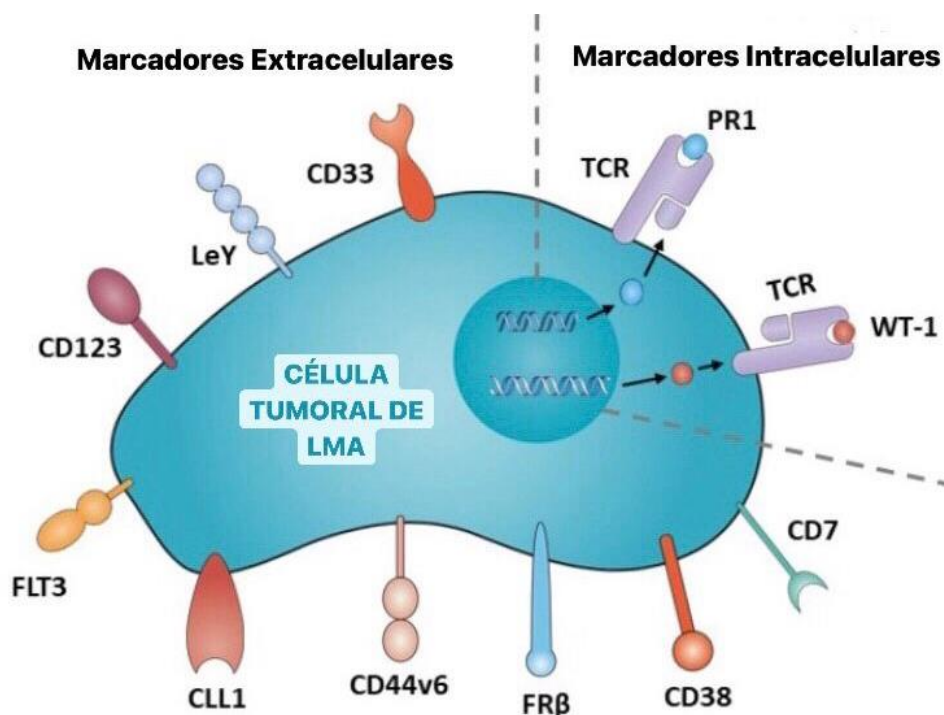
para superar a heterogeneidade clonal e evitar o escape do antígeno (HOFMANN, 2019).

Portanto, devido a expressão não restritiva a células tumorais, a maioria das terapias com células CAR T anti-LMA leva a uma mielotoxicidade significativa e prolongamento da fase citopênica. Essa imunossupressão coloca o paciente em risco de infecções bacterianas, fúngicas e virais graves e pode ser fatal. Além disso, por ter sua funcionalidade mediada por citocinas fortes, como IL-2, IL-6 e proteínas C-reativas, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios em grandes quantidades, ocasionando diversos efeitos sistêmicos e podendo levar a Síndrome de liberação de citocinas (SRC) (PRATAP e ZHAO, 2020).

4.5.4. Alvos para leucemia mieloide aguda

Existem uma série de antígenos que estão sendo estudados para terapia com células CAR T em leucemias mieloides, ilustrados na figura 4. Dentre eles, os mais promissores serão expostos.

Figura 4: Desenho representativo dos potenciais antígenos alvo para terapia com CAR T cell na leucemia mieloide aguda.



Fonte: Adaptado de Hofmann, 2019. Marcadores estudados para utilizar como antígeno na LMA. (1) Marcadores extracelulares serão reconhecidos pelo CAR para iniciar a resposta imunológica. (2) marcadores intracelulares, responsáveis pela sinalização intracelular.

