

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS
TRONCO E TERAPIA CELULAR

FELIPE HADDAD

Avaliação dos danos em genes de reparo no processo de manufatura das
células T-CAR

Assessment of damage to repair genes in the CAR T-cell manufacturing
process

RIBEIRÃO PRETO

2023

FELIPE HADDAD

**Avaliação dos danos em genes de reparo no processo de manufatura das
células T-CAR**

**Assessment of damage to repair genes in the CAR T-cell manufacturing
process**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular

Dissertation presented to the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo to obtain the title of Master in Clinical Oncology, Stem Cells and Cellular Therapy

Orientador: Dr. Renato Luiz Guerino Cunha

Coorientadora: Dra. Maristela Delgado Orellana

RIBEIRÃO PRETO

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Haddad, Felipe

Avaliação dos danos em genes de reparo no processo de manufatura das células T-CAR Ribeirão Preto, 2023.

70p. : il. ., 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular

Programa: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular

Orientador: Dr. Renato Luiz Guerino Cunha

Coorientadora: Dra. Maristela Delgado Orellana

1. Terapia Celular 2. Células T-CAR. 3. Sequenciamento. 4. Genes de reparo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Haddad

Avaliação dos danos em genes de reparo no processo de manufatura das células T-CAR

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Área de concentração: Oncologia clínica e terapia celular

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha mais profunda gratidão a meus queridos amigos **Alexandre Sgobbi, Matheus Torelli, Luis Eduardo Nagle, Beatriz Franceschi, Gustavo Castilho, Bianca Braga, Enrico Braga, Ana Beatriz Mattos, Victória Thomazelli, Victória Becker, Lívia Hanashiro**, e todos os outros que estiveram ao meu lado ao longo desta jornada. Suas palavras de incentivo, apoio inabalável e alegria compartilhada tornaram os desafios mais leves e as conquistas mais significativas. Obrigado por serem minha âncora nos momentos difíceis e por celebrarem comigo nas vitórias. Seu amor e amizade são inestimáveis.

Minha família, **Renato Haddad (in memoriam), Ana Lucia Omori Haddad, Marcia Omori, Ricardo Haddad, Rodrigo Haddad, Iara Maria Haddad e Luzia Mathias** vocês são a fonte de minha inspiração e força. Suas palavras de encorajamento, paciência infinita e apoio financeiro e emocional permitiram que eu perseguisse meu mestrado. Sei que as noites tardias de estudo e as ausências foram desafiadoras, mas sua compreensão e amor inabaláveis me sustentaram. Sou eternamente grato por cada sacrifício que fizeram em prol do meu sucesso.

Quero agradecer a meus colegas de trabalho **Pamela Viani, Amanda Corveloni, Camila Storti, Natália Moschetta e Nathália Araújo** e a toda a equipe do Hemocentro, principalmente **Sâmia Giroto e Taísa Risque**, por seu apoio contínuo e compreensão durante este período de mestrado. Lidar com as demandas do trabalho e dos estudos foi um desafio, mas a colaboração e apoio de todos vocês fizeram a diferença. Sua ajuda e flexibilidade foram essenciais para que eu conseguisse conciliar essas duas esferas da minha vida. Espero conseguir retribuir da melhor forma possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão ao meu orientador e coorientador pelo inestimável apoio e orientação que me proporcionaram ao longo do meu mestrado. Sua expertise e dedicação foram fundamentais para o sucesso deste projeto, e sua disposição em compartilhar conhecimento e fornecer *feedback* valioso enriqueceu significativamente a minha jornada

acadêmica. Sou imensamente grato por ter tido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação e estou ansioso para continuar contribuindo para o campo da pesquisa com base no aprendizado que recebi.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

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

***perfer et obdura!
dolor hic tibi proderit olim;***

RESUMO

Haddad, F. Avaliação dos danos em genes de reparo no processo de manufatura das células T-CAR. 2023. Dissertação (Mestrado em ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

O *CAR-T CELL* (sigla em inglês para *chimeric antigen receptor T-cell*) ou células T-CAR são células T geneticamente modificadas para expressar um receptor de antígeno quimérico e, por isso, é classificada como uma modalidade de terapia celular avançada. Atualmente, seu uso é investigado no tratamento de doenças de inúmeras etiologias, porém tem seus melhores resultados no tratamento de doenças malignas refratárias, tais como as neoplasias de células B. Através dessa terapia, o sistema imunológico tem sua função otimizada, pois as células T, ao expressarem o novo receptor de antígeno quimérico (CAR), adquirem especificidade antigênica construída por manipulação *in vitro*, potencializando o reconhecimento do antígeno das células neoplásicas. Para que se possa produzir as células T-CAR, uma plataforma em escala clínica e com incontestável padrão de qualidade e segurança precisa ser desenvolvida. Atualmente, a terapia com as células T-CAR é indicada para pacientes refratários ou recaídos à inúmeras linhas de tratamento citotóxico, de tal forma que, são pacientes com alto risco potencial de apresentarem mutações genéticas ou dano de DNA. Por isso, potencial falha ou prejuízo no reparo ao dano do DNA poderia implicar em prejuízo no processo de manufatura das células T-CAR ou até mesmo inviabilizar a produção de células T-CAR autólogas para fins terapêuticos sendo assim, análises de genotoxicidade podem se tornar uma abordagem útil para a manufatura celular, podendo levar a compreensão de novas áreas de estudos genéticos e assim, possibilitando manejar de forma mais eficiente a manufatura das células T-CAR e ajudar clinicamente pacientes tratados com tal terapia.

Palavras-chave: terapia celular, células T-CAR; DNA; Genes de reparo;

ABSTRACT

Haddad, F. Assessment of damage to repair genes in the CAR T-cell manufacturing process. 2023. Dissertation (Master of Science). Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2023.

CAR-T cells (Chimeric Antigen Receptor T-cells), or CAR-T cells, are genetically modified T cells engineered to express a chimeric antigen receptor, making them a category of advanced cell therapy. Currently, their use is under investigation for the treatment of various etiologies of diseases, but they show the most promising results in the treatment of refractory malignant diseases, such as B-cell neoplasms. Through this therapy, the immune system's function is optimized, as T cells, by expressing the new chimeric antigen receptor (CAR), gain antigenic specificity constructed through in vitro manipulation, enhancing the recognition of neoplastic cell antigens. To produce CAR-T cells, a clinically scalable platform with unquestionable quality and safety standards must be developed. Currently, CAR-T cell therapy is indicated for patients refractory or relapsed after multiple lines of cytotoxic treatment, often those with a high potential risk of genetic mutations or DNA damage. Therefore, potential failure or impairment in DNA damage repair could result in setbacks in CAR-T cell manufacturing or even make the production of autologous CAR-T cells for therapeutic purposes unfeasible. Hence, genotoxicity analyses may become a useful approach for cellular manufacturing, potentially leading to the understanding of new areas of genetic studies and, thus, enabling more efficient management of CAR-T cell manufacturing and clinical assistance for patients treated with this therapy.

Keywords: cell therapy, CAR-T cells, DNA, DNA repair genes.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-IDENTIFICADOR DAS AMOSTRAS	25
TABELA 2-VALORES EXTRAÇÃO DNA	42
TABELA 3-DISCRICÃO DE FERRAMENTAS.....	43
TABELA 4-LEVANTAMENTO DE DADOS DE GENE DE REPARO	44
TABELA 5- GENES DE REPARO MUTADOS EM DOADORES	48
TABELA 6-DEMONSTRAÇÃO DE DOADORES EM ANÁLISE INDIVIAL.....	49
TABELA 7-GENES DE REPARO MUTADOS EM PACIENTES	50
TABELA 8-QUIMIOTERÁPICOS RELATADOS EM PRONTUÁRIOS.....	54
TABELA 9- REPRESENTAÇÃO DE VIABILIDADE E % DE CAR+	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PROCESSAMENTO T-CAR.....	20
FIGURA 2-IMPACTO EM VIAS DE REPARO E SUAS VIAS DE REPARO.....	21
FIGURA 3-OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	27
FIGURA 4-EXTRAÇÃO DE DNA	30
FIGURA 5-PROCESSOS EXECUTADOS	31
FIGURA 6-CITOMETRIAS PACIENTES CELULAS MONONUCLEARES.....	36
FIGURA 7-CITOMETRIAS DOADORES CELULAS MONONUCLEARES.....	38
FIGURA 8-CITOMETRIAS PACIENTES E DOADORES PÓS MANUFATURA ..	40
FIGURA 9-WORKFLOW BIOINFORMÁTICA	43
FIGURA 10-ANÁLISE ONCOPLOT DE DOADORES	46
FIGURA 11-ANÁLISE ONCOPLOT PACIENTES:	47
FIGURA 12-COMPARATIVO DE VIAS DE REPARO DOADORES	51
FIGURA 13-COMPARATIVO DE VIAS DE REPARO INDIVIDUAIS	52
FIGURA 14-COMPARATIVO DE VIAS DE REPARO PACIENTES	52
FIGURA 15-MANUFATURA QUANTITATIVA DE PACIENTES.....	55
FIGURA 16-MANUFATURA QUANTITATIVA DOADORES	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABL1	Não receptor Tirosina Quinase
ATR	Proteína reguladora da resposta a danos no DNA.
ATRIP	Proteína reguladora da resposta a danos no DNA.
BARD1	Proteína de ligação a BRCA1.
BAX	Proteína pró-apoptótica Bcl-2.
BBC3	Proteína pró-apoptótica Bcl-2.
BL	Histocompatibilidade 2
BRCA1	Proteína de susceptibilidade ao câncer de mama 1.
BRCA2	Proteína de susceptibilidade ao câncer de mama 2.
CDK7	Quinase dependente de ciclina 7.
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A.
CDC25A	Fosfatase de tirosina 25A.
CDC25C	Fosfatase de tirosina 25C.
CHEK1	Quinase do ponto de verificação 1.
CHEK2	Quinase do ponto de verificação 2.
CIB1	Proteína de ligação a cálcio 1.
CSNK2A2	Caseína quinase 2 subunidade alfa 2.
DDB1	Proteína de ligação a danos no DNA 1.
DDB2	Proteína de ligação a danos no DNA 2.
ERCC1	Endonuclease de reparo de excisão cruzada 1.
ERCC2	Helicase de reparo de excisão cruzada 2.
FANCA	Proteína de anemia de Fanconi A.
FANCD2	Proteína de anemia de Fanconi D2.
FANCG	Proteína de anemia de Fanconi G.
GADD45A	Proteína de resposta ao dano do DNA 45A.
GADD45G	Proteína de resposta ao dano do DNA 45G.
H2AFX	Histona H2A.X.
HUS1	Proteína de resposta ao dano do DNA HUS1.
LIG1	Ligase de DNA 1.
MDC1	Proteína de checkpoint de dano do DNA 1.
MLH1	Proteína de reparo de pareamento de bases 1.
MRE11	Endonuclease de reparo de DNA MRE11.
NBN	Proteína de susceptibilidade ao câncer de mama 1.
NTHL1	Glicosilase de timina endonuclease 1.
OGG1	Glicosilase de oxo-guanina endonuclease 1.
PARP1	Poli (ADP-ribose) polimerase 1.
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferativas.
PNKP	Fosfatase de nucleotídeo de polinucleotídeo quinase.
PRKDC	Proteína quinase dependente de DNA.
RAD17	Proteína de checkpoint de dano do DNA 17.
RAD18	Proteína de ligação a danos no DNA 18.
RAD21	Proteína de ligação a danos no DNA 21.
RAD50	Proteína de reparo de DNA RAD50.
RAD51	Proteína de reparo de DNA RAD51.
RAD51B	Proteína de reparo de DNA RAD51B.
RBBP8	Proteína de ligação a danos no DNA 8.
REV1	DNA polimerase zeta catalítica subunidade REV1.
RNF168	Proteína de ubiquitina ligase RNF168.

RNF8	Proteína de ubiquitina ligase RNF8.
RPA1	Proteína de replicação do DNA A1.
SIRT1	Proteína de deacetilase de histona 1.
SUMO1	Proteína pequena modificadora 1.
TP53	Proteína supressora de tumor p53.
TP53BP1	Proteína de ligação a p53 1.
TP73	Proteína supressora de tumor p73.
UNG	Glicosilase de uracila endonuclease.
XPA	Proteína de reparo de excisão cruzada A.
XPC	Proteína de reparo de excisão cruzada C.
XRCC1	Proteína de reparo de DNA XRCC1.
XRCC2	Proteína de reparo de DNA XRCC2.
XRCC3	Proteína de reparo de DNA XRCC3.
XRCC6	Proteína de ligação a DNA de extremidade aberta 6.
CD3	Grupamento de diferenciação 3
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
<i>CAR-T</i>	<i>chimeric antigen receptor T-cell</i>
CD3	Grupamento de diferenciação 3
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
<i>CAR-T</i>	<i>chimeric antigen receptor T-cell</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
CTLs	linfócitos T citotóxicos
TCR	receptor de superfície
CD19	Grupamento de diferenciação 19
CAR	receptores de antígeno quimérico
LLA	leucemia linfoblástica aguda de células B
LNH	linfoma de grandes células B
IL-2	Interleucina 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
MMR	Reparo de incompatibilidade
BER	Excisão de base
HR	Recombinação homóloga
NHEJ	Junção de extremidade não homóloga
NER	Reparo de excisão de nucleotídeos
CTC	Centro de terapia celular
PCCAR	Paciente CAR
DN	Doador normal
CMN	Células mononucleares
CAR+	Células modificadas geneticamente
HEA	Hidroxietilamido de baixo peso molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
FastQC	Controle de qualidade
MultiQC	Controle de qualidade
Cutadapt	Retirada de adaptadores
BWA	Alinhador
Picard	Ordenação, marcação de duplicados, indexação e validação
GATK	Realinhamento local e descoberta de variantes
VEP	Anotação das variantes.

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
%	Porcento
ζ	Zeta
α	Alfa
ng	Nanograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVOS GERAIS	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	25
4.1 PREPARAÇÃO DO MATERIAL.....	26
4.1.2 Depleção em garrafas	27
4.1.3 Enriquecimento celular com anticorpos monoclonais	28
4.1.4 Ativação celular	28
4.1.5 Transdução dos linfócitos e expansão celular	28
4.1.6 Remoção das beads magnéticas da cultura e determinação de beads residuais.....	29
4.1.7 Análise do produto final	29
4.2 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS T CD3 ⁺	29
4.2.1 Extração de DNA	30
4.2.3 Sequenciamento de nova geração.....	31
4.3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	32
4.3.1 Controle de qualidade Pré-alinhamento	32
4.3.2 Alinhamento das sequências	32
4.3.3 Processo pós-alinhamento.....	33
4.3.4 Realinhamento local e recalibração da qualidade.....	33
4.3.5 Controle de qualidade pós-alinhamento	33
4.3.6 Descoberta de variantes genéticas	34
4.3.7 Anotações de variantes	34
5 RESULTADOS	36
5.1 PURIFICAÇÃO CELULAR DAS AMOSTRAS.....	36
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	41
5.3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA E DADOS GENÉTICOS.....	42
5.4 LEVANTAMENTO DE PRONTUÁRIOS.....	53
5.5 ANÁLISE DE MANUFATURA.....	55
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Os linfócitos T ou as células T são células originadas na medula óssea de progenitores linfóides, que possuem a capacidade de se diferenciar em linfócitos com antígenos específicos possuindo desenvolvimento no timo. Esses precursores têm a função de proliferar, rearranjar os genes, codificando os subconjuntos do receptor antigênico dos linfócitos T e assim especificando antígenos que passam por outros graus posteriores de programação para executar a resposta imune (MURPHY, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Diferentemente dos linfócitos B, células T reconhecem peptídeos derivados de proteínas estranhas e que estejam ligados a proteínas de superfície das células hospedeiras, em um fenômeno denominado apresentação de antígenos. Essas proteínas presentes na superfície das células hospedeiras são conhecidas como moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) (FEINS; KONG; WILLIAMS; MILONE; FRAIETTA, 2019).

O reconhecimento antigênico dos linfócitos T pode ser agrupado em três grupos, de acordo com a função que exercem: os linfócitos T auxiliares, os linfócitos T citotóxicos (CTLs) e os linfócitos T reguladores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Os linfócitos T auxiliares têm como característica a expressão o marcador de superfícies CD4 (linfócitos T CD4+) e são capazes de produzir diversas citocinas que influenciam a atividade e o comportamento de outras células. As células T citotóxicas (ou linfócitos CD8+), são células efetoras que atuam, de forma específica, contra patógenos intracelulares ou processos tumorais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Os linfócitos T reguladores (linfócitos Treg) têm a função de auxiliar no controle da resposta imunológica e de suprimir a atividade linfocitária. A resposta imunológica mediada pelos linfócitos Treg tem como objetivo suprimir a resposta imunológica contra antígenos próprios, autoantígenos. (MURPHY, 2014).

Durante o processo de reconhecimento dos linfócitos T, receptores e co-receptores têm papel importante no desempenho da defesa do corpo contra patógenos e células cancerosas, receptores de antígenos de linfócitos T são heterodímeros, baseados em 2 cadeias polipeptídicas transmembranas, nomeadas como TCR (receptores de superfície) α e β , unidas por uma ligação covalente. As proteínas CD3 e ζ (Zeta) estão associadas, de forma não covalente, ao heterodímero

TCR α e β , com a função de formar um complexo de TCR, quando ocorrer o reconhecimento do antígeno. A associação dessas proteínas desencadeia uma tradução de sinais (o primeiro sinal), tendo como resultado a ativação de células T. A especificidade antigênica do TCR independe da presença das proteínas CD3 e ζ , sendo essas proteínas encontradas em todas as células T definindo seu papel de transdução de sinal e não de reconhecimento do antígeno (MURPHY, 2014).

A ativação das células T envolve co-receptores presentes em sua superfície, nomeados como CD28, que se ligam às moléculas co-estimuladoras da família B7, presentes na superfície de APCs, tais como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Para que ocorra a expressão de co-estimuladores B7, é necessária uma regulação via ativação da resposta inata. A existência do segundo sinal garante que a ativação dos linfócitos T seja executada apenas quando necessária, por exemplo, contra infecções em que o patógeno induz forte resposta inata (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Devido a essa potente capacidade de defesa dos linfócitos T, as últimas e décadas o avanço da imunoterapia com modificações genéticas nessas células têm oferecido resultados notáveis para o campo de tratamento de cânceres hematológicos. Além das terapias convencionais como quimioterapia e radioterapia, as modificações genéticas, possíveis de ocorrerem nos linfócitos T quando submetidas a manipulação em laboratório, oferece potencial terapêutico para tratamento de pacientes que possuem leucemia linfoblástica aguda de células B recidivante e/ou refratária (B-ALL) ou linfoma de grandes células B (LNH). Através do desenvolvimento de receptores de antígeno quimérico (CAR) é possível modificar geneticamente os linfócitos T e alterar a sua especificidade, por exemplo, para reconhecer o alvo CD19, presente nas doenças citadas acima. Tal imunoterapia tem o potencial de entregar cerca de 30% à 50% de chances de sobrevivência para pacientes submetidos a esse tipo de tratamento. (DINOFIA; GRUPP, 2021; MAUDE; LAETSCH; BUECHNER; RIVES; BOYER; BITTENCOURT; BADER; VERNERIS; STEFANSKI; MYERS, 2018; NEELAPU; LOCKE; BARTLETT; LEKAKIS; MIKLOS; JACOBSON; BRAUNSCHWEIG; OLUWOLE; SIDDIQI; LIN, 2017)

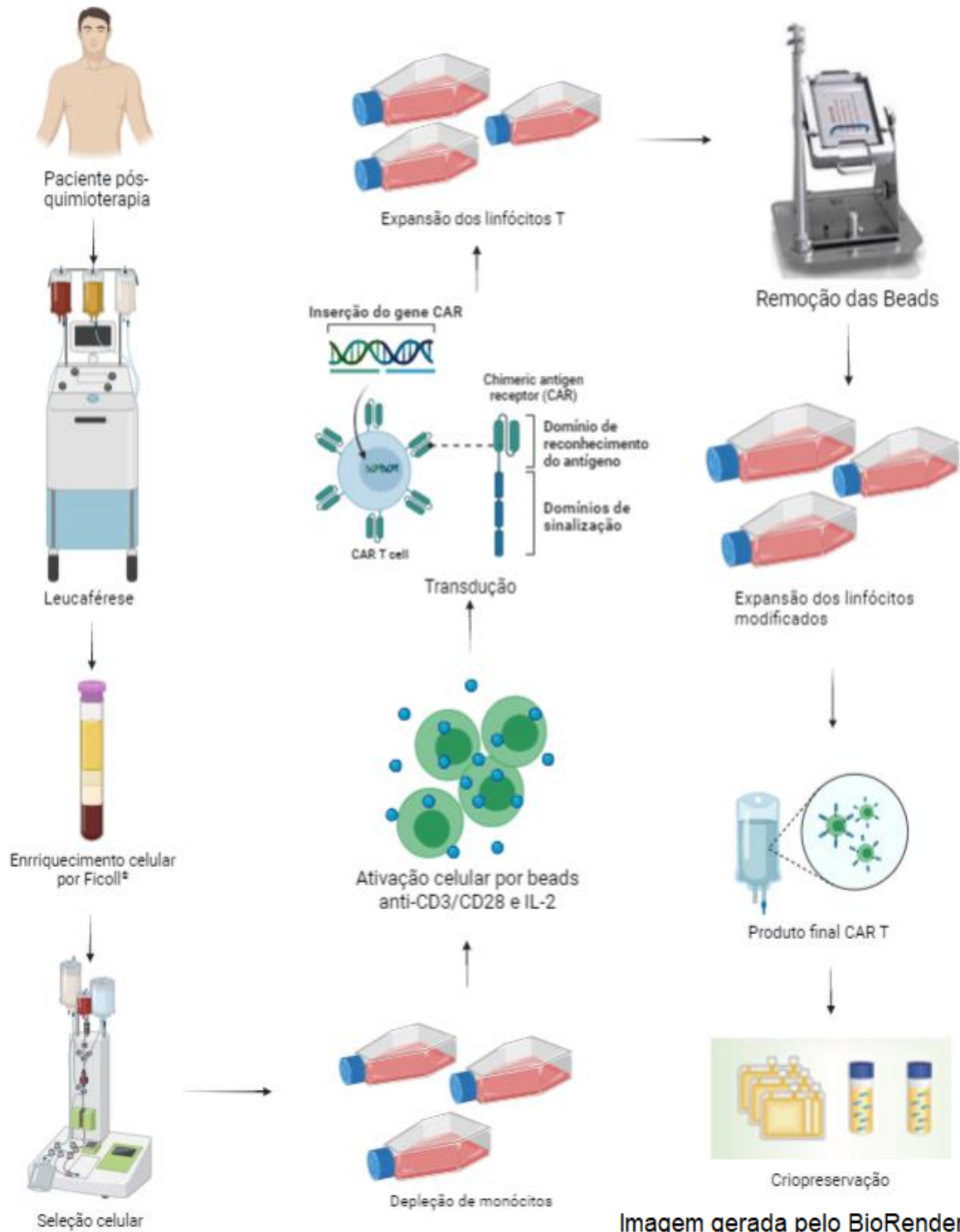
Com a possibilidade das transduções de genes a partir de manipulação genética, as células T autólogas têm a capacidade de expressar receptores que direcionam a célula ao ataque das células alvo, gerando um potencial terapêutico de maior eficiência ao já existente no sistema imunológico. Após a inserção dos genes recombinantes, as células T do paciente, modificadas geneticamente, irão expressar

o antígeno recombinante. Tais células são expandidas com o objetivo de gerar células de memória e efetoras, fornecendo uma resposta antitumoral robusta e potente. Tal processo é utilizado para a manipulação gênica dos CAR, sendo receptores sintéticos que combinam a capacidade efetora de células T e a capacidade desses receptores de reconhecerem antígenos com alto grau de especificidade em sua superfície, não sendo restrito à molécula MHC (complexo principal de histocompatibilidade) (FEINS; KONG; WILLIAMS; MILONE; FRAIETTA, 2019).

Na primeira etapa de geração das CAR-T CELL, o doador das células T, paciente ou indivíduo sadio, é submetido à coleta por leucaférese, processo físico de centrifugação em tempo real, de uma população heterogênea de leucócitos funcionais, a partir do sangue periférico. A leucaférese de pacientes onco-hematológicos pode levar à contaminação do produto celular por células malignas que, dependendo da quantidade, podem comprometer o processo de geração das CAR-T CELL, a despeito de enriquecimento prévio. (LEVINE et al., 2017; OLIVEIRA, 2016; FEINS; KONG; WILLIAMS; MILONE; FRAIETTA, 2019).

Após o processo de separação e enriquecimento dos linfócitos T, ocorre a segunda etapa, marcada pela depleção de monócitos, que são contaminantes para a manufatura. Posteriormente, ocorre a estimulação com *beads* magnéticas anti-CD3/CD28 e IL-2 (interleucina 2), processo através do qual, é possível ativar as células T, aumentar tamanho e complexidade, com consequente expansão celular, respectivamente. Porém, o processo de ativação e expansão celular *in vitro* também é capaz de promover a morte celular, sobretudo em protocolos que entreguem alto nível de ativação celular em curto período de tempo. (FU; LEI; LIU; CUI; WANG; QIAN; LI; SHEN; FAN; LIN, 2019). Após ativação, as células são cultivadas na presença do vetor viral para a transdução e introdução do gene codificador do CAR no genoma das células T. Uma vez modificadas, as células T passam a expressar o CAR em sua superfície celular e são mantidas sob condições de expansão contínua, até que se atinja a dose ideal para infusão no paciente (FEINS; KONG; WILLIAMS; MILONE; FRAIETTA, 2019). Todo o processamento está demonstrado na figura 1.

Figura 1- PROCESSAMENTO T-CAR



A imagem representa o processo de manufatura para o desenvolvimento da imunoterapia com células T-CAR.

A divisão celular é um evento complexo e altamente exigente para a célula. A preservação da estrutura e função do DNA é indispensável para um processo de divisão celular de forma que ocorram mutações decorrentes de função inadequada da maquinaria celular. Como forma de regular o processo de divisão, a maquinaria

celular possui sofisticados sistemas de correções de forma a reduzir a ocorrência de eventos que promovam danos de DNA. (MOURA; HOUTEN, 2010).

Os danos de DNA mais comuns que causam mutações genéticas e fazem jus à função das vias de reparo são divididos em subclasses, definidos e ordenados como: quebras de fita simples, quebras de fita dupla, dano à base nitrogenada, dano do açúcar (glicação), ligação cruzada de DNA e locais danificados agrupados. Todas as subclasses de danos são passíveis de causar câncer e reduzir a sobrevivência celular, sendo a mais comum causada por quebra de fita simples. Os processos de reparo de DNA são demonstrados na figura 2 (CECCALDI; RONDINELLI; D'ANDREA, 2016; LI et al., 2019).

Figura 2-IMPACTO EM VIAS DE REPARO E SUAS VIAS DE REPARO

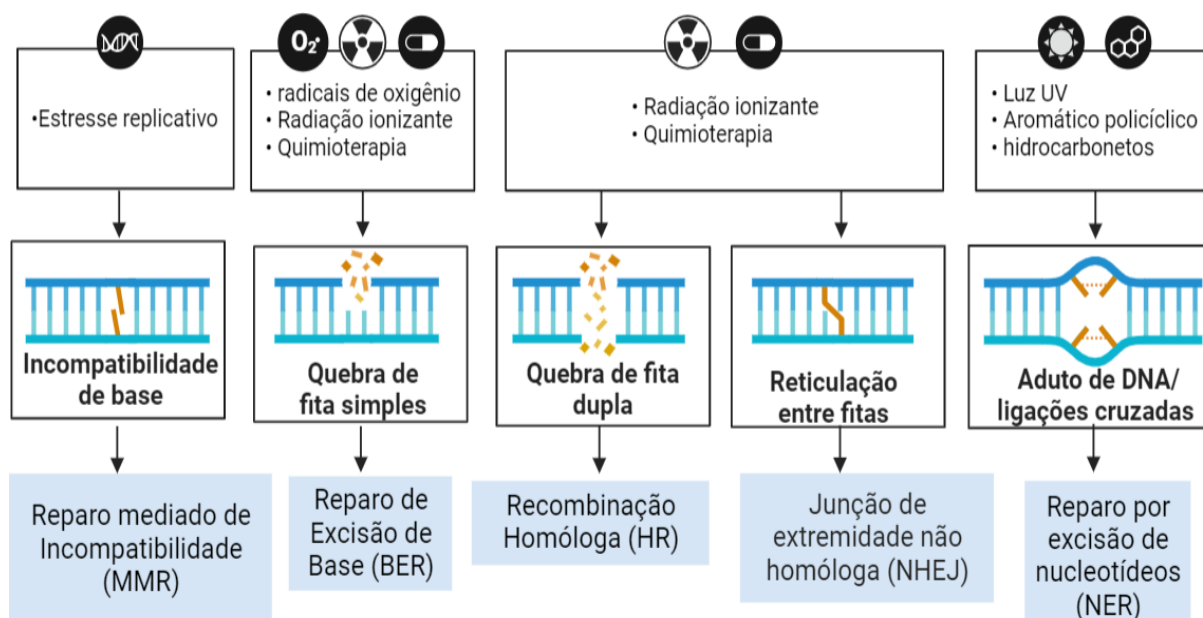


Imagem gerada pelo BioRender

A figura representa de maneira simplificada as vias de danos, juntamente com as causas de tais danos e quais as vias de reparo que ocorrem para resolver os problemas nas fitas de DNA e evitar mutações celulares.

Diferentes autores exploram a relação entre danos genéticos e o desenvolvimento de doenças tumorais (ALHMOUD; WOOLLEY; MOUSTAFA; MALKI, 2020). As mutações somáticas, adquiridas ao longo da vida, são caracterizadas por persistirem a despeito do sistema de reparo de DNA (CHOUDHURY; HUANG; KIM; ZHOU; MORILLO; MAURY; TSAI; MILLER; LODATO; ARATEN, 2022).

O LNH tem sua principal mutação por translocação, em sua maioria associada aos genes BCL2 e BCL6. (NOGAI; DÖRKEN; LENZ, 2011) Por outro lado, rearranjos

estruturais ou translocações são as mutações mais observadas em LLA, promovendo anormalidades cromossômicas. Diferentes tipos de modificações podem agravar o prognóstico da doença como: modificações no cromossomo Filadélfia, levando a anormalidades citogenéticas aos linfócitos B, modificações que causam leucemias mistas, frequentemente encontrados em pacientes pediátricos, e a leucemia mieloide, sendo modificações localizadas em hipodiploidia e trissomia no cromossomo 8, estando presente majoritariamente em adultos diagnosticados com LMA (BAKSHI et al., 2012; FUJITA et al., 2021; NACHMAN et al., 2007; RIX et al., 2013). Alterações associadas a LLA, como a translocação que desregula o gene *C-MYC*, levando a mutações de genes supressores de tumor como *TP53* e depleções que causam falha no fator de transcrição *PAX5* são agravantes na doença e causadas por danos ao DNA (ANGI et al., 2017; HELTEMES-HARRIS et al., 2011; VILAS-ZORNOZA et al., 2011).

Tratamentos citotóxicos, tais como radioterapia e quimioterapia, empregados na sua maioria para o tratamento de doenças malignas, promovem dano de DNA das células malignas e, por consequência, induzem à apoptose. (ASHWORTH, 2008; MAYER, 2013). Tais tratamentos, por falta da especificidade, causam danos em células saudáveis, causando grandes danos em seu DNA e instabilidade genômica e podendo acarretar a efeitos colaterais e tais células (BOOGAARD; KOMNINOS; VERMEIJ, 2022). Durante esse processo, o aumento de replicação celular no corpo ou durante o processo de manufatura celular, pode levar a erros e conseqüentemente, danos genéticos. Alguns desses erros são corrigidos pelos reparos de DNA. por ativação de suas vias, mas se ocorre mutação em genes de reparo podem ocorrer parada de suas vias ou serem ineficazes no reparo e com isso prejudicar a homeostase celular ou causar problemas como mutações celulares se a célula não entrar em apoptose (TERESA; HERNÁNDEZ-GÓMEZ; FRÍAS, 2017; ZIO; CIANFANELLI; CECCONI, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Os resultados decorrentes do tratamento de doenças malignas com células T-CAR têm demonstrado resultados muito promissores. No entanto, sua plataforma de manufatura é muito complexa, dispendiosa e requer mão de obra extremamente qualificada. Muito embora o CTC (centro de Terapia Celular) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto tenha desenvolvido um protocolo de manufatura de células T-CAR com potencial clínico demonstrado, existe a necessidade de aprimorar seu processo com o objetivo de atingir melhor padrão imunológico efetor, tais como células de memória e com bom perfil funcional.

A análise de mecanismos celulares e moleculares das células T pré e pós manufatura possuem o potencial de revelar variáveis inéditas que possam impactar o processo de manufatura das células T-CAR.

Nesse cenário, o presente projeto tem a finalidade de investigar possíveis efeitos dos tratamentos citotóxicos prévios em pacientes com LLA e LNH, como a radioterapia e quimioterapia e, assim, analisar os impactos que o dano nos mecanismos de reparo do DNA podem promover no processo de manufatura das células T-CAR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o impacto sobre o processo de manufatura das células T-CAR acerca da presença de mutações gênicas associadas aos mecanismos de reparo do DNA, em amostras de pacientes portadores de neoplasias hematológicas (LLA e LNH) coletadas pré e pós manufatura, com histórico prévio de tratamento citotóxico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o impacto da terapia citotóxica prévia sobre os mecanismos de reparo do DNA no processo de manufatura das células T-CAR autólogas de pacientes portadores de neoplasias hematológicas (LLA e LNH).
- Avaliar o impacto do processo celular sobre os mecanismos de reparo do DNA no processo de manufatura das células T-CAR autólogas de pacientes portadores de neoplasias hematológicas (LLA e LNH).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Para as análises, foram utilizadas amostras biológicas (creme leucocitário) de pacientes e doadores saudáveis pré-selecionados, voluntários ao processo de validação da plataforma de processamento celular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, cujas amostras estão criopreservadas e armazenadas no “BANCO DE AMOSTRAS DO LABORATÓRIO DE TERAPIA CELULAR DO CENTRO DE TERAPIA CELULAR DO CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (CRH-HCFMRP-USP)”, para fins de tratamento compassivo, não havendo distinção de raça ou classe social, e faixa etária entre 9 e 65 anos.

Foram utilizadas uma coorte de 8 amostras (5 pacientes, sendo 3 de LNH, 2 de LLA e 3 doadores saudáveis). As amostras pré-manufatura foram identificadas como PCCAR CMN (células mononucleares) para pacientes e DN CMN para doadores. As amostras pós-manufatura foram identificadas PCCAR CAR+ para pacientes e DN para doadores. A identificação adotada e os pacientes selecionados constam na tabela 1.

Tabela 1-IDENTIFICADOR DAS AMOSTRAS

IDENTIFICADOR	PRODUTO CELULAR	STATUS
PCCAR 1 CMN	Produto de leucaférese	LLA
PCCAR 1 CAR+	Produto geneticamente modificado	LLA
PCCAR 2 CMN	Produto de leucaférese	LNH
PCCAR 2 CAR+	Produto geneticamente modificado	LNH
PCCAR 3 CMN	Produto de leucaférese	LNH
PCCAR 3 CAR+	Produto geneticamente modificado	LNH
PCCAR 4 CMN	Produto de leucaférese	LLA
PCCAR 4 CAR+	Produto geneticamente modificado	LLA
PCCAR 5 CMN	Produto de leucaférese	LNH
PCCAR 5 CAR+	Produto geneticamente modificado	LNH
DN 1 CMN	Células mononucleares derivadas do filtro de leucaférese	Saudável

DN 1 CAR+	Produto geneticamente modificado	Saudável
DN 2 CMN	Células mononucleares derivadas do filtro de leucaférese	Saudável
DN 2 CAR+	Produto geneticamente modificado	Saudável
DN 1 CMN	Células mononucleares derivadas do filtro de leucaférese	Saudável
DN 1 CAR+	Produto geneticamente modificado	Saudável

Representação em tabela das amostras utilizadas para executar o estudo, demonstrando na primeira coluna o identificador dos pacientes, na segunda coluna a origem da amostra e na terceira coluna o status da amostra.