4.5.4.1. CD7

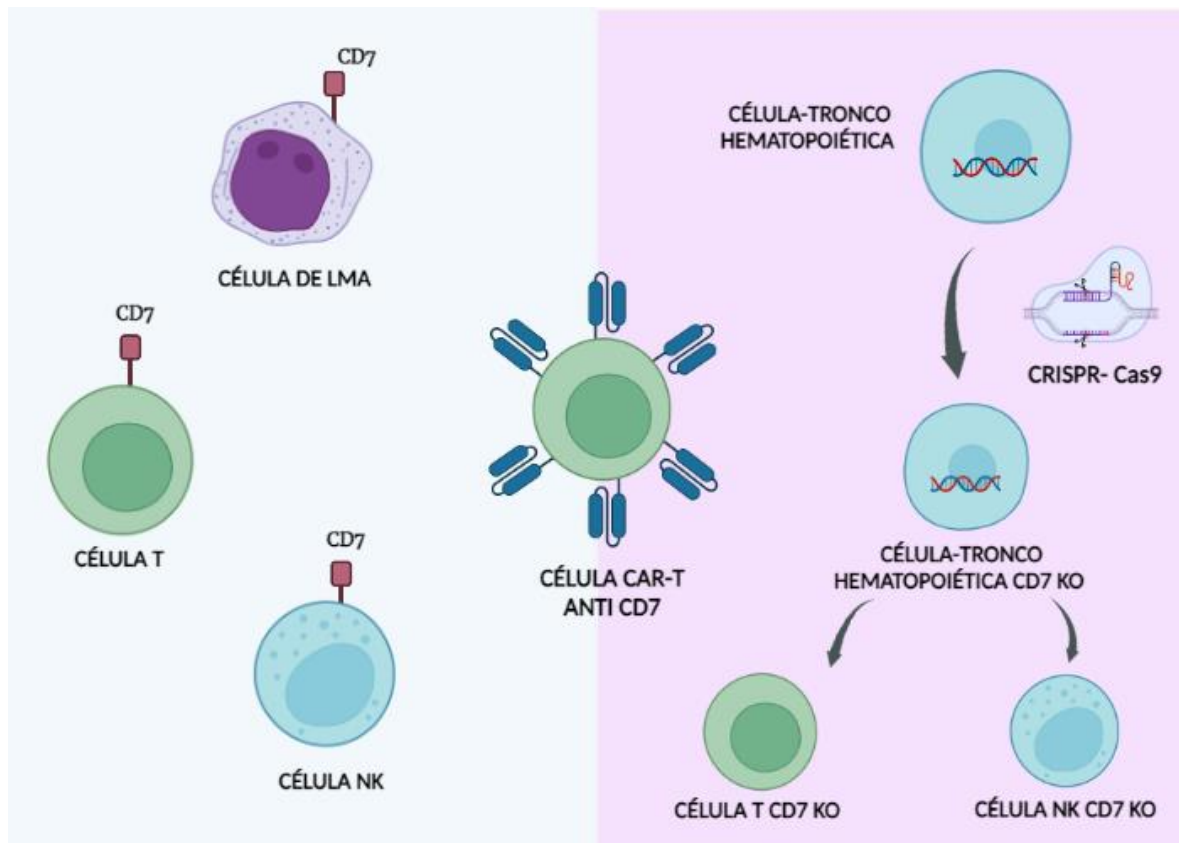
O cluster de diferenciação 7 é uma glicoproteína transmembrânica expressa por blastos leucêmicos e células progenitoras malignas de aproximadamente 30% dos pacientes com LMA. Em Gomes-Silva et al., foi demonstrado que sua expressão em células T e Natural Killers maduras, é inexpressiva. Entretanto, encontra-se presente em seus precursores. (KITA et al., 2003)

Sendo assim, os efeitos adversos em células eritróides e mielóides normais são mínimos, pois apresentam baixa expressão do receptor. Contudo, as células T e NK estão mais susceptíveis a tais efeitos uma vez que expressam a proteína em sua membrana citoplasmática. Tendo em vista que as células CAR-T percorrem a corrente sanguínea por no mínimo 3 meses, poderia ser ocasionada uma linfopenia prolongada por reconhecerem o antígeno nos linfócitos presentes e eliminá-los. (GOMES-SILVA et al., COOPER; DIPERSIO, 2019)

Portanto, para o uso de células CAR-T CD7 torna-se necessária a remoção do antígeno CD7, a fim de minimizar o fratricídio de linfócitos (Figura 5). Um estudo conduzido por Gomes-Silva et al., demonstrou que um CAR anti-CD7 em células T desativadas de CD7 para prevenir morte de células saudáveis, pode efetivamente eliminar linhagens celulares LMA CD7+, bem como células LMA primárias, poupando células progenitoras mielóides e eritróides normais (GOMES-SILVA et al., 2019; HOFMANN et al., 2019).