4.1 PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Leucócitos de sangue periférico obtidos de pacientes portadores de neoplasias hematológicas (LLA e LNH) foram coletados por aférese na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo método de leucoenriquecimento (SpectraOpticalIII®).

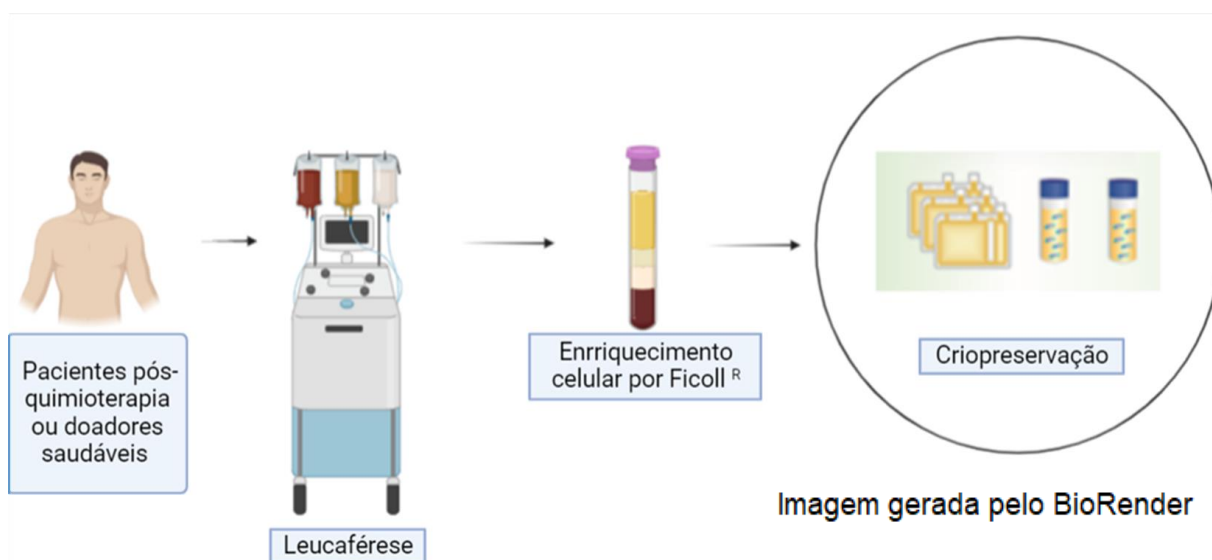
Leucócitos de sangue periférico obtidos de doadores saudáveis que compareceram à Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto foram utilizados como fonte de células para controle. A coleta foi realizada pelo filtro de leucorredução que integra o sistema de coleta de plaquetas por aférese (TRIMAaccel®), no qual as células nucleadas ficam retidas.

O concentrado celular em um volume aproximado de 5-10 mL, foi lavado com 20 mL de PBS (Phosphate-buffered saline) 1x suplementado com 5% de anticoagulante ACD-A. Posteriormente, foi realizado o procedimento de separação celular por densidade de gradiente, utilizando-se o reagente Ficoll Hypaque Premium (GE Healthcare®) na proporção aproximada de 1:3, sendo 30 mL de suspensão do concentrado celular e 13 mL do reagente Ficoll Hypaque Premium por tubo, para a obtenção de uma população celular enriquecida de células mononucleares. Os tubos foram centrifugados com rotação de 700 x *g* durante 30 minutos, sem freio, com aceleração mínima de xxx *g* e à temperatura ambiente. Após a retirada do produto celular enriquecido, procedeu-se à lavagem com PBS 1x suplementado com 5% de ACD-A utilizando centrifugação de 700 x *g* durante 30 minutos, de forma repetitiva por 3 vezes.

A criopreservação das células foram realizadas utilizando uma proporção de 1:1 de meio de cultura suplementado com 10% de soro humano e solução de

congelamento composta por albumina humana 20%, 10% solução de hidroxietilamido de baixo peso molecular -130/0,4 (HEA) e 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido). Após esse processo, as células foram levadas à câmara de congelamento e armazenadas por no mínimo 4 horas no freezer -80°C e posteriormente foram criopreservadas em nitrogênio líquido como mostrado na figura 3.

Figura 3-OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES



O processo demonstra a primeira etapa para obtenção das células mononucleadas.

4.1.2 Depleção em garrafas

As células mononucleares da leucaférese, criopreservadas anteriormente, foram descongeladas em banho maria 37°C e ressuspensas em meio de cultura AIM-V ou X-VIVO suplementado com 100UI/mL IL-2 (GE Healthcare®) (YAN et al., 2020) e incubado a 37°C com 80% de umidade e 5% de CO_2 , em garrafa de cultura celular tipo T estática, para a depleção de monócitos por aderência ao plástico. Após, as células T de interesse, suspensas em meio de cultivo, foram coletadas e avaliadas por citometria de fluxo quanto a pureza, com os fenótipos celulares CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ , $\text{CD45}^+/\text{14}^+$, $\text{CD56}^+/\text{16}^+$, CD19^+ (BD-PHARMINGEM®) e análise da viabilidade por 7-AAD e Annexin-V (BD-PHARMINGEM®).

4.1.3 Enriquecimento celular com anticorpos monoclonais

Essa metodologia pode ser utilizada em pequena escala em bancada com sistema aberto ou em larga escala em sistema fechado com o uso do equipamento CliniMACS, para a separação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ (SCHUBERT et al., 2019). As subpopulações celulares T CD4⁺/CD8⁺ foram obtidas utilizando-se anticorpos monoclonais de interesse aderidos (anti-CD4⁺/anti-CD8⁺) conjugados à partículas paramagnéticas de ferro dextran, capazes de se ligar a sítios específicos presentes na membrana dos linfócitos. Esses linfócitos quando submetidos a um campo magnético, ficam retidos à coluna e as células de interesse são separadas por magnetismo. Posteriormente as células foram eluídas (removidas) da coluna e a pureza avaliada por citometria de fluxo, analisando os fenotipos celulares CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45⁺/14⁺, CD56⁺/16⁺, CD19⁺ (BD-PHARMINGEM®), bem como a análise da viabilidade por 7-AAD e Anexin-V (BD-PHARMINGEM®) (RIDDELL et al., 2014).

4.1.4 Ativação celular

Realizado com a amostra de leucócitos obtidos anteriormente, utilizando *beads* anti-CD3/anti-CD28 e IL-2, analisadas posteriormente por citometria de fluxo (LRSFortessa™ BD), quanto a viabilidade com 7AAD/Anexin-V e a ativação celular com painel CD25⁺/CD69⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺/CD3⁺, CD56⁺/CD3⁺, CD45⁺/CD14⁺.

4.1.5 Transdução dos linfócitos e expansão celular

O vetor lentiviral, selecionado e preparado pelo grupo de pesquisa na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, foi utilizado para fazer a modificação genética nos linfócitos, que passaram a expressar o receptor adequado para o receptor de CD19⁺ das células tumorais (CHANG; HOU; CHEN, 2020).

Nessa etapa, as células que já foram modificadas geneticamente e expressam os receptores CAR específicos para o antígeno da doença pesquisada, foram expandidas. A expansão celular foi realizada utilizando os meios de cultura AIM-V/ X-VIVO suplementados com diferentes tipos de citocinas para obter diferentes subpopulações de células T- CAR (XHANGOLLI et al., 2019).

4.1.6 Remoção das *beads* magnéticas da cultura e determinação de *beads* residuais

Esse processo é efetuado para separar as *beads* das células T- CAR, no qual as *beads* ficarão retidas no tubo/bolsa e as células serão transferidas para outro recipiente (CHANG; HOU; CHEN, 2020).

A contagem de *beads* residual deve ser menor que 100 *beads* a cada 3×10^6 células. A determinação de *beads* residuais foi realizada coletando uma alíquota de células que foram lisadas por hipoclorito de sódio 2,5% e posteriormente foi realizada contagem das *beads* residuais em câmara de Neubauer. Uma vez que a contagem de *beads* residuais estava dentro do padrão de aceitação, as células foram liberadas para uso clínico.

4.1.7 Análise do produto final

Para liberação do produto final, foi realizado o controle microbiológico de bactérias anaeróbias, aeróbias e fungos, além da análise em conjunto do controle de endotoxina bacteriana, Mycoplasma e a cariotipagem. Bem como a análise de fenótipo celular por citometria de fluxo (LRSFortessa™ BD) CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45⁺/14⁺, CD56⁺/16⁺ e CD19⁺ e viabilidade com 7AAD/Anexinn-V e após esse processo as células foram criopreservadas.

4.2 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS T CD3⁺

As células congeladas em nitrogênio líquido, mononucleadas (4.1) e do produto final (4.1.7), descritas anteriormente, foram utilizadas para os subseqüentes testes. No primeiro passo, os tubos de criopreservação foram descongelados, através de banho-maria, e então ressuspendidos em solução de descongelamento composta por albumina humana 5%, ACD-A 5% e solução fisiológica gelada. As células foram lavadas 2 vezes na mesma solução, por centrifugação a 700x g por 5 minutos.

A metodologia para separação de linfócitos T CD3⁺ foi efetuada com o uso de coluna magnética e *beads* de separação de linfócitos T (MACS Miltenyi Biotec®) (REINHOLD; GUTTEK; REDDIG; VOSS; SCHUBERT; KAHLFUSS; GRÜNGREIFF; SCHRAVEN; REINHOLD, 2021). Tais *beads* se ligam a sítios específicos presentes na membrana dos linfócitos. Esses linfócitos quando submetidos a um campo

magnético, ficam retidos à coluna e as células de interesse são separadas por magnetismo, posteriormente as células foram eluídas da coluna e utilizadas para extração de DNA.

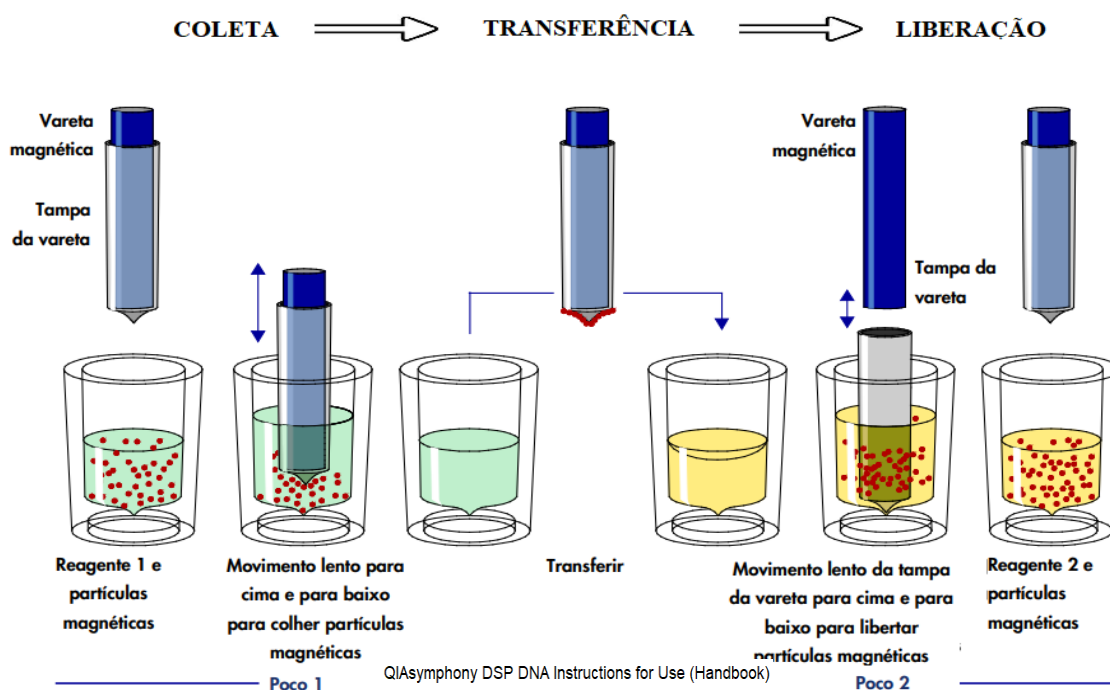
4.2.1 Extração de DNA

A extração foi executada utilizando o extrator automático Qiagen QIASymphony® que utiliza o método de purificação de DNA automatizado, reduzindo a possibilidade de causar contaminações cruzadas. O Kit DNA QIASymphony DSP foi utilizado no equipamento para a extração da amostra (NIMBKAR; BHATT, 2022).

A extração baseia-se em 4 etapas: lise, ligação, lavagem e eluição. Essa tecnologia fundamenta-se na utilização de partículas magnéticas para isolamento do DNA, isso permite a purificação com mais refinamento da amostra, eliminando proteínas, nucleases e outras impurezas que possam conter na amostra, fornecendo DNA com pureza elevada para uso imediato como demonstrado na figura 4.

Após o processo de extração automatizado, a quantificação e qualidade do DNA foi mensurada a partir do uso do NanoDrop 2000 (ThermoFisher®).

Figura 4-EXTRAÇÃO DE DNA



A figura representa o processo de extração de DNA por partículas magnéticas no equipamento QIASymphony®.

4.2.3 Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de nova geração (NGS) está sendo utilizado como padrão alto para diagnóstico de doenças genéticas, pelo fato de ser um sequenciamento que consegue avaliar tanto o Exoma (WGS) como o Genoma (GS), fornecendo assim uma análise mais completa do gene e suas etiologias (SCHULER; NELSON; KOZIURA; COGAN; HAMID; PHILLIPS, 2022)

Após a extração de DNA, o NGS foi executada pela Fleury Medicina e Saúde, onde foram encaminhados os dados brutos para posterior análise de bioinformática, buscando os tipos de danos de DNA e genes de reparos envolvidos.

Para a preparação da biblioteca de DNA das amostras, foi utilizado o kit Human Core Exome Kit (TWIST BIOSCIENCE®), que gera leituras mais uniformes e maior cobertura da leitura da amostra utilizando sondas de Ds-DNA (Double-stranded DNA viroses) e após a amplificação das fitas a amostra é aplicada no NovaSeq 6000 System (ILLUMINA®), liberando resultados em dados brutos para realização da bioinformática demonstrados na figura 5.

Figura 5-PROCESSOS EXECUTADOS

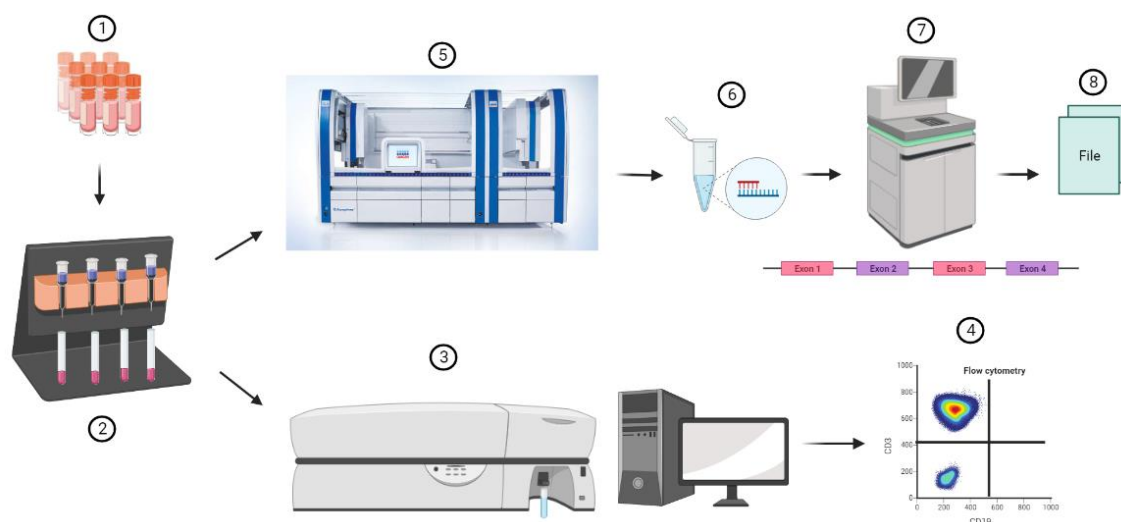


Imagem gerada pelo BioRender

1- Os criotubos dos pacientes e doadores são selecionados e identificados; 2- Tais amostras passam pelo processo de separação magnética com Pan T Cell Isolation Kit (MACS Miltenyi Biotec®) purificando as células em CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺; 3- Após a purificação por coluna magnética, as células são analisadas por citometria de fluxo, sendo analisado as amostras pré-manufatura e pós-manufatura, comparando a pureza de CD3⁺; 4- Análise dos dados para comparação executadas por FlowJo®; 5- Após as análises de pureza, as amostras passam para o extrator automático QIASymphony® e extraídas com auxílio de beads; 6- As amostras são quantificadas e qualificadas utilizando o NanoDrop 2000 (ThermoFisher®); 7 e 8- As amostras são preparadas com o kit de biblioteca Human Core Exome Kit (TWIST BIOSCIENCE®) e sequenciadas por NovaSeq 6000 System (ILLUMINA®), sendo depois analisados os dados brutos por bioinformática.

4.3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

4.3.1 Controle de qualidade Pré-alinhamento

Para iniciar a próxima etapa de análises de tais amostras, é necessário em primeiro momento executar o controle de qualidade das mesmas, procurando problemas que podem ter ocorrido durante o sequenciamento, gerando vieses nos dados e erros em classificações de variantes.

Após o sequenciamento o sequenciador fornece arquivos em formato FastQ, sendo esses os dados brutos das amostras. Com esses arquivos, utilizando ferramentas como FastQC (Fast quality control) temos tratamento dessas amostras e nos fornecem informações estatísticas em relatórios da qualidade das bases sequenciadas, índices de qualidade por sequência, conteúdo de base sequenciada, conteúdo das bases GC e N, distribuição do comprimento de sequências, sequências duplicadas, sequências super expressadas e adaptadores. Após esse processo, a ferramenta MultiQC é utilizada para compilar todos os dados.

Após executar o controle de qualidade, é necessário a retirada de adaptadores proveniente da biblioteca preparada anteriormente para o sequenciamento genético (TWIST BIOSCIENCE®), tais adaptadores são removidos da amostra utilizando a ferramenta Cutadapt, sendo uma ferramenta que localiza os adaptadores em qualquer ponto da sequência antes de executar o corte.

4.3.2 Alinhamento das sequências

Sendo a etapa principal da preparação dos dados de bioinformática, o alinhamento das milhares sequências do genoma é necessário a comparação com um gene referência.

Utilizando a ferramenta BWA-MEM (Burrows-Wheeler Aligner) como alinhador e o gene referência GRCh37. Tal ferramenta BWA-MEM lida com sequências de 70 a 1000 bases.

4.3.3 Processo pós-alinhamento

Após o processo de alinhamento é possível iniciar o processamento das amostras alinhadas com o objetivo de remover vieses, assim ordenando os arquivos com as sequências analisadas em concordância genômica, assim sendo utilizada as funções SortSam e para verificação se houve erro das análises, a ferramenta BamTools é utilizada como ponto de checagem, sendo ferramentas do Picard.

4.3.4 Realinhamento local e recalibração da qualidade

Com o intuito de exclusão das bases que não estão alinhadas de modo correspondente com o gene de referência, a ferramenta GATK é inserida na análise.

Em geral as regiões do gene que possuam variáveis como deleções ou inserções são suscetíveis quando passam pelo realinhamento local, visto que uma sucessão de bases pode ser confundida como uma variável genética e ela pode ser apenas uma organização diferente do genoma de referência. Com isso a ferramenta GATK refaz o alinhamento que foi executado no passo anterior de maneira mais sensível e especificamente, gerando arquivos com essas variantes genéticas para minimizar os efeitos dessas bases re-alinhadas de modo não completamente correspondente com o gene de referência, já que sucessões de bases podem ser erroneamente marcadas como variâncias sucessivas, executando-se o realinhamento local após os processos descritos anteriormente.

Para tal processo, um conjunto de funções da ferramenta GATK são empregados assim, determinando o intervalo a ser realinhado, utilizando a função “RealignerTargetCreator” e então o realinhamento com a função “IndelRealigner”. Ao final dessa etapa, a função “BaseRecalibrator” é utilizada com o intuito de definir o que seria variações causadas biologicamente ou por manipulação da amostra como, preparado da biblioteca, re-alinhamento das sequências e reação de sequenciamento, sendo assim retiradas das amostras.

4.3.5 Controle de qualidade pós-alinhamento

Como descrito nas etapas acima, todo o processo de análise de bioinformática das sequências de DNA é complexo, mas fornecem dados refinados e em alto

desempenho das amostras desejadas. Entretanto, mesmo com refinamento dos enquadramentos das amostras, o processo de controle de qualidade pós-alinhamento é essencial para confrontar os dados reais que foram obtidos pelo sequenciamento do Exoma.

Utilizando a ferramenta Picard e sua função de “CollectMultipleMetrics”, que tem a função de gerar estimativas de acertos de alinhamento, distribuição, tamanhos de insertos pós-alinhamento, pontuações de alinhamento e as métricas dos ciclos dos ciclos de reações do equipamento de sequenciamento, refinando assim como etapa final de controle de qualidade os dados obtidos anteriormente.

4.3.6 Descoberta de variantes genéticas

A descoberta dessas variantes genéticas podem ser observadas graças ao uso do genoma de referência GRCh37 citado anteriormente, com essa comparação de referência e a amostra selecionada, é possível se utilizar a função “HaplotypeCaller” da ferramenta GATK. Essa função interroga as SNPs (Single nucleotide polymorphism) e indels (Inserções e deleções) de modo simultâneo com os haplótipos de tais regiões ativas, que são classificadas desse modo pois apresentam tais variantes genéticas.

Após esse processo a função “genotypeGVCFs” da ferramenta GATK é aplicada, assim interrogando as variantes das amostras e assim, gerando arquivos VCF (variant call format), onde estão presente as posições e tipos de variantes encontradas nas amostras, sem anotações de genes.

4.3.7 Anotações de variantes

Para uma resposta mais interpretável das amostras sequenciadas e presentes danos além de trechos e localizações, faz-se necessário o processo de anotações de genes que estão dispostas nas localizações informadas pelos arquivos anteriores (VCFs), assim, auxiliando no processo de filtragem das amostras.

Para tal a ferramenta utilizada, Variant Affect Predictor (VEP) é aplicada e com ela as informações necessárias podem ser aplicadas, assim, anotando transcritos que foram afetados pelas variâncias genéticas, a localização de tal variante em seu contexto genômico que ela se aplica, genes, a consequência da variância na codificação das proteínas, o potencial deletério e as suas associações que podem

estar associadas a tal variante e as condições informadas em literatura, entre outras informações.

Com essa lista de informações, é possível se analisar os genes de busca, nesse caso, danos em gene de reparo e assim, oferecer uma análise exploratória como proposto no projeto citado acima (item 3.1).

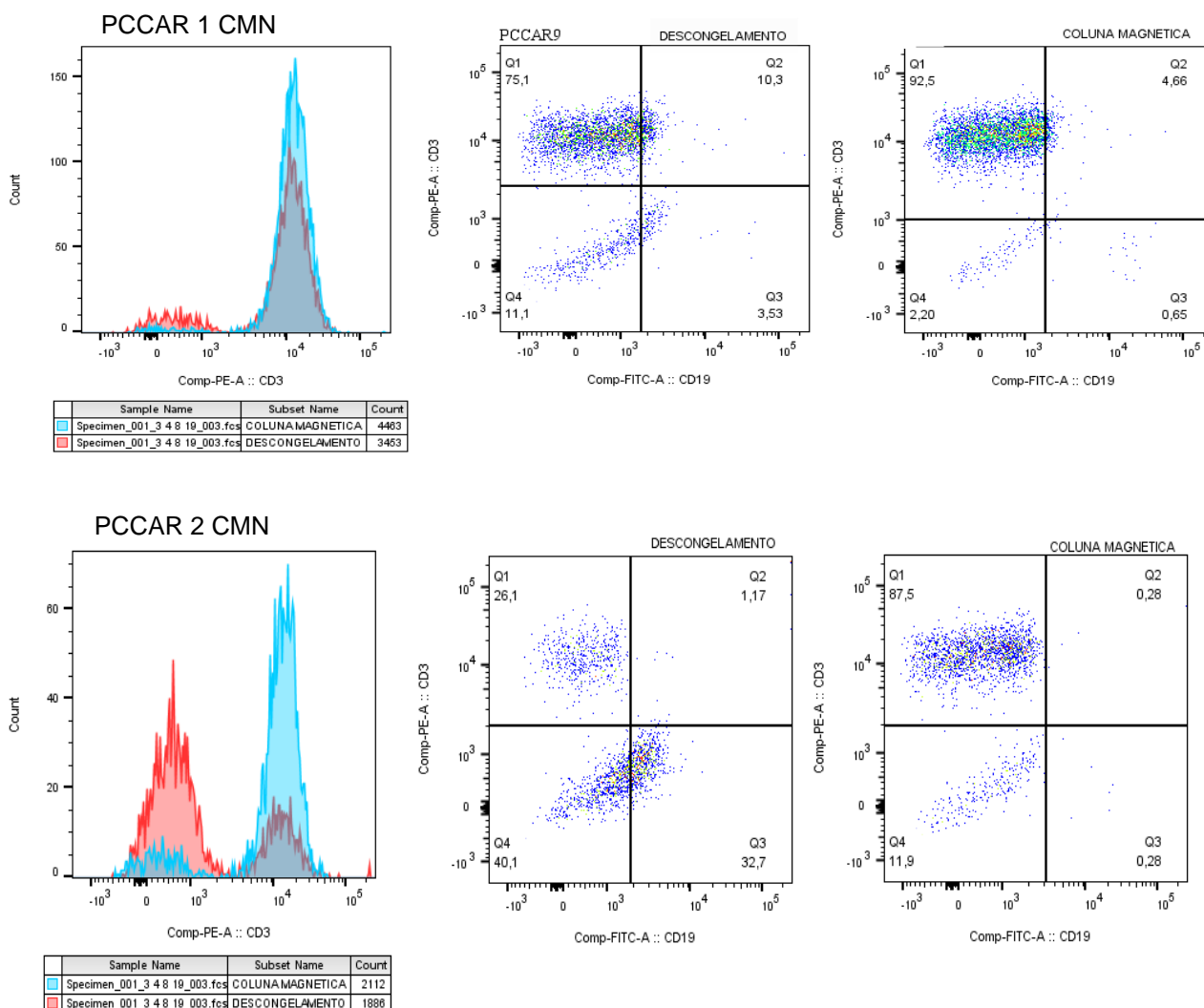
5 RESULTADOS

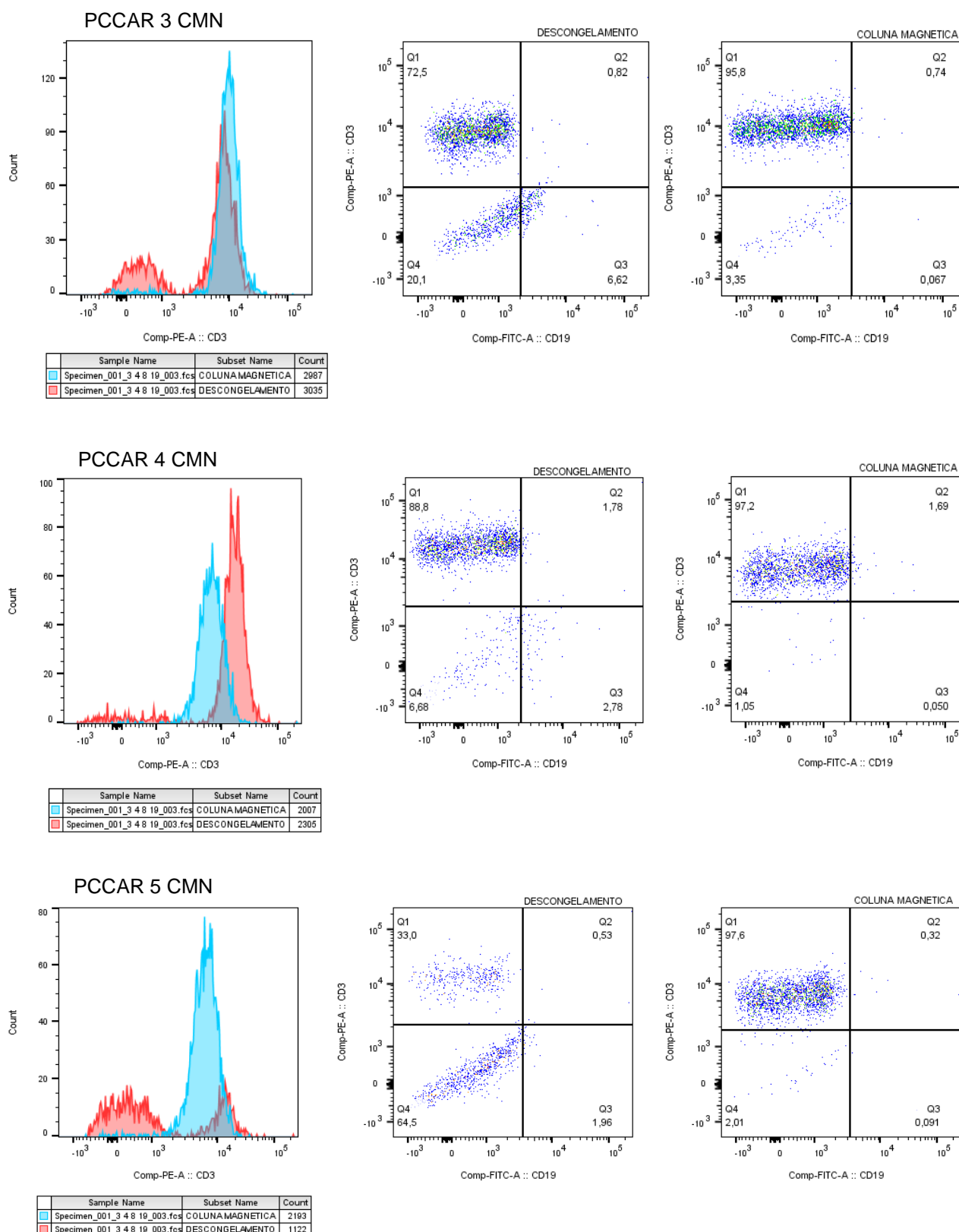
5.1 PURIFICAÇÃO CELULAR DAS AMOSTRAS

Amostras derivadas de leucaférese, obtidas de pacientes com LNH ou LLA e amostras de DN foram submetidas à análise de pureza pela quantificação do marcador CD3, pré e pós enriquecimento.

As figuras 6 e 7 ilustram a análise dos cinco pacientes e dos três doadores, respectivamente. Na imagem mais à esquerda nas figuras, o eletroferograma comparativo entre o produto celular de partida bruto (vermelho) e pós-enriquecimento (azul) demonstra uma pureza entre xxx e xx entre os pacientes e, entre xx e xx entre os doadores. Dentre os pacientes, um (PCCAR 2) apresentou pureza inferior a 90%.

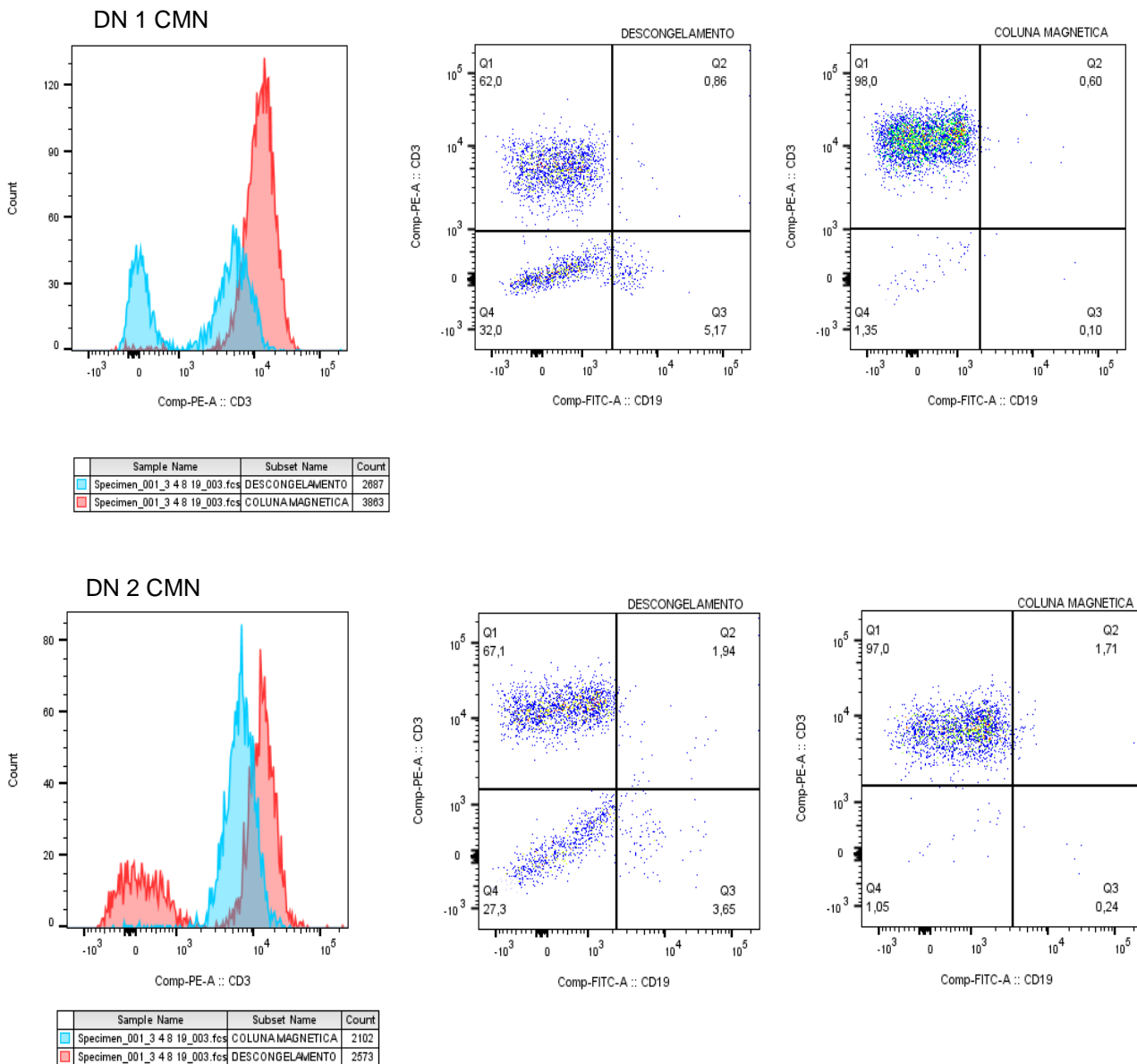
Figura 6-CITOMETRIAS PACIENTES CELULAS MONONUCLEARES

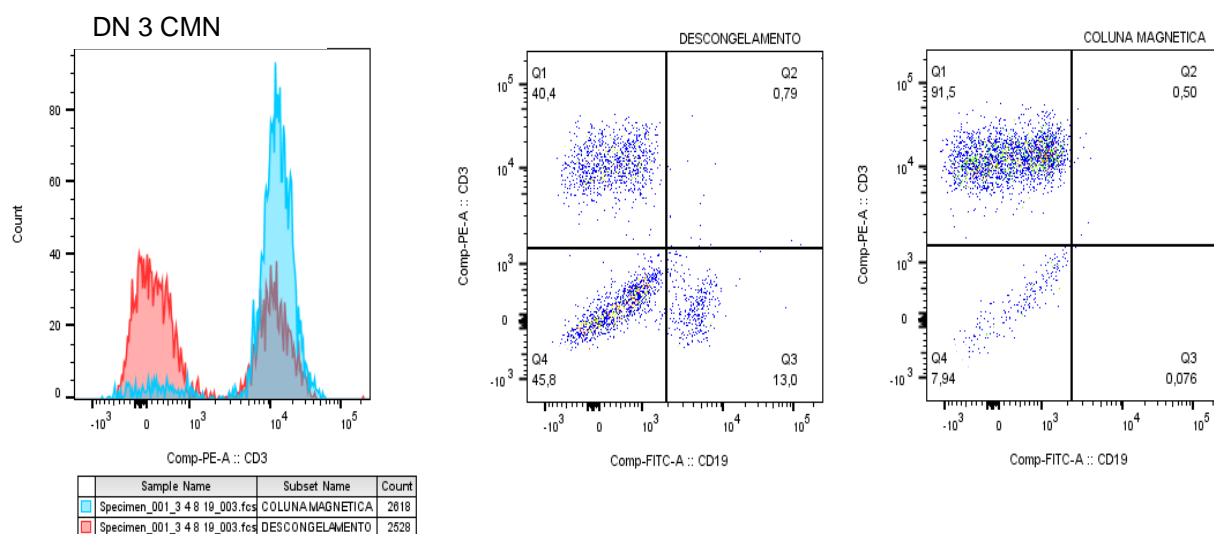




A figura representa os dados de pureza de CD3⁺ por citometria de fluxo dos pacientes PCCAR 1, PCCAR 2, PCCAR 3, PCCAR 4 e PCCAR 5 respectivamente, sendo o primeiro painel uma forma representativa de comparação entre as células do descongelamento e as células após purificação em coluna magnética e o segundo e terceiro painel, a representação dos eventos de CD3⁺ das células do descongelamento e as células após purificação em coluna magnética. No eletroferograma, a cor vermelha representa o descongelamento das amostras e a cor azul após enriquecimento.