Em um modelo de xenoenxerto, as células T CD7 CAR protegem os camundongos contra a leucemia sistêmica, prolongando a sobrevivência normais (GOMES-SILVA et al., 2019).

Figura 5: Desenho esquemático da remoção do gene codificador do antígeno CD7 dos precursores de células T e Natural Killers.



Fonte: Adaptado de Kim et al., 2021. Estratégia utilizada por Kim e seus colaboradores para realizar o knockdown dos genes responsáveis pelo CD7 utilizando CRISPR/Cas9 em células-tronco hematopoéticas normais, fazendo com que estas células originem células T e NK ausentes de CD7, tornando-as utilizáveis para a terapia com células CAR-T.

4.5.4.2. CD33

O CD33 é expresso em até 90% das células blásticas leucêmicas, mas também em células progenitoras mielóides e mielóides saudáveis, com isso, atualmente existem muitas atividades considerando a terapia anti-CD33 CAR (GRIFFIN et. al., 1984; HOFMANN et al., 2019).

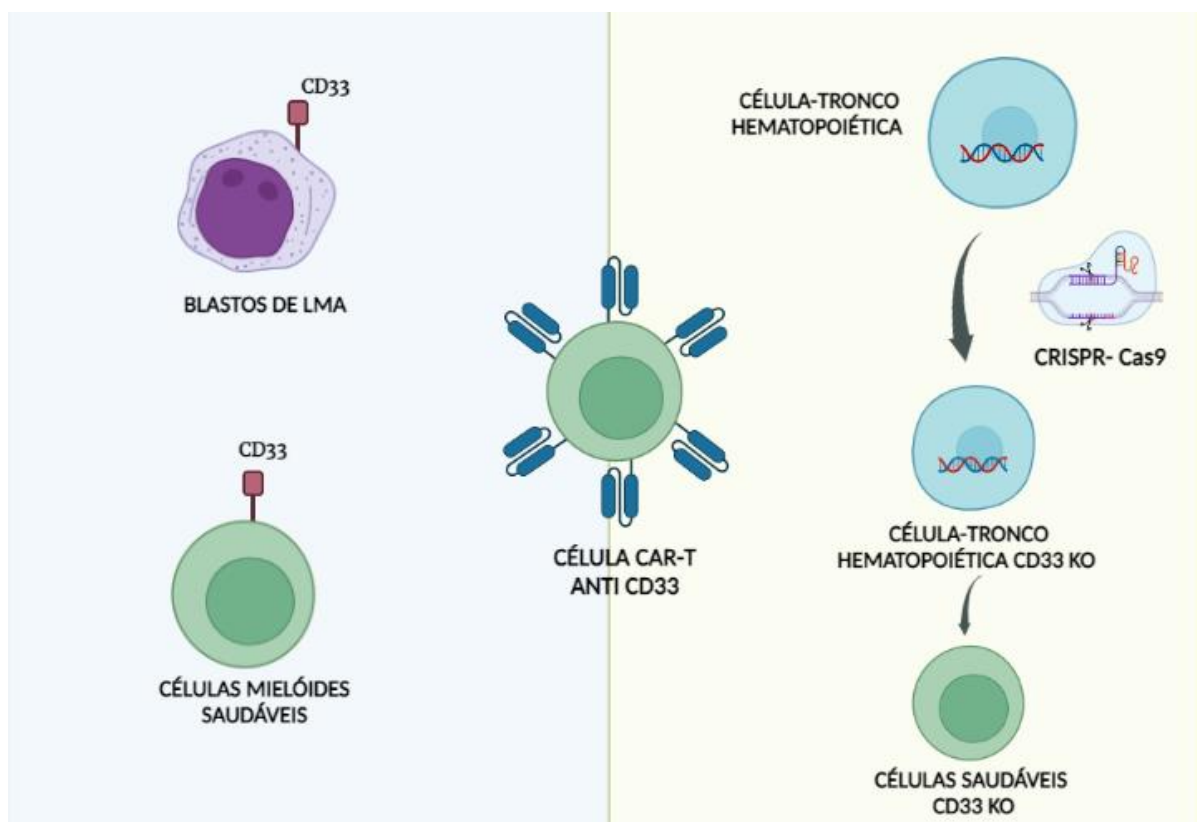
Desde o desenvolvimento do Gemtu zumab (Mylotarg®, Pfizer, Alemanha), um anticorpo antiCD33 humanizado conjugado com drogas, o CD33 tem sido considerado um alvo atraente para imunoterapia (KIM et al, 2018)

Kim et al., (2018) tentaram resolver o problema da mielotoxicidade por meio da edição de genes com CRISPR/Cas9 knockdown de CD33 em células-tronco

hematopoiéticas normais, tornando-as resistentes à terapia T-CAR dirigida por CD33 (Figura 6) (KIM et al, 2018).

Além disso, estudos com macacos rhesus demonstraram que a terapia com células T CAR antiCD33 transfundidas após transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas (HSPC) foi eficaz na eliminação de células leucêmicas sem qualquer sinal de mielotoxicidade. Essas observações justificam mais pesquisas sobre o tratamento com células CAR-T anti CD33 em LMA refratária e podem estimular esforços para estender a carga tumoral induzida por CART-33 para a preparação de outras estratégias intensivas, como o transplante de células-tronco.

Figura 6: Desenho esquemático da estratégia utilizada por Kim e seus colaboradores para remover o antígeno codificador do CD33 de células saudáveis.



Fonte: Adaptado de Kim et al., 2018. Estratégia utilizada por Kim e seus colaboradores para realizar o knockdown dos genes responsáveis pelo CD33 utilizando CRISPR/Cas9 em células-tronco hematopoiéticas normais, fazendo com que estas células sejam resistentes à terapia T-CAR voltada para o CD33.

4.5.4.3. CD123

CD123 é a cadeia alfa transmembrana do receptor de interleucina 3, está presente na membrana plasmática e possui papel de ajudar na transmissão de sinal realizada pela IL-3. Este foi um dos primeiros antígenos descrito como alvo para terapia celular (PRATAP e ZHAO, 2020).

Devido à sua expressão de superfície e sua superexpressão em blastos LMA e células-tronco leucêmicas, bem como sua baixa expressão em células-tronco hematopoéticas normais, CD123 se qualifica como um alvo adequado (JORDAN et al., 2000; JIN et al., 2009)

O antígeno CD123 vem sendo testado por vários centros em diferentes cenários visando células CAR T e anticorpos, estes vêm apresentando resultados promissores para pacientes com LMA (PRATAP e ZHAO, 2020).

As células T que expressam CAR específico para CD123 e EGFR truncado (células T antiCD123-CD28-CD3 ζ -EGFRt+) estão sendo testadas em pacientes com LMA após linfodepleção. Os primeiros resultados deste estudo foram encorajadores, com muitos pacientes apresentando respostas completas e parciais. Outro grupo está testando células T CAR anti-CD123 para o tratamento da síndrome mielodisplásica e encontrou resultados encorajadores durante estudos in vitro e xenoenxerto (PRATAP e ZHAO, 2020). Além disso, nos experimentos realizados por Pizzitola e colaboradores (2014), o objetivo era pesquisar a eficiência do CAR T contra CD123 e CD33 para LMA in vivo. Os resultados obtidos demonstraram redução da carga tumoral em 73 vezes em comparação ao grupo controle utilizando células CIK.lewis s (PIZZITOLA et al., 2014).

Em estudos secundários foi proposto a eficácia do CAR CD123 em amostras de pacientes LMA recidivantes. Nos xenoenxertos inseridos em camundongos NOD, os efeitos citotóxicos da imunoterapia alcançaram 67% das células leucêmicas (MARDIROS, 2015), mostrando eliminação eficiente de células LMA+ in vivo que possuem características de resistência a quimioterápicos, propondo que o CAR CD123 seja uma alternativa de tratamento para sujeitos que não respondem aos tratamentos preconizados para a doença (MARDIROS, 2015; PIZZITOLA et al., 2014).