Figura 7-CITOMETRIAS DOARORES CELULAS MONONUCLEARES



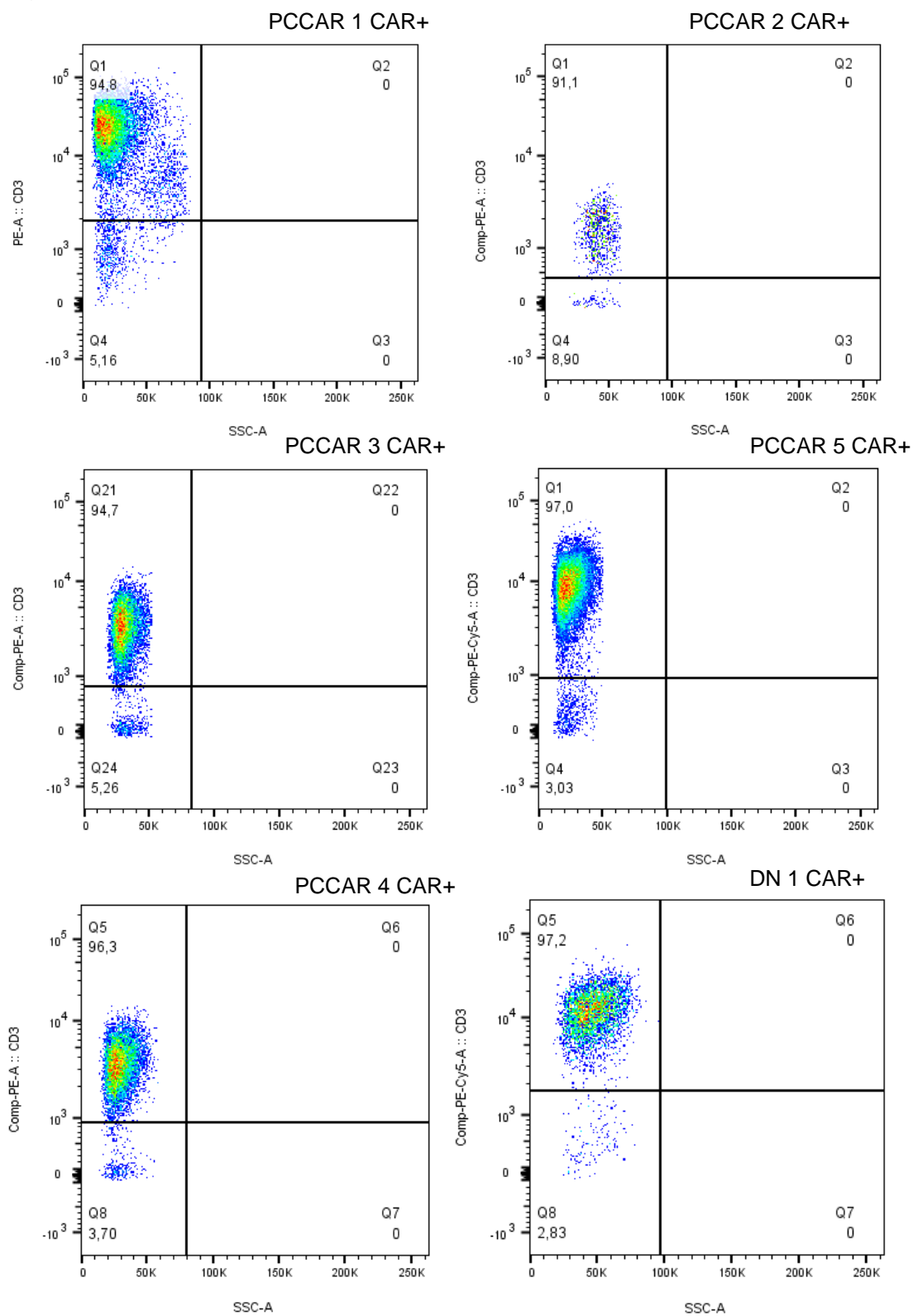


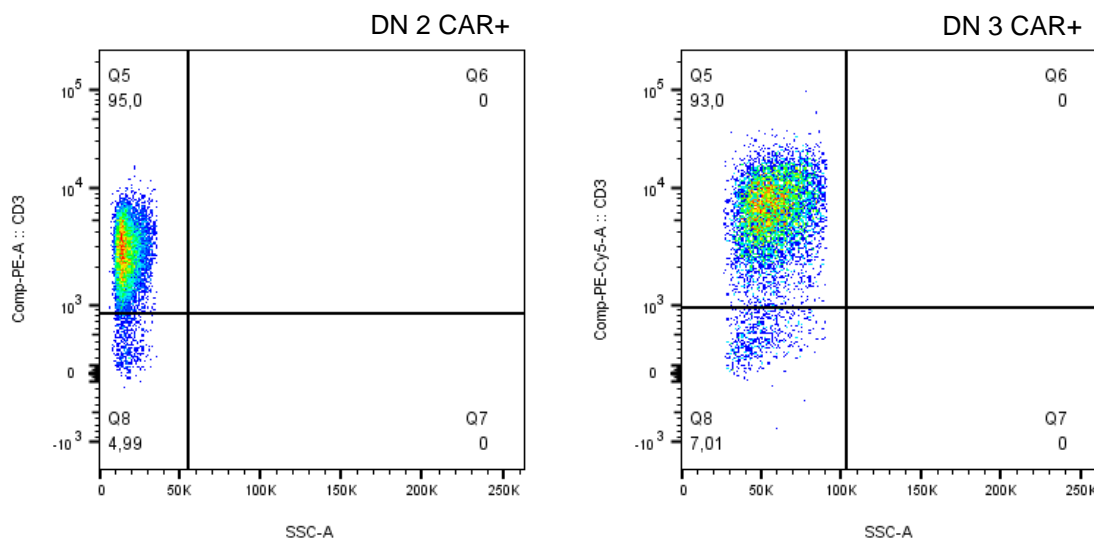
A figura representa os dados de pureza de CD3⁺ por citometria de fluxo dos doadores (controle negativo) DN 1, DN 2 e DN 3, respectivamente, sendo o primeiro painel uma forma representativa de comparação entre as células do descongelamento e as células após purificação em coluna magnética e o segundo e terceiro painel, a representação dos eventos de CD3⁺ das células do descongelamento e as células após purificação em coluna magnética. No eletroferograma, a cor vermelha representa o descongelamento das amostras e a cor azul após enriquecimento.

Vale ressaltar que tal processo não foi executado nas células do produto final, pois como demonstrado na figura 8, tais células foram selecionadas pela cultura celular executada para a manufatura das células T-CAR. Como na cultura se utiliza estimulantes como IL-2, *beads* CD3⁺/CD28⁺ e como também ocorre a depleção de monócitos, o produto final já possui a pureza celular de CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ desejada.

A figura 8 ilustra os dados da análise de pureza do produto pós-manufatura, tanto para os pacientes quanto para os doadores. (valor medido de doador e paciente).

Figura 8-CITOMETRIAS PACIENTES E DOADORES PÓS MANUFATURA





A figura representa os dados de pureza de CD3⁺ por citometria de fluxo, dos pacientes PCCAR 1, PCCAR 2, PCCAR 3, PCCAR 4 e PCCAR 5, respectivamente, e dos doadores (controle negativo) DN 1, DN 2 e DN 3. Os painéis demonstram a pureza celular das amostras ao final da manufatura do T-CAR.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

Após a análise de pureza, as amostras foram extraídas à extração de DNA com auxílio do equipamento pelo extrator automático QIASymphony®. Não houve quantificação do número total de células para cada amostra, como material de partida para a extração de material genético. Após a extração, todas as amostras foram eluídas em 100 uL de água nuclease free. A tabela 2 ilustra a concentração de DNA obtida e a pureza do material estimada pela relação entre os comprimentos de onda 260/280.

As amostras foram submetidas ao sequenciamento do Exoma total, com uma massa mínima total de 500 ng, sendo este material coletado pela equipe do Grupo Fleury, sob condições ótimas para manutenção da qualidade do material genético extraído (2-8°C).

Tabela 2-VALORES EXTRAÇÃO DNA

IDENTIFICADOR	Nucleic Acid	260/280	Fator
DN 1 CMN	161,2 ng/μL	1,85	50
DN 2 CMN	140,1 ng/μL	1,85	50
DN 3 CMN	239 ng/μL	1,87	50
PCCAR 1 CMN	32,5 ng/μL	1,89	50
PCCAR 2 CMN	34,4 ng/μL	1,88	50
PCCAR 3 CMN	240,6 ng/μL	1,86	50
PCCAR 4 CMN	45,2 ng/μL	1,91	50
PCCAR 5 CMN	98,2 ng/μL	1,87	50
DN 1 CAR+	102,2 ng/μL	1,85	50
DN 2 CAR+	78,2 ng/μL	1,93	50
DN 3 CAR+	50,1 ng/μL	1,9	50
PCCAR 1 CAR+	81 ng/μL	1,9	50
PCCAR 2 CAR+	49,6 ng/μL	1,89	50
PCCAR 3 CAR+	41,5 ng/μL	1,9	50
PCCAR 4 CAR+	46,4 ng/μL	1,93	50
PCCAR 5 CAR+	183,6 ng/μL	1,93	50

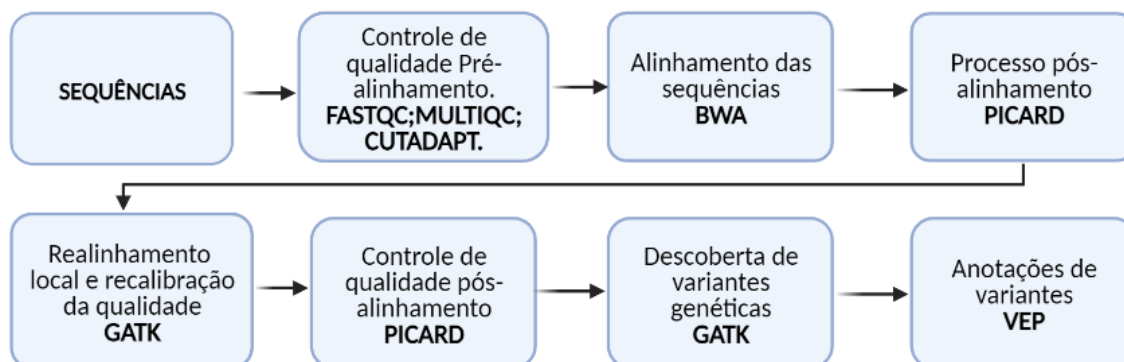
Valores de extração de DNA das amostras de pacientes e doadores extraídos pelo extrator automático QIAasymphony® em volume final de 100 μL.

5.3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA E DADOS GENÉTICOS

Os dados de sequenciamento foram disponibilizados pelo grupo Fleury Medicina e Saúde no formato FAST, sem análise preliminar de qualidade. A análise de bioinformática para avaliação da qualidade das sequências obtidas foi realizada com auxílio das ferramentas *opensource* FASTQC (Illumina. FastQC), MULTIQC (MultiQC.) e CUTADAPT (Martin, M. Cutadapt.). O alinhamento foi realizado pela ferramenta BWA (bwa-mem2. The next version of bwa-mem.) utilizando-se como sequência de referência a hg19 (NCBI. GRCh37 - hg19 - Genome - Assembly – NCBI) e no processamento pós alinhamento utilizado PICARD (Broad Institute. Picard) . Após essa etapa, foi inserida a ferramenta GATK (Broad Institute. GATK), executando o controle de qualidade pós alinhamento por PICARD (Broad Institute. Picard) e a descoberta de variantes por GATK (Broad Institute. GATK), sendo anotados por VEP

(Ensembl Variant Effect Predictor (VEP)) e assim tendo os dados dos genes que apresentam mutações. Tais processos estão representados na figura 9 e sumarizados na tabela 3.

Figura 9-WORKFLOW BIOINFORMÁTICA



Esquema simplificado do *WorkFlow* das etapas executadas para tratamento por bioinformática das amostras e assim a obtenção dos dados genéticos dos pacientes e doadores.

Tabela 3-DISCRICÃO DE FERRAMENTAS

SOFTWARE	DESCRIÇÃO
FastQC	Sumarização de controle de qualidade por amostra considerada.
MultiQC	Visualização de gráficos de controle de qualidade em alta resolução e compilados em um único arquivo gráfico.
Cutadapt	Ferramenta utilizada para a retirada de adaptadores provenientes da biblioteca.
BWA	Alinhador que implementa a transformada de Burrows-Wheeler.
Picard	Conjunto de ferramentas utilizado para tarefas como ordenação, marcação de duplicados, indexação e validação.
GATK	Conjunto de ferramentas utilizado para realinhamento local, recalibração da qualidade e descoberta de variantes.
VEP	Anotação das variantes.

Sumário de softwares e ferramentas que foram empregados nas análises de bioinformática.

Com os dados coletados das análises preliminares, obtivemos arquivos no formato de texto (TSV-TXT) e posterior tabulação em Excel. Esse processo foi utilizado para revisão dos dados refinados, com foco na seleção de genes de reparo de DNA.

A seleção dos genes de reparo de DNA foram obtidos a partir dos seguintes bancos de dados: wikipathways, Reactome, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes

and Genomes) e PANTHER. Esses bancos de dados são alimentados frequentemente por redes de dados de institutos, hospitais, centros de pesquisas e por literatura, mantendo-os atualizados com frequência. Os genes selecionados nessas plataformas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4-LEVANTAMENTO DE DADOS DE GENE DE REPARO

VIAS DE REPARO DE DNA	GENES
Quebras de fita simples e dano à base	APEX1, FEN1, LIG1, MBD4, MPG, NTHL1, OGG1, PARP1 (ADPRT1), PCN, TP53 (p53), UNG, XRCC1.
Quebras de fita dupla	ATM, BLM, BRCA1, BRCA2, CHEK1, H2AFX, HUS1, LIG1, MDC1, MLH1, MRE11, NBN, PRKDC, RAD50, RAD51, RPA1, TP53BP1, XRCC2, XRCC6.
Dano do açúcar (glicação)	ATR, ATRIP, ATRX, BARD1, BRIP1, CHEK2 (RAD53), CIB1, CRY1, FANCA, FANCD2, FANCG, GADD45A, GADD45G, RAD1, RAD17, RAD18, RAD21, RAD51B, RAD9A, RBBP8, REV1, RNF168, RNF8, SMC1A, SUMO1, TOPBP1, XRCC3.
Ligação cruzada de DNA	CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2 (XPD), LIG1, NTHL1, OGG1, PCNA, PNKP, RPA1, SIRT1, TP53 (p53), XPA, XPC.
Apoptose	ABL1, ATM, BARD1, BAX, BBC3 (PUMA), BRCA1, CDKN1A (p21CIP, WAF1), CHEK2 (RAD53), CIB1, CSNK2A2, PPP1R15A (GADD34), PRKDC, RAD21, RAD9A, SIRT1, TP53 (p53), TP73.
Ciclo celular	ATM, ATR, ATRIP, CDC25A, CDC25C, CDK7, CDKN1A (p21CIP1, WAF1), CHEK1, CHEK2 (RAD53), DDIT3 (GADD153, CHOP), MAPK12 (p38GAMA), MCPH1, MDC1, PPM1D, PPP1R15A (GADD34), TP53 (p53), TP73.

A tabela demonstra os genes de reparo levantados por uso de plataformas genéticas, selecionando os genes de reparo pelas suas vias de ação.