4.5.4.4. LEWIS Y

Lewis Y (LeY) é um antígeno de carboidrato difucosilado que é superexpresso em cânceres hematológicos como LMA, bem como em algumas malignidades não hematológicas. (PRATAP e ZHAO, 2020).

A terapia CAR para LeY foi uma das poucas pesquisas no campo da terapia celular para leucemias mieloides que foram empregadas e liberadas em seres humanos. Um estudo de fase I foi conduzido para avaliar a segurança e a persistência pós-infusão de células T transferidas de forma adotiva. Este estudo recrutou cinco pacientes com recidivas de LMA, com infusão de células T possuindo CAR para LeY variando entre 14-38%, sendo observado viabilidade celular de 96%. Não foram observadas toxicidades de grau 3 ou 4, demonstrando que as infusões foram toleradas. A melhor resposta foi a remissão citogenética transitória em um paciente; outro paciente apresentou redução transitória de blastos e dois pacientes apresentaram doença estável. Todos os pacientes recaíram após 28 dias a 23 meses após a terapia celular adotiva. Além disso, através da técnica PCR, foi possível demonstrar que as células CAR T persistiram em alguns pacientes por até 10 meses (RITCHIE et al., 2013).

4.5.4.5. CD38

O CD38 é expresso na maioria dos blastos da LMA, mas não nas células-tronco hematopoiéticas humanas saudáveis (TERSTAPPEN et al., 1992).

Este antígeno é conhecido por ser expresso na maioria das células LMA e mieloma, e sua falta de expressão em células-tronco hematopoiéticas (HSCs) o torna um potencial alvo terapêutico para LMA recidivante. Para investigar a eficácia terapêutica clínica e a segurança das células T do receptor de antígeno quimérico direcionado a CD38 (CAR-T-38), foram recrutados 6 pacientes com LMA que apresentaram recaída pós-alo-HSCT. Antes do tratamento com CAR-T-38, os blastos na medula óssea desses pacientes exibiam uma mediana de 95% (92-99%) de positividade para CD38. Quatro semanas após a infusão inicial de células CAR-T-38, quatro dos seis (66,7%) pacientes alcançaram remissão completa (RC) ou RC com recuperação incompleta da contagem (RCi); a mediana do tempo CR ou CRi foi de 191 (intervalo 117-261) dias. A taxa de recaída cumulativa em 6 meses foi de 50%. Os tempos medianos de sobrevida global (OS) e sobrevida livre de leucemia (LFS)

foram de 7,9 e 6,4 meses, respectivamente. Um caso recaiu 117 dias após a primeira infusão de células CAR-T-38, com remissão alcançada após a segunda infusão de células CAR-T-38. Todos os seis pacientes experimentaram efeitos colaterais clinicamente gerenciáveis. Além disso, a citometria de fluxo multiparamétrica (FCM) revelou que as células CAR-T-38 eliminaram blastos positivos para CD38 sem efeitos fora do alvo em monócitos e linfócitos. Embora este estudo prospectivo tenha um número limitado de casos e um tempo de acompanhamento relativamente curto, nossos dados preliminares destacam a utilidade clínica e a segurança da terapia celular CAR-T-38 no tratamento de LMA recidivante pós-aló-TCTH (CUI et al., 2021)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imunoterapia vem substituindo ou complementando diversos métodos de tratamento convencionais, como é o exemplo da quimioterapia na leucemia linfoblástica aguda que está sendo integrada com o tratamento por celular CAR T, um dos fatores que pode explicar este fato são os benefícios do uso da imunoterapia frente as terapias convencionais, visto que a terapia imunológica causa menos efeitos colaterais ao paciente e é menos invasiva tornando mais apropriada ao uso. Estes fatos levam a uma busca incessante para encontrar novos métodos imunoterápicos e para implementa-los em outras doenças, dentre elas a LMA.

Os caminhos para o desenvolvimento, aperfeiçoamento e padronização de um novo método para uma doença agressiva como a LMA são muito difíceis e demandam tempo e investimento financeiro, além da dificuldade burocrática de se realizar pesquisas voltadas a procedimentos em humanos.

No entanto diversas pesquisas vêm sendo feitas com objetivo de encontrar um antígeno compatível para a LMA, sendo algumas delas já testadas em animais. Esta projeção sugere que a utilização de células CAR-T em LMA está cada vez mais próxima, outrossim se dá pelo fato do uso do receptor de antígeno quimérico já ser aprovado em outras doenças onco-hematológicas, facilitando sua implementação para outras leucemias. Todavia, este método imunoterápico ainda deve ser desenvolvido e testado em pesquisas clínicas, sendo um projeto futuro. A célula CAR T se mostra uma estratégia promissora, tendo em vista seus benefícios comparados às terapias convencionais de LMA.

6. REFERÊNCIAS

ABBOTT, Maura et al. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. **Semin Oncol Nurs**, New York, NY v. 35, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31526550/>. Acesso: 7 jan. 2022.

BACHIREDDY, Pavan et al. Hematologic malignancies: at the forefront of immunotherapeutic innovation. **Nat Rev Cancer**, v. 15, p 201-215, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4511812/>. Acesso: 20 de março de 2022.

BETTINI, Matthew et al. Cutting Edge: CD3 ITAM Diversity Is Required for Optimal TCR Signaling and Thymocyte Development. **J Immunol**. v. 199, p. 1555-60, set 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5568475/>. Acesso: 16 fev 2022.

BROCKER, T. Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. **Blood**. Basel, Switzerland, v. 96, p. 1999-2001, set 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10961908/>. Acesso: 17 fev 2022

BUECHNER, Jochen et al. Global registration trial of efficacy and safety of ct1019 in pediatric and young adult patients with relapsed/refractory (r/r) acute lymphoblastic leukemia (all): update to the interim analysis. **European Hematology Association**, Hall E, 2017. Disponível em: <https://library.ehaweb.org/eha/2017/22nd/181763/stephan.a.grupp.global.registration.trial.of.efficacy.and.safety.of.ct1019.in.html>. Acesso: 18 de março de 2022.

BULK, Jitske et al. Cancer immunotherapy broadening the scope of targetable tumours. **The Royal Society Publishing**, v. 8, n.6, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6030119/>. Acesso em: 5 jan. 2022

CAMPANA, D et al. Immunophenotyping of leucemia. **J Immunol Methods**, v. 243(1-2), p 59-75, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10986407/>. Acesso: 20 de abril de 2022.

CAMPANA, D et al. Stages of T-cell receptor protein expression in T-cell acute lymphoblastic leucemia. **Blood Rev**, v. 7, p 1546-54, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1826223/>. Acesso: 20 de abril de 2022.

COOPER, Mathew et al., Chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) for the treatment of T-cell malignancies. **Best Practice & Research Clin Haematology**, v.32, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31779968/>. Acesso: 04 de julho de 2022.

CUI, Q. CD38-directed CAR-T cell therapy: a novel immunotherapy strategy for relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **J Hematol Oncol**, v. 14, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34034795/>. Acesso: 10 de maio de 2022.

DOBOSZ, Paula et al. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. **Front Immunol**, Warsaw, Poland v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6928196/>. Acesso em: 10 jan. 2022.

FARKONA, Sofia et al. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?. **BMC Med**, v. 14, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4858828/>. Acesso em: 6 jan. 2022.

GOMES-SILVA, Diogo. CD7 CAR T Cells for the Therapy of Acute Myeloid Leukemia. **Mol Ther**, v. 27, p. 272-280, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30391141/>. Acesso: 02 de maio de 2022.

GRIFFIN, Jd. A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells. **Leuk Res**, v. 8, p. 521-34, 1984. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6590930/>. Acesso: 02 de maio de 2022.

HAN, D. et al., Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Hematological Malignancies. **J Cancer**, v. 12, p. 326-334, jan 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33391429/>. Acesso: 03 mar 2022.