O primeiro passo para a análise é a eliminação de bases de baixa qualidade, utilizando-se como *cutoff* a precisão de chamada de base de 30% (%Q>=30). A

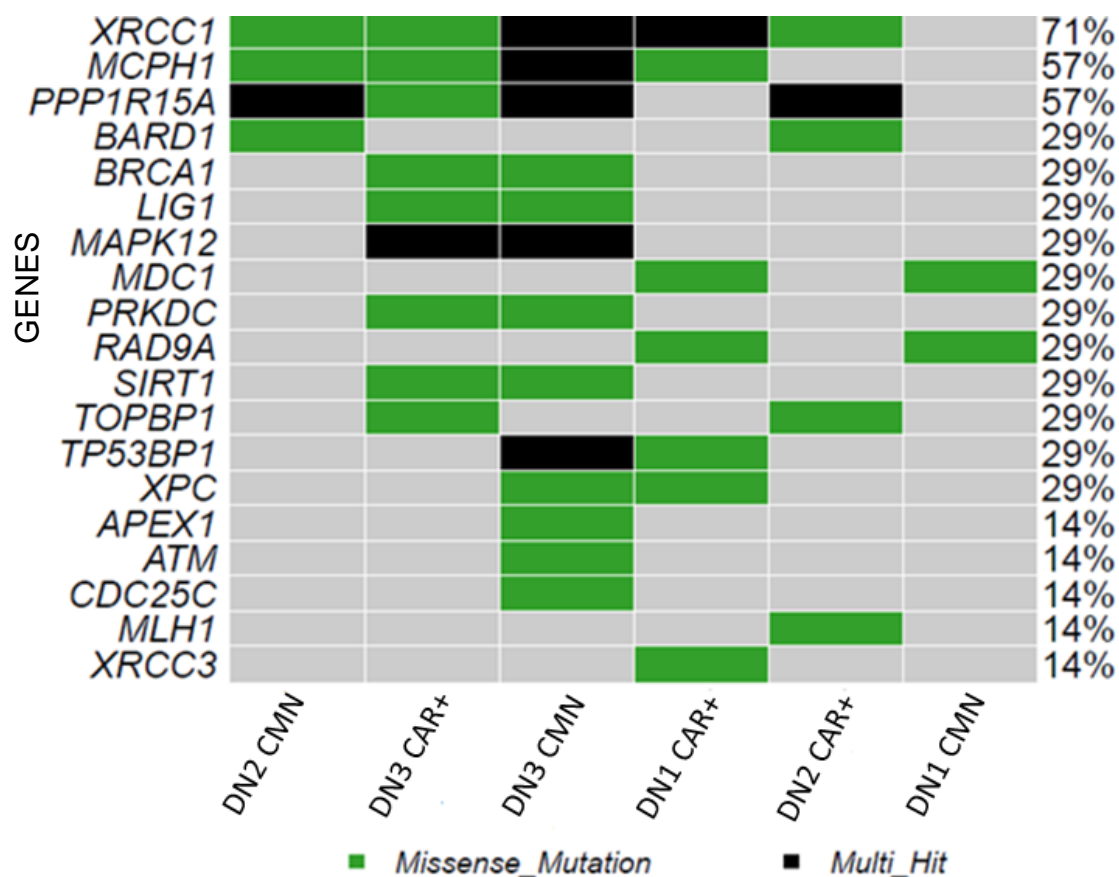
precisão de chamada de base é a probabilidade de uma base de nucleotídeo ter sido alocada erroneamente pelo sequenciador. A pontuação Q, fornecida com mais frequência, é derivada da seguinte fórmula: $Q = -10 \log_{10} P$, onde P é a probabilidade de imprecisão. Pontuações Q baixas podem indicar que os dados não podem ser usados para uma investigação mais aprofundada. Um corte comum é $Q > 30$, o que equivale a 99,9% de precisão de acerto, mas para as amostras foram utilizados um $Q > 100$, onde possuem uma precisão de 99,999999% e assim sendo selecionado em sua maioria genes com acúmulos de danos por fatores somáticos (EUROFINS GENOMICS).

Outro processo executado concomitantemente foi a utilização do preditor CADD, que fornece informação do potencial de patogenicidade das mutações. As predições são baseadas em abordagem de aprendizado de máquina, sendo analisada a conservação evolutiva, dados funcionais experimentais e as características estruturais causadas pelas mutações. Esse preditor é expresso como escores, sendo utilizado para busca o escore superior a 10, de maior potencial patogênico, refinando os dados para alvos com maior probabilidade de possuírem patogenicidade (KIRCHER et al., 2014).

Esse processo forneceu os dados necessários para as análises posteriores, fornecendo dados de genes com alta precisão de qualidade e com potencial de serem patogênicos, fornecendo o pool de genes, que foram classificados em doadores demonstrados na figura 10 (DN 1, DN 2 e DN 3) e pacientes demonstrados na figura 11 (PCCAR 1, PCCAR 2, PCCAR 3, PCCAR 4 e PCCAR 5). Esses genes foram separados e tabulados em conjunto entre as células mononucleares (amostra inicial) e CAR+ (produto final) e acrescentado a relação do gene com as vias em que atuam, esses dados são apresentados nas tabelas 5 para doadores e tabela 6 para pacientes, respectivamente.

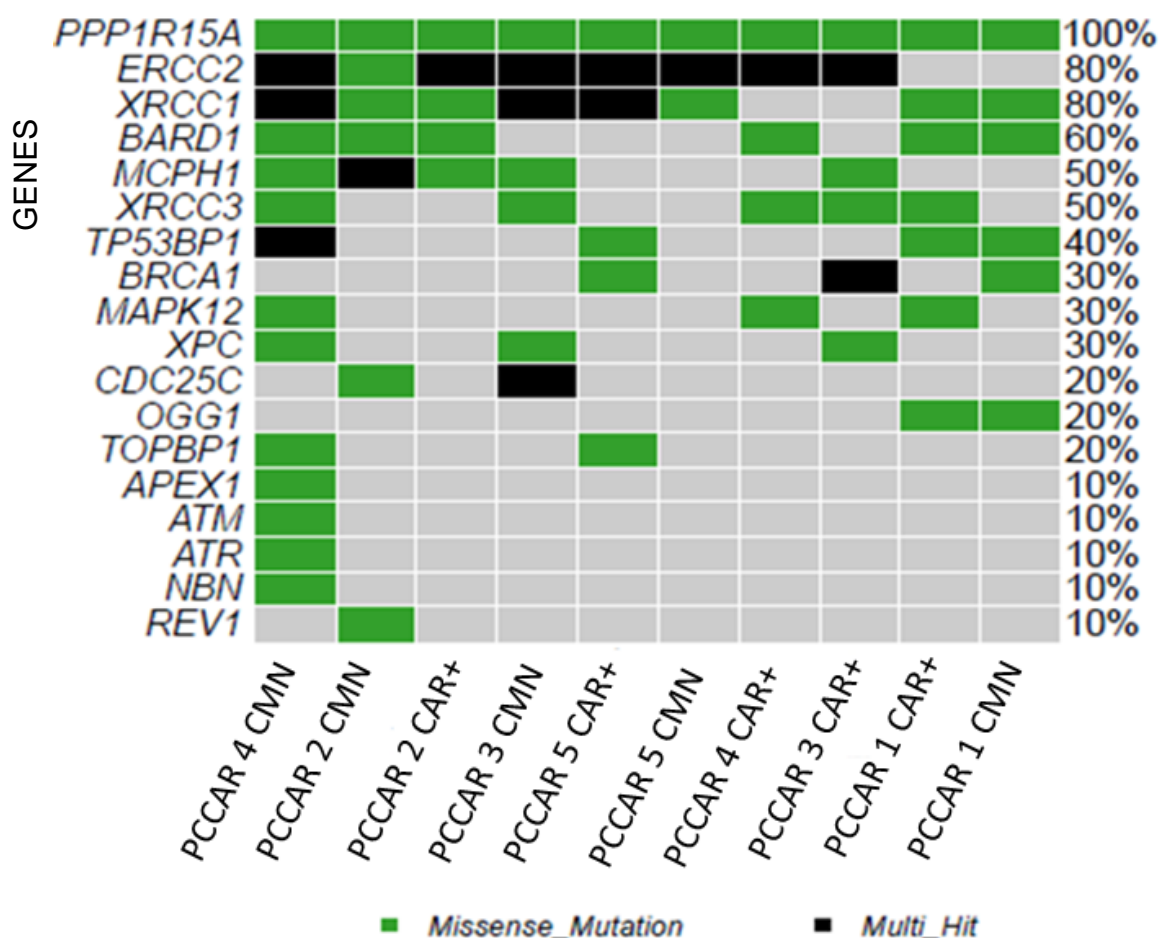
A figura 10 e 11 representa o ONCO PLOT que demonstra do lado esquerdo os genes com danos nas amostras individuais, anotados pelo VEP, apresentando os danos que ocorreram nos genes em verde e preto (missense e multi-hit respectivamente) e ao lado direito é demonstrado a incidência de mutação em tais genes. Na parte inferior, é demonstrado a identificação de cada amostra, sendo demonstrados doadores na figura 10 e pacientes na figura 11.

Figura 10-ANÁLISE ONCO PLOT DE DOADORES



Análise gráfica dos impactos individuais que estão ocorrendo nos genes de reparo de doadores saudáveis (DN 1, DN 2 e DN 3) no processo pré e pós manufatura das células geneticamente modificadas.

Figura 11-ANÁLISE ONCO PLOT PACIENTES:



Análise gráfica dos impactos individuais que estão ocorrendo nos genes de reparo de pacientes (PCCAR 1, PCCAR 2, PCCAR 3, PCCAR 4, PCCAR 5) no processo pré e pós manufatura das células geneticamente modificadas.

Nas células mononucleares e nas células CAR+ do produto acabado da tabela 5 e 7, alterações genéticas foram demarcadas por meio de técnica de análise comparativa de cores. Os genes que apresentaram alterações nas células mononucleares, mas não foram encontrados nas células CAR+ ao final do procedimento, foram sublinhados em amarelo, enquanto aqueles que permaneceram inalterados durante todo o processo de fabricação foram destacados em azul. A cor vermelha foi utilizada como destaque para os genes que apresentaram alterações no momento pós manufatura, mas não eram observadas nas células mononucleares pré-manufatura, indicando a probabilidade de ocorrência de mutações durante a produção de células CAR+. Apenas o gene BARD1 ainda não foi classificado na

literatura, porém pode funcionar na via de sinalização ATM mesmo que isso ainda não tenha sido confirmado nas literaturas e banco de dados (DELEONARDIS et al., 2017).

Cada gene foi categorizado de acordo com sua via, que incluía vias de sinalização celular, estresse celular, BER, NER, HR, resposta a danos genéticos e controle do ciclo celular como descrito anteriormente na figura 2.

Na tabela 5, referente aos doadores, é indicado em azul os danos em genes de reparo acusados no refinamento do sequenciamento nas células mononucleares pré - manufatura e que se mantém ao final do processo nas células CAR+. O destaque em amarelo refere-se aos genes que não estão apresentados com mutação durante o processo de manufatura e não aparecem no produto pós manufatura (CAR+) e vermelho os genes que são apresentados com danos ao final do processo, nas células CAR+.

Tabela 5- GENES DE REPARO MUTADOS EM DOADORES

PRÉ-MANUFATURA (CÉLULAS MONONUCLEARES)	DOADORES	PÓS-MANUFATURA (CÉLULAS CAR+)	DOADORES
BARD1 (não tem classe)		BARD1 (não tem classe)	
CIB1 (Vias de sinalização celular)		CIB1 (Vias de sinalização celular)	
LIG1 (BER)		LIG1 (BER)	
MCPH1 (Resposta ao dano genético)		MCPH1 (Resposta ao dano genético)	
MAPK12 (Vias de sinalização celular)		MAPK12 (Vias de sinalização celular)	
MDC1 (vias de sinalização celular)		MDC1 (vias de sinalização celular)	
PRKDC (HR)		PRKDC (HR)	
PPP1R15A (estresse celular)		PPP1R15A (estresse celular)	
RAD9A (Resposta ao dano genético)		RAD9A (Resposta ao dano genético)	
SIRT1 (estresse celular)		SIRT1 (estresse celular)	
TP53BP1 (Resposta ao dano genético)		TP53BP1 (Resposta ao dano genético)	
XPC (NER)		XPC (NER)	
XRCC1 (BER)		XRCC1 (BER)	
BRCA1 (HR)		BRCA1 (HR)	
ATM (Resposta ao dano genético)		XRCC3 (HR)	
APEX1 (BER)		MLH1 (Resposta ao dano genético)	
CDC25C (Resposta ao dano genético)		TOPBP1 (regulação de ciclo)	

Primeira coluna com os dados de genes com mutações com potencial patogênico em células mononucleares de doadores e segunda coluna dos genes com potencial patogênico em células CAR+ de doadores ao final da manufatura.

Na manufatura de doadores foi possível observar grande quantidade de danos em genes de reparo nas células pré-manufatura, mesmo que esses doadores sejam

saudáveis e sem tratamentos genotóxicos informados anteriormente. Após análise individual dos doadores saudáveis, foi observado que o DN 3, diferente dos outros 2 doadores (DN 1 e DN 2), tem grande quantidade de danos. Enquanto os indivíduos DN 1 e DN 2 possuem 3 e 4 danos no início da manufatura, respectivamente, o doador DN 3 possui 14, podendo indicar que esse doador tem uma diferença exacerbada de danos que não deveriam ser encontradas normalmente em indivíduos saudáveis que não tenham doenças confirmadas ou algum tipo de tratamento que seja genotóxico.

Para demonstrar essa diferença, o doador DN 3 foi removido do pool inicial de amostras de doadores normais e, um segundo pool, contendo apenas as amostras dos doadores DN 1 e DN 2, foi gerado (Tabela 6), demonstrando a diferença no processo de análise.

Tabela 6-DEMONSTRAÇÃO DE DOADORES EM ANÁLISE INDIVIAL

PRÉ-MANUFATURA DOADORES (CÉLULAS MONONUCLEARES)	PÓS-MANUFATURA DOADORES (CÉLULAS CAR+)
MDC1 (sinalização celular)	MDC1 (sinalização celular)
RAD9A (resposta ao dano genético)	RAD9A (resposta ao dano genético)
CIB1 (sinalização celular)	CIB1 (sinalização celular)
BARD1 (não tem classe)	BARD1 (não tem classe)
XRCC1 (BER)	XRCC1 (BER)
PPP1R15A (estresse celular)	PPP1R15A (estresse celular)
MCPH1 (resposta ao dano genético)	MCPH1 (resposta ao dano genético)
	XRCC3 (HR)
	XPC (NER)
	TOPBP1 (regulação de ciclo)
	MLH1 (resposta ao dano genético)

Representação de danos em genes de reparo dos doadores DN 1 e DN 2, retirando o doador DN 3. A primeira coluna com os dados de genes com mutações com potencial patogênico em células mononucleares de doadores e segunda coluna dos genes com potencial patogênico em células CAR+ de doadores ao final da manufatura.

Quando avaliamos os dados de pacientes, tabela 6, pode-se observar uma grande quantidade de danos de gene de reparo com potencial patogênico no início da manufatura, que se mantém até o produto final, nas células geneticamente modificadas. Observou-se que existem danos que são eliminados durante o processo

de manufatura, indicado em amarelo e não possuem novos genes de reparo mutados ao final da manufatura das células CAR+.

Tabela 7-GENES DE REPARO MUTADOS EM PACIENTES

PRÉ-MANUFATURA (CÉLULAS MONONUCLEARES)	PACIENTES	PÓS-MANUFATURA (CÉLULAS CAR+)	PACIENTES
BARD1 (não tem classe)		BARD1 (não tem classe)	
BRCA1 (HR)		BRCA1 (HR)	
CIB1 (Vias de sinalização celular)		CIB1 (Vias de sinalização celular)	
DDB2 (NER)		DDB2 (NER)	
DDIT3 (Regulação de ciclo)		DDIT3 (Regulação de ciclo)	
ERCC2 (NER)		ERCC2 (NER)	
MCPH1 (Resposta ao dano genético)		MCPH1 (Resposta ao dano genético)	
MAPK12 (Vias de sinalização celular)		MAPK12 (Vias de sinalização celular)	
OGG1 (BER)		OGG1 (BER)	
RAD17 (Resposta ao dano genético)		RAD17 (Resposta ao dano genético)	
TP53BP1 (Resposta ao dano genético)		TP53BP1 (Resposta ao dano genético)	
TOPBP1 (regulação de ciclo)		TOPBP1 (regulação de ciclo)	
XPC (NER)		XPC (NER)	
XRCC3 (HR)		XRCC3 (HR)	
PPP1R15A (estresse celular)		PPP1R15A (estresse celular)	
XRCC1 (BER)		XRCC1 (BER)	
APEX1 (BER)			
ATM (Resposta ao dano genético)			
ATR (Resposta ao dano genético)			
NBN (HR)			
CDC25C (Resposta ao dano genético)			
REV1 (via de replicação translesional)			

Primeira coluna com os dados de genes com mutações com potencial patogênico em células mononucleares de pacientes e segunda coluna dos genes com potencial patogênico em células CAR+ de pacientes ao final da manufatura.

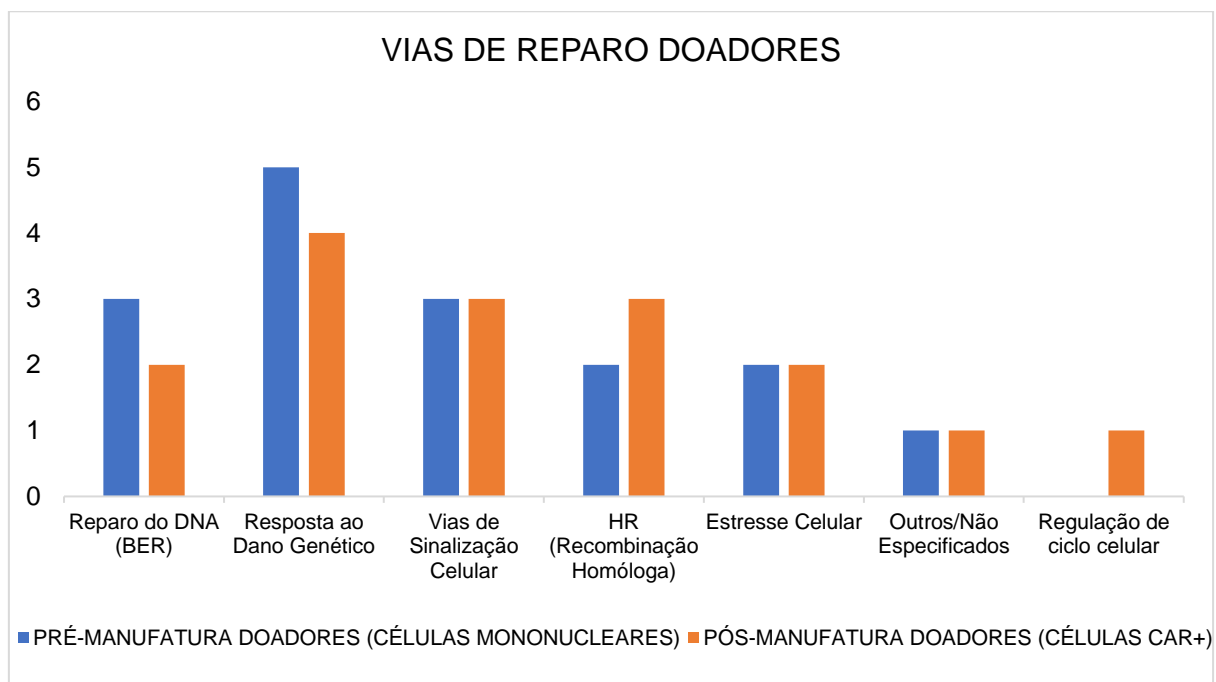
Os gráficos 12 - 14 ilustram, de forma simplificada, o número total de genes por via de reparo, pré (azul) e pós (laranja) manufatura.

Na figura 12 vemos a representação, de forma quantitativa, de vias de reparo que os genes anteriormente citados estão envolvidos, nos doadores DN 1, DN 2 e DN 3. É possível observar que as vias que sofreram maior variação em relação à presença e ausência de alteração pré- e pós-manufatura, foram as vias BER, dano genético, HR e regulação do ciclo celular. Retirando-se o DN 3 da análise (Figura 13),

observamos maior variabilidade nas vias dano genético, HR, regulação do ciclo celular e NER.

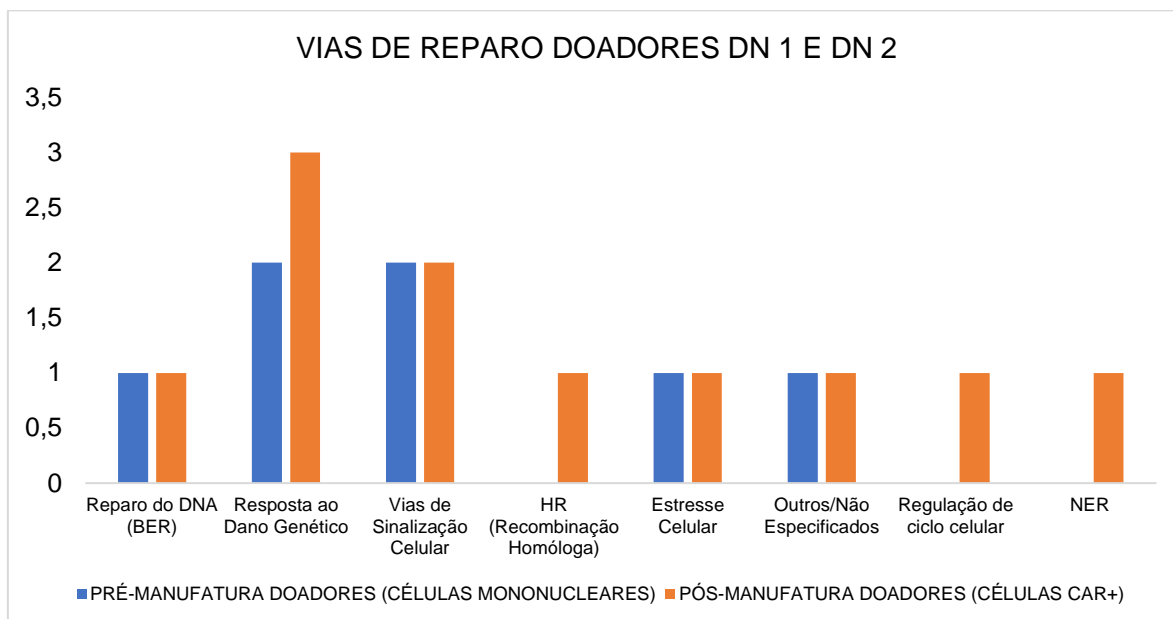
A figura 14 tem demonstrado os dados da tabela 4, dos pacientes PCCAR 1, PCCAR 2, PCCAR 3, PCCAR 4 e PCCAR 5, com destaque para as vias de dano genético, HR e de replicação translesional.

Figura 12-COMPARATIVO DE VIAS DE REPARO DOADORES



A figura representa de forma de gráfico de barras as vias de reparo de amostras de doadores pré e pós manufatura das células CAR+. Nesse gráfico, é possível identificar a alocação de cada gene mutado em suas respectivas vias.

Figura 13-COMPARATIVO DE VIAS DE REPARO INDIVIDUAIS



A figura representa de forma de gráfico de barras as vias de reparo de amostras de doadores DN 1 e DN 2, pré e pós manufatura das células CAR+. Nesse gráfico, é possível identificar a alocação de cada gene mutado em suas respectivas vias.

A figura 14 tem como objetivo demonstrar os dados da tabela 6, dos pacientes PCCAR 1, PCCAR 2, PCCAR 3, PCCAR 4 e PCCAR 5, informando quantitativamente qual gene está relacionado com cada via.

Figura 14-COMPARATIVO DE VIAS DE REPARO PACIENTES

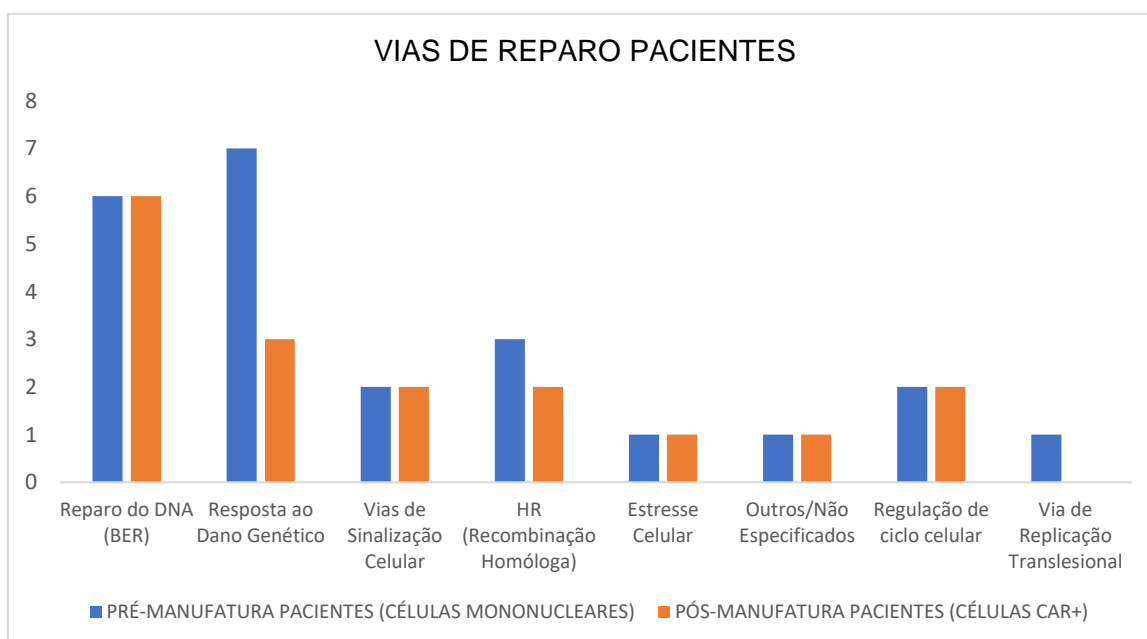


Figura 14: A figura representa de forma de gráfico de barras as vias de reparo de amostras de pacientes com LLA e LNH pré e pós manufatura das células CAR+. Nesse gráfico, é possível identificar a alocação de cada gene mutado em suas respectivas vias.

5.4 LEVANTAMENTO DE PRONTUÁRIOS

A coleta de dados de prontuários, tanto dos pacientes LNH/LLA e doadores normais mostrou ausência de doença prévia conhecida até a coleta das células mononucleares em todos os doadores. A tabela 8 ilustra os medicamentos quimioterápicos utilizados pelos pacientes, previamente à coleta por leucaférese.

O primeiro dado levantado dos prontuários foram os quimioterápicos, que tem por objetivo serem avaliados os mecanismos de ação e a associação dos mecanismos de ação com os danos encontrados nas análises, danos de gene de reparo, avaliando seu impacto nas células mononucleares pré-processamento.

Concomitantemente avaliar sua classificação medicamentosa informada na literatura, analisando a maneira em que poderiam afetar as vias de reparo.

Tabela 8-QUIMIOTERÁPICOS RELATADOS EM PRONTUÁRIOS

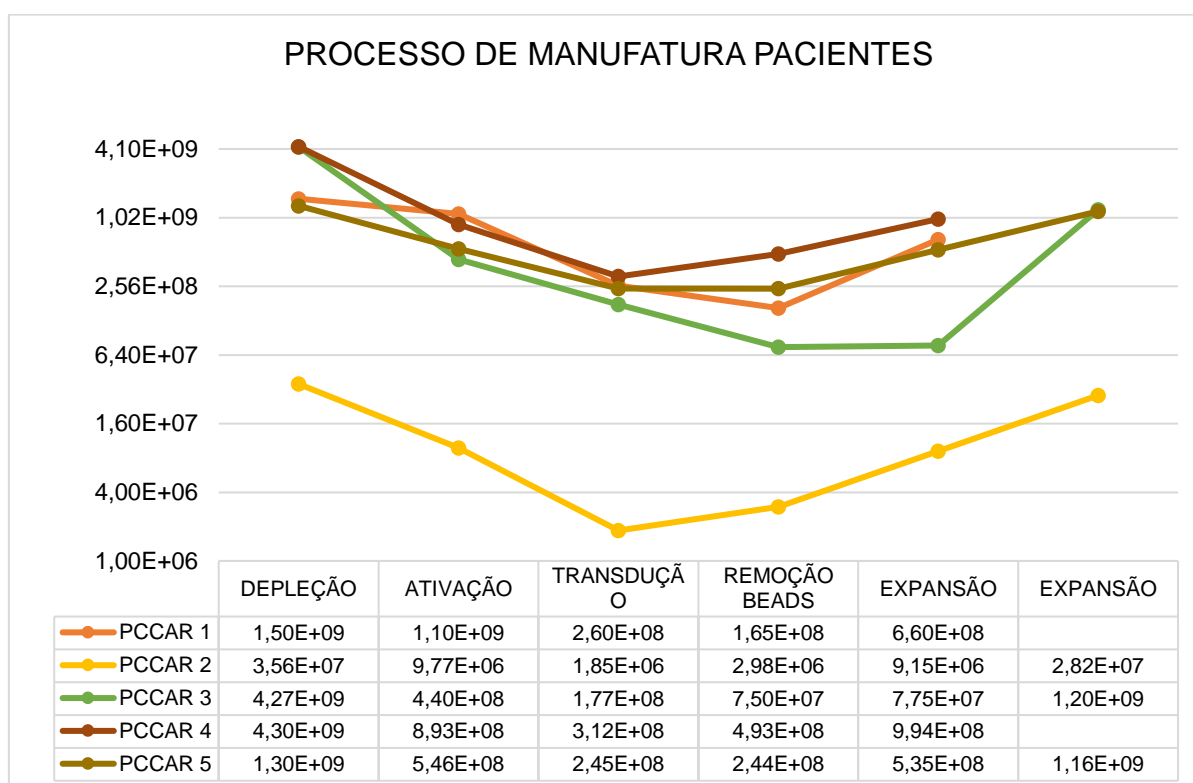
QUIMIOTERÁPICOS	CLASSES	REFERÊNCIA
BENDAMUSTINA	Agente Alquilante	(LALIC; AURER; BATINIC; VISNJIC; SMOLJO; BABIC, 2022)
CARBOPLATINA	Agente Alquilante	(OGURI; SAKAKIBARA; MASE; SHIMIZU; ISHIKAWA; KIMURA; SMYTH, 1988)
CICLOFOSFAMIDA	Agente Alquilante	(SAR; MONTES-BAYÓN; ORTIZ; BLANCO-GONZÁLEZ; SIERRA; SANZ-MEDEL, 2007)
CISPLATINA	Agente Alquilante	(DASARI; TCHOUNWOU, 2014)
CITARABINA	Análogos de nucleosídeo	(RECHKOBLIT; JOHNSON; BUKU; PRAKASH; PRAKASH; AGGARWAL, 2019)
DAUNORRUBICINA	Antraciclinas	(AUBEL-SADRON; LONDOS-GAGLIARDI, 1984)
DOXORRUBICINA	Antraciclinas	(ZANDEN; QIAO; NEEFJES, 2020)
ETOPOSÍDEO	Inibidor da topoisomerase II	(HANDE, 1998)
FLUDARABINA	Análogos de purina	(CHESON; A VENA; FOSS; SORENSEN, 1994)
GENCITABINA	Análogos de nucleosídeo	(GESTO; CERQUEIRA; FERNANDES; RAMOS, 2012)
IFOSFAMIDA	Agente Alquilante	(FURLANUT; FRANCESCHI, 2003)
MITOXANTRONE	Antraciclina	(THOMAS; ARCHIMBAUD, 1997)
OXALIPLATINA	Agente Alquilante	(ALCINDOR; BEAUGER, 2011)
PROCARBAZINA	Agente Alquilante	(ARMAND; RIBRAG; HARROUSSEAU; ABREY, 2007)
TIOGUANINA	Análogos de purina	(SPRANGERS; COSMAI; PORTA, 1982)
VINCRISTINA	Alcalóides da vinca	(VERMA; SHARMA; GAUR; KUMAR, 2022)
	Alcalóides da vinca	(BAYSSAS; GOUVEIA; VASSAL; MISSET; SCHWARZENBERG; RIBAUD; MUSSET; JASMIN; HAYAT; MATHÉ, 1980)
VINDESINA		
VINORELBINE	Alcalóides da vinca	(R_K-GREGORY, 2000)

Representação dos quimioterápicos utilizados pelos pacientes durante o processo de tratamento a partir dos prontuários e suas classes medicamentosas.

5.5 ANÁLISE DE MANUFATURA

A análise das fichas de produção (figuras 15 e 16), mostra o percentual de viabilidade celular ao longo do processo de manufatura. Observamos que o padrão celular entre os pacientes não apresenta grande variabilidade, com exceção da amostra do paciente PCCAR 2, produzido em pequena escala e consequente, com menor número de células. No entanto, o perfil de proliferação celular mostrou-se similar ao dos outros pacientes produzidos em larga escala.

Figura 15-MANUFATURA QUANTITATIVA DE PACIENTES

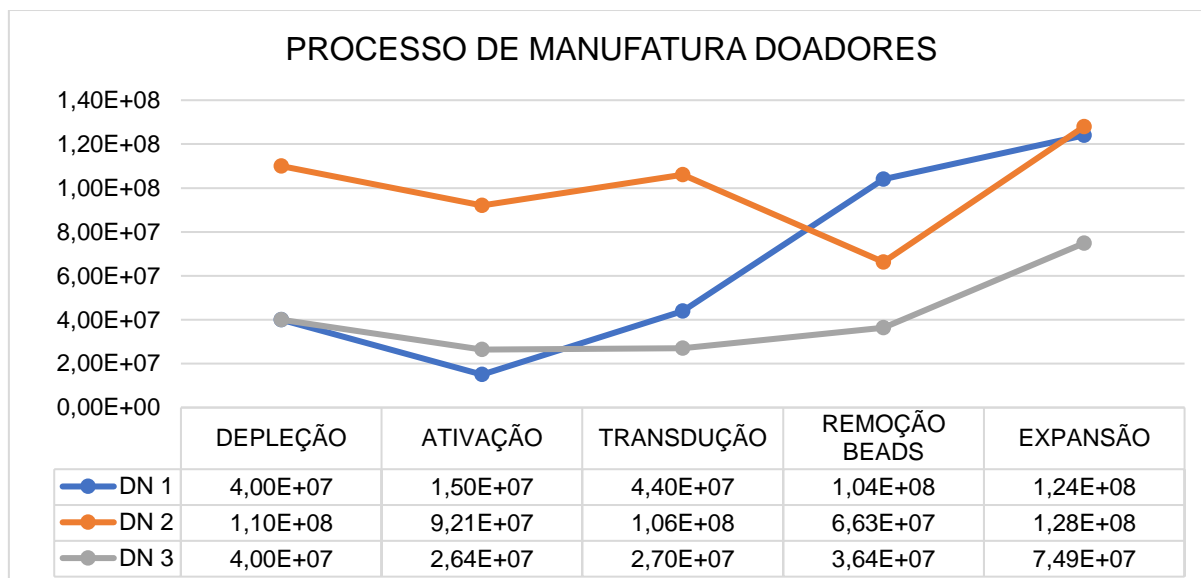


A figura representa o processo de manufatura para as células geneticamente modificadas dos pacientes PCCAR 1, PCCAR 2, PCCAR 3, PCCAR 4 e PCCAR 5, apontando os pontos de contagem de células nos momentos críticos da manufatura.

A representação da figura 16 traz as informações do percentual de viabilidade celular, para os doadores. Pode-se observar que os doadores DN 1 e DN 2 tem um perfil celular similar, apenas na etapa de remoção das beads, que é um processo físico que utiliza magnetismo e levar a retirada de células do processo e assim, consequentemente, reduzir o número celular, mas o mesmo obteve quantidades promissoras durante a expansão. Entretanto, quando observado o processo de manufatura do DN 3, pode-se observar que o mesmo possui redução de células e um

perfil delongado de crescimento celular se comparado com o mesmo processo de manufatura dos doadores DN 1 e DN 2.

Figura 16-MANUFATURA QUANTITATIVA DOADORES



A figura representa o processo de manufatura para as células geneticamente modificadas dos doadores DN 1, DN 2 e DN 3, apontando os pontos de contagem de células nos momentos críticos da manufatura.

A contagem absoluta do percentual de células viáveis por estágio de manufatura, para doadores e pacientes, pode ser observada na Tabela 9. Os pacientes apresentaram uma média de viabilidade de 94,76% pré manufatura e 95,68% pós manufatura e com média de CAR + de 26,62%. Em doadores a viabilidade é de 95,96% pré manufatura, 95,43% pós manufatura e CAR+ de 48,4%.

Tabela 9- REPRESENTAÇÃO DE VIABILIDADE E % DE CAR+

PACIENTES/ DOADORES	VIABILIDADE		PORCENTAGEM DE CAR+
	CELULAR PRÉ MANUFATURA	CELULAR PÓS MANUFATURA	
PCCAR 1	95,5%	88,5%	49,9%
PCCAR 2	89,0%	90,9%	22,8%
PCCAR 3	99,8%	99,8%	18,1%
PCCAR 4	99,8%	99,4%	20,2%
PCCAR 5	89,7%	99,8%	22,1%
DN 1	90,5%	98,5%	41,2%
DN 2	97,9%	89,9%	39,3%
DN 3	99,5%	97,9%	64,8%

Tabela com representação de viabilidade celular pré e pós manufatura e porcentagem de CAR+ de pacientes e doadores.