HOFMANN, S et al. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy in acute myeloid leukemia (AML). **Journal of clinical medicine**, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30736352/>. Acesso: 18 de abril de 2022.

HUDECEK, Michael et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. **Clin Cancer Res**. v. 19, p. 3153-64, jun 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3804130/>. Acesso: 16 fev 2022.

IKI S, et al., Prevention and treatment of the side effects of cancer chemotherapy, **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 11, p. 1635-40, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11057312/>. Acesso: 13 de julho de 2022.

IM, Annie et al. Immunotherapy in hematologic malignancies: past, present, and future. **J Hematol Oncol**, v. 10, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28434396/>. Acesso: 22 de março de 2022.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Leucemia. In: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Tipos de câncer. Instituto Nacional do Câncer, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia/profissional-de-saude>. Acesso em: 05 nov. 2021

JAYARAMAN, Jayapriya et al. CAR-T design: elements and their synergistic function. **Ebiomedicine**, [s.l.], v. 58, p. 102931, ago 2020. Elsevier BV. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7393540/>. Acesso: 15 fev 2022.

JIN, L. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 5, p. 31-42, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19570512/>. Acesso em: 05 de maio de 2022.

JORDAN, Ct. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. **Leukemia**, v. 14, p. 1777-1784, 2000.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11021753/>. Acesso: 03 de maio de 2022.

KANSARA, R.R et al. Immunotherapy in hematologic malignancies. **Curr Oncol**, Winnipeg, MB, Canada v. 27, p .124-131, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7193997/>. Acesso em: 6 jan. 2022.

KENDERIAN, Ss. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leucemia. **Leukemia**, v. 29, p 1637-1647, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25721896/>. Acesso: 03 de maio de 2022.

KENNEDY, Lucy. A review of cancer immunotherapy toxicity. **CA Cancer J Clin**, v. 70, p. 86-104, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31944278/>. Acesso em: 6 jan. 2022.

KIM, Miriam et al. CD7-deleted hematopoietic stem cells can restore immunity after CAR T cell therapy. **JCI Insight**, 2021. Disponível em: <https://insight.jci.org/articles/view/149819>. Acesso: 22 de outubro de 2022.

KIM, Miriam et al. Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia, **HHS Public Access**, p 1439-1453, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29856956/>. Acesso: 07 de junho de 2022.

KITA, K et al., Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. The Japan Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma. **Blood**, v.81, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7683218/>. Acesso: 04 de julho de 2022.

KOBAYASHI, K. Lewis blood group-related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma, and gastric carcinoma. **Am J Gastroenterol**, v. 88, p 919-924, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8503388/>. Acesso: 09 de maio de 2022.

LIN, Wen-Ying et al. Gene Modified CAR-T Cellular Therapy for Hematologic Malignancies. **Int J Mol Sci**. v. 21, nov 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7697548/>. Acesso: 15 fev 2022.

MA, Shuo et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. **Int J Biol Sci**. v. 15, p 2548–2560, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6854376/>. Acesso: 17 de março de 2022.

MARDIANA, Sherly et al. CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32435621/> . Acesso: 15 de abril de 2022.

MARDIROS, Armen; FORMAN, Stephen J.; BUDDE, Lihua E. T cells expressing CD123 chimeric antigen receptors for treatment of acute myeloid leukemia. **Current Opinion in Hematology**, [s.l.], v. 22, n. 6, p. 484-488, nov. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26457961/>. Acesso: 17 de julho de 2022.

Ministério da Saúde. Anvisa aprova produto de terapia avançada para tratamento de câncer, c2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-produto-de-terapia-avancada-para-tratamento-de-cancer> Acesso: 20 de março de 2022.

NOH, Ji-Yoon et al. Immunotherapy in Hematologic Malignancies: Emerging Therapies and Novel Approaches. **Int J Mol Sci**, Yuseong-gu, Daejeon 34141, Korea v. 21, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7663624/>. Acesso em: 5 jan.2022.

PEINERT, S et al. Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. **Gene Therapy**. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20200563/> . Acesso em: 15 de julho de 2022..

PEREIRA, Viviane et al. Definição das terapias celulares com receptores de antígenos quiméricos (CAR), receptores de células t (TCR) e linfócitos infiltrantes de tumor (TIL). Perspectivas futuras para a cura do câncer. **Brazilian Journal of health Review**, Curitiba, v. 2, p 1105-1104, 2019. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/1307/1186>. Acesso: 17 de março de 2022.

PISCOPO, N. J. et al., Bioengineering Solutions for Manufacturing Challenges in CAR T Cells. **Biotechnol J.**, v. 13, n. 2, ago 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28840981/>. Acesso: 04 mar 2022.

PIZZITOLA, I et al. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo. **Leukemia**, [s.l.], v. 28, n. 8, p. 1596-1605, 7 fev. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24504024/>. Acesso: 15 de julho de 2022.

PRATAP, Suraj; ZHAO, Zhizhuang J. Finding new lanes: chimeric antigen receptor (car) t :cells for myeloid leukemia. **Cancer Reports**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 1-9, abr. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7941581/>. Acesso: 17 de julho de 2022.

RILEY, Rachel et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 18, p. 175-196, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6410566/>. Acesso em: 7 jan. 2022.

RITCHIE, David S. et al. Persistence and Efficacy of Second Generation CAR T Cell Against the LeY Antigen in Acute Myeloid Leukemia. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 11, p. 2122-2129, nov. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23831595/>. Acesso: 15 de julho de 2022.

SAKAMOTO, J. Expression of Lewisa, Lewisb, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. **Cancer Res**, v. 46, p 1553-1561, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3510728/>. Acesso: 09 de maio de 2022.

SCHILLING, Georgia et al. Basic principles of immunotherapy. **Radiologe**, v. 60, p. 682-686, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32681433/>. Acesso em: 10 jan. 2022.

SHALLIS, Rory et al. Epidemiology of acute myeloid leucemia: Recent progress and enduring challenges. **Blood Rev**, v.36, p 70-87, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31101526/>. Acesso: 12 de abril de 2022.

TAGUCHI, Side effects of cancer chemotherapy end steps to deal with them, **Gan to cagaku ryoho**, v. 14, p 2017-28, 1995. Disponível em: . Acesso: 15 de julho de 2022.

TERSTAPPEN, Lw. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia: IV. Comparison to the differentiation pathway of normal hematopoietic progenitor cells. **Leukemia**, v. 6, p 993-1000, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1383649/>. Acesso: 09 de maio de 2022.

THOKALA, R. Redirecting Specificity of T cells Using the Sleeping Beauty System to Express Chimeric Antigen Receptors by Mix-and-Matching of VL and VH Domains Targeting CD123+ Tumors. **PLoS One**, v. 11, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27548616/>. Acesso: 05 de maio de 2022.

TIFTIK, N et al. The importance of CD7 and CD56 antigens in acute leukaemias. **Int J Clin Pract**, v.2, p 149-52, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15055863/>. Acesso: 02 de maio de 2022.

VORMITTAG, P. et al., A guide to manufacturing CAR T cell therapies. **Curr Opin Biotechnol**, v. 53, p. 164-181, oct 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29462761/>. Acesso: 05 mar 2022.

WANG, Qs. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leucemia. **Mol Ther**, v. 23, p 184-191, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25174587/>. Acesso: 03 de maio de 2022.

WEINKOVE, Robert et al. Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. **Clin Transl Immunology**. v. 8, mai 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31110702/>. Acesso: 16 fev 2022.

YANG, Yiping et al. Cancer Immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. **J Clin Invest**, American Society for Clinical Investigation, USA v. 125, p. 3335-7, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588312/>. Acesso em: 5 jan.2022.

ZANG, Yuanyuan. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. **Cell Mol Immunol**, v. 17, p. 807-821, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7395159/>. Acesso em: 5 jan. 2022.

ZHANG, Cheng et al. Engineering CAR-T cells. **Biomarker Research**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 246-358, jun. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5482931/>. Acesso: 15 fev 2022.