DISCUSSÃO

Segundo as estimativas do instituto nacional do câncer (INCA), no triênio de 2023 a 2025, foram diagnosticados 5.930 novos casos por ano de LLA e 10.810 de LNH por ano no Brasil (INCA, 2022). O tratamento para tais neoplasias é definido pelo estágio da doença e geralmente envolve o uso de agentes quimioterápicos, associado ou não ao transplante medular, radioterapia, terapias alvo, imunoterapia com anticorpos monoclonais e a terapia com células T-CAR (SHEYKHHASAN; MANOOCHEHRI; DAMA, (2022); KERSTEN; SPANJAART; THIEBLEMONT, (2020).

O tratamento de LLA e LNH no Brasil segue uma abordagem multidisciplinar de tratamentos prévios, antes de ser inserida imunoterapia com células modificadas. A terapia com células T-CAR tem sido revolucionária no tratamento de cânceres hematológicos, sendo muito utilizada para o tratamento de LLA e LNH. No entanto, esta nova abordagem terapêutica traz consigo desafios como a grande complexidade e custo de fabricação, persistência da célula modificada no organismo do paciente, toxicidade, segurança e aplicações clínicas, tornando-a um desafio para a saúde pública, ressaltando a necessidade de estudos complementares para melhor introdução da terapia no mercado, reduzindo custo e fornecendo maior segurança (NARKHEDE; MEHTA; ANSELL; GOYAL, (2021); DIMITRI; HERBST; FRAIETTA, 2022). Neste sentido, a análise genética das amostras pré e pós manufatura podem contribuir para o melhoramento do processo como um todo.

No atual projeto, foram selecionados uma pequena coorte de pacientes e doadores manufaturados com o intuito de avaliar e inserir uma possível área de estudo, assim utilizando sequenciamento genético de Exoma e análises de bioinformática, sendo analisados assim os genes de reparo que podem apresentar danos e avaliar assim a segurança da produção.

Os genes de reparo apresentam importante papel no funcionamento da integridade da maquinaria genética e manutenção dos genes, funcionando de maneira orquestrada para aumentar a longevidade celular ou levar a mesma à morte, como mecanismo de segurança. Defeitos nas vias de reparo podem causar ambientes genômicos instáveis e caóticos, podendo aumentar a frequência de mutações e problemas genéticos (RONEN; GLICKMAN, 2001) .

Inicialmente, foram analisados os dados das amostras pré-manufatura dos pacientes, as células mononucleares, com o objetivo de avaliar e identificar se os

genes de reparo estavam apresentando mutações patogênicas no início da produção, tendo em vista avaliar o impacto que poderia carrear na manufatura a entrada de grande quantidade de genes danificados, sendo filtrados e selecionados pelo preditor CADD (EUROFINS GENOMICS; KIRCHER et al., 2014) .

Em doador e pacientes foram identificados tais danos. Em pacientes, após análise em literatura, pode-se inferir que grande parte desses danos foram causados pela doença ou pelos tratamentos prévios como a quimioterapia e assim, podendo interferir na sobrevivência celular durante a manufatura (BOOGAARD; KOMNINOS; VERMEIJ, 2022).

Após o levantamento dos dados dos pacientes e listar os quimioterápicos que foram utilizados para os tratamentos pôde-se observar a similaridade da literatura com as vias mutadas em pacientes.

Corroborando com os dados encontrados na figura 12, o maior número de danos de genes encontrados são pertencentes a via BER e de resposta ao dano genético, relacionando com o que a literatura apresenta, agentes alquilantes e quimioterápicos a base de platina causam modificações diretas no DNA, ativando o reparo de danos como os de via NER, sendo tratamentos de ampla gama de cânceres, enquanto alquilantes não tradicionais podem ativar vias de reparação como BER e o uso de radioterápicos e radiomiméticos que causam um efeito mais tóxico ao DNA, levam a ativação de vias como NHEJ e HR e espécies reativas de oxigênio (EROs) podem levar a oxidação de bases, fragmentação de açúcares e as quebras de fita simples dos complexos de DNA, podendo gerar estresse celular, problemas em regulação do ciclo celular e as sinalizações celulares, assim sendo apresentados para diferentes vias de reparo (WOODS; TURCHI, 2013).

Análogos a nucleosídeos e análogos de purina possuem interferência nos mecanismos de reparo de DNA e são relatados como potencialmente envolvidos com danos por EROs podendo desenvolver danos em genes de reparo e ao estresse celular por serem medicamentos que impactam em células em replicação afetando diretamente na fase S e G2 da replicação celular, levando ao estresse replicativo e a possível mutação em genes de reparo (TORGOVNICK; SCHUMACHER, 2015). Medicamentos com base de Antraciclina são descritos com alto potencial de causar danos em vias de MMR, BER e HR, como também causar estresse celular por ter potencial de interferir no ciclo celular (SPENCER; BILARDI; KOCH; POST; NAFIE; KIMURA; CUTTS; PHILLIPS, 2008). Alcaloide de vinca podem atuar em diferentes

fases do ciclo celular, sendo mais significativo na fase M, podendo causar estresse celular e mutações em vias de NER, BER, MMR e HR (EHRHARDT; SCHREMBBS; MORITZ; WACHTER; HALDAR; GRAUBNER; NATHRATH; JEREMIAS, (2011) ; (EHRHARDT; PANNERT; PFEIFFER; WACHTER; AMTMANN; JEREMIAS, (2013).

Com isso é passível de associação aos danos em gene de reparo em pacientes, pois todos receberam processos quimioterápicos anteriores ao tratamento com o T-CAR, sendo esses tratamentos administrados em ciclos contendo dois ou mais dos quimioterápicos apontados na tabela 5, causando ação patogênica em todas as vias de gene de reparo por diferentes mecanismos. Esses dados também ajudaram a executar a exclusão da próxima avaliação das amostras, mostrando o que foi causado possivelmente pela manufatura.

Ao final da manufatura, quando observados em pacientes, a incidência de aparecimentos de novos danos em genes de reparo não ocorreu, podendo ser pelo motivo de quantidade de morte celular que ocorre durante a manufatura (SALZ; SEITZ; SCHÄFER; FRANZEN; HOLZER; GARCIA-PRIETO; BÜRGER; HARDT; ESTELLER; WAGNER, 2023) já que durante o processo de manufatura, como descrito anteriormente, uma grande quantidade de materiais e insumos são adicionados às células para sua produção, podendo levar a um estresse replicativo e assim causar sua morte (WATANABE; MO; MCKENNA, 2022). Outros estudos apontam que células T em repouso, ou seja, não ativadas, tem um perfil diferente na expressão gênica e na sua cromatina, sendo deficiente no reparo e podendo apresentar maiores danos em genes e genes de reparo, entretanto quando estimulados e ativados, os genes dos linfócitos T passam a ter maior capacidade de reparo, levando a possibilidade de ocorrer reparo celular ou serem desencadeadas vias de morte celular (HU; XIE; GE; NIE; TAO; ZHAO, 2018).

Esse processo de morte pode causar a seleção de populações celulares e não prolongando os danos nas células filhas após a replicação celular que apareceram durante a manufatura e também sendo possível o desaparecimento de danos nesses genes que eram observados inicialmente nas células mononucleares, já que populações que possuíam esse gene podem ter sido eliminadas durante o processo por morte celular (BORGES; LINDEN; WANG, 2007).

Ao realizar a avaliação de doadores saudáveis, foram indicados danos de genes de reparo no pré e pós manufatura em grande quantidade. Após a análise individual dos doadores, foi relatada a alteração do doador DN 3, que apresenta

quantidades elevadas de danos em relação aos DN 1 e DN 2. Esses doadores foram então separados para demonstração dos dados.

Em análise de doadores, pode-se inferir que a falta de tratamento genotóxico anterior beneficia na expansão celular e na transdução do CAR+. Quando observado o doador DN 3, houve diferença de produção celular, sendo reduzido o número de células ao final da manufatura e sua expansão não foi elevada como a dos outros doadores.

Ao final da manufatura de doadores, pode-se observar a mutação de genes de reparo que não foram observados em comparação aos pacientes. Não foram encontradas referências na literatura sobre esse efeito em doadores saudáveis, mas é possível que a baixa morte celular em comparação com a manufatura de pacientes possa ter infringido mais injúrias nas células de doadores e como a manufatura pode causar mutações genéticas em vários níveis, incluindo genes de reparo, a falta de morte celular pode ter acarretado a incidência de mutações em certas populações celulares desses doadores e encontradas no produto final de células geneticamente modificadas (SALZ; SEITZ; SCHÄFER; FRANZEN; HOLZER; GARCIA-PRIETO; BÜRGER; HARDT; ESTELLER; WAGNER, 2023).

CONCLUSÃO

A análise de dados exploratória, embora a casuística seja de tamanho limitado, sugere promissores resultados quanto à inclusão de estudo de dados genéticos, para o desenvolvimento e aprimoramento do processo de manufatura das células CAR-T.

A possibilidade do uso de marcadores genéticos específicos para triagem e/ou seleção como nova ferramenta de estudo pode elucidar o perfil genético de pacientes com maiores chances de sucesso quanto à modificação exigida na terapia CAR-T. Por outro lado, seu uso em doadores saudáveis pode auxiliar no desenvolvimento da terapia com CAR-T haplogênico, baseado no estudo de vias genéticas.

Para melhor compreensão do impacto do uso de dados genéticos em processos de melhoria de manufatura para as células CAR-T, sugerimos o aumento da casuística tanto em número de participantes saudáveis e doentes, a análise em múltiplos pontos da manufatura e também, análise de dados do transcriptoma e/ou metiloma.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K. et al. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2015. 1262 p. Tradução de Tatiana Ferreira Robaina et al.
- ALCINDOR, Thierry; BEAUGER, N.. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 18-25, 1 fev. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3747/co.v18i1.708>.
- ALHMOUD, Jehad F.; WOOLLEY, John F.; MOUSTAFA, Ala-Eddin Al; MALKI, Mohammed Imad. DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers*, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 1050, 23 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12041050>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Non-Hodgkin Lymphoma Causes , Risk Factors , and Preventivo Non-Hodgkin Lymphoma Risk Factors*. p. 1–12, [s.d.].
- ANGI, M. et al. The t(8;14)(q24.1;q32) and its variant translocations: A study of 34 cases. *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy*, v. 10, n. 3, p. 126–134, 2017.
- ARMAND, Jean-Pierre; RIBRAG, Vincent; HARROUSSEAU, Jean-Luc; ABREY, Lauren. Reappraisal of the use of procarbazine in the treatment of lymphomas and brain tumors. *Therapeutics And Clinical Risk Management*, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 213-224, abr. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/tcrm.2007.3.2.213>.
- ASHWORTH, Alan. A Synthetic Lethal Therapeutic Approach: poly(adp) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in dna double-strand break repair. *Journal Of Clinical Oncology*, [S.L.], v. 26, n. 22, p. 3785-3790, 1 ago. 2008. American Society of Clinical Oncology (ASCO).
- AUBEL-SADRON, Geneviève; LONDOS-GAGLIARDI, Danielle. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*, [S.L.], v. 66, n. 5, p. 333-352, maio 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084\(84\)90018-x](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084(84)90018-x).
- BAKSHI, S. R. et al. Trisomy 8 in leukemia: A GCRI experience. *Indian Journal of Human Genetics*, v. 18, n. 1, p. 106–108, 2012.
- BAYSSAS, M.; GOUVEIA, J.; VASSAL, F. de; MISSET, J.-L.; SCHWARZENBERG, L.; RIBAUD, P.; MUSSET, M.; JASMIN, C.; HAYAT, M.; MATHÉ, G.. Vindesine: a new vinca alkaloid. *Recent Results In Cancer Research*, [S.L.], p. 91-97, 1980. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-81488-4_13.
- BOOGAARD, Winnie M. C. van Den; KOMNINOS, Daphne S. J.; VERMEIJ, Wilbert P.. Chemotherapy Side-Effects: not all dna damage is equal. *Cancers*, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 627, 26 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14030627>.
- BOOGAARD, Winnie M. C. van Den; KOMNINOS, Daphne S. J.; VERMEIJ, Wilbert P.. Chemotherapy Side-Effects: not all dna damage is equal. *Cancers*, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 627, 26 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14030627>.

BORGES, Helena Lobo; LINDEN, Rafael; WANG, Jean Yj. DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell Research*, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 17-26, 18 dez. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.110>.

Broad Institute. GATK. Disponível em: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>. Acesso em: 12/04/2023.

Broad Institute. Picard. Disponível em: <https://broadinstitute.github.io/picard/>. Acesso em: 12/04/2023.

bwa-mem2. The next version of bwa-mem. Disponível em: <https://github.com/bwa-mem2/bwa-mem2>. Acesso em: 12/04/2023.

CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A. D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break Mechanisms of DNA DSB Repair. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 26, n. 1, p. 52–64, 2016.

CHESON, B D; A VENA, D; FOSS, F M; SORENSEN, J M. Neurotoxicity of purine analogs: a review.. *Journal Of Clinical Oncology*, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 2216-2228, out. 1994. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.1994.12.10.2216>.

CHOUDHURY, Sangita; HUANG, August Yue; KIM, Junho; ZHOU, Zinan; MORILLO, Katherine; MAURY, Eduardo A.; TSAI, Jessica W.; MILLER, Michael B.; LODATO, Michael A.; ARATEN, Sarah. Somatic mutations in single human cardiomyocytes reveal age-associated DNA damage and widespread oxidative genotoxicity. *Nature Aging*, [S.L.], v. 2, n. 8, p. 714-725, 11 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s43587-022-00261-5>.

DASARI, Shaloam; TCHOUNWOU, Paul Bernard. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal Of Pharmacology*, [S.L.], v. 740, p. 364-378, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.

DELEONARDIS, K. et al. Challenges in Interpreting Germline Mutations in BARD1 and ATM in Breast and Ovarian Cancer Patients. *The Breast Journal*, v. 23, n. 4, p. 461–464, jul. 2017.

DIMITRI, Alexander; HERBST, Friederike; FRAIETTA, Joseph A.. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing. *Molecular Cancer*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 20-45, 18 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-022-01559-z>.

DINOFIA, Amanda M.; GRUPP, Stephan A.. Will allogeneic CAR T cells for CD19+ malignancies take autologous CAR T cells 'off the shelf'? *Nature Reviews Clinical Oncology*, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 195-196, 19 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

EHRHARDT, H; PANNERT, L; PFEIFFER, S; WACHTER, F; AMTMANN, E; JEREMIAS, I. Enhanced anti-tumour effects of Vinca alkaloids given separately from

cytostatic therapies. *British Journal Of Pharmacology*, [S.L.], v. 168, n. 7, p. 1558-1569, 12 mar. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12068>.

EHRHARDT, Harald; SCHREMBS, David; MORITZ, Christian; WACHTER, Franziska; HALDAR, Subrata; GRAUBNER, Ulrike; NATHRATH, Michaela; JEREMIAS, Irmela. Optimized anti-tumor effects of anthracyclines plus Vinca alkaloids using a novel, mechanism-based application schedule. *Blood*, [S.L.], v. 118, n. 23, p. 6123-6131, 1 dez. 2011. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-02-269811>.

Ensembl. Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). Disponível em: <https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>. Acesso em: 12/04/2023.

EUROFINS GENOMICS. Eurofins Genomics. Disponível em: <https://eurofinsgenomics.eu/en/eurofins-genomics/product-faqs/sanger-sequencing/technical-questions/what-are-q20-q30-q40-bases/>. Acesso em: [10/06/2023].

FEINS, Steven; KONG, Weimin; WILLIAMS, Erik F.; MILONE, Michael C.; FRAIETTA, Joseph A.. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *American Journal Of Hematology*, [s.l.], v. 94, n. 1, p. 3-4, 18 fev. 2019. Wiley.

FU, Wenyan; LEI, Changhai; LIU, Shuowu; CUI, Yingshu; WANG, Chuqi; QIAN, Kewen; LI, Tian; SHEN, Yafeng; FAN, Xiaoyan; LIN, Fangxing. CAR exosomes derived from effector CAR-T cells have potent antitumour effects and low toxicity. *Nature Communications*, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-12, 25 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

FUJITA, T. C. et al. Acute lymphoid leukemia etiopathogenesis. *Molecular Biology Reports*, v. 48, n. 1, p. 817-822, 2021.

FURLANUT, M.; FRANCESCHI, L.. Pharmacology of Ifosfamide. *Oncology*, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 2-6, 2003. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000073350>.

GESTO, D. S.; CERQUEIRA, N. M.F.s.A.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J.. Gemcitabine: a critical nucleoside for cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 19, n. 7, p. 1076-1087, 1 mar. 2012. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986712799320682>.

HANDE, K.R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase ii inhibitor. *European Journal Of Cancer*, [S.L.], v. 34, n. 10, p. 1514-1521, set. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0959-8049\(98\)00228-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0959-8049(98)00228-7).

HELTEMES-HARRIS, L. M. et al. Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acutelymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 6, p. 1135-1149, 2011.

HU, Qian; XIE, Yujie; GE, Yuanlong; NIE, Xin; TAO, Jun; ZHAO, Yong. Resting T cells are hypersensitive to DNA damage due to defective DNA repair pathway. *Cell*

Death & Disease, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 14-56, 31 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0649-z>.

Illumina. FastQC. Disponível em: <https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/fastqc.html>. Acesso em: 12/04/2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 17 out. 2023

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Banco de dados online]. Disponível em: <https://www.kegg.jp/kegg/>. Acesso em: (10/07/2022)

KERSTEN, Marie José; SPANJAART, Anne Mea; THIEBLEMONT, Catherine. CD19-directed CAR T-cell therapy in B-cell NHL. *Current Opinion In Oncology*, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 408-417, 28 jul. 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cco.0000000000000668>.

KIRCHER, M. et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics*, v. 46, n. 3, p. 310–315, 2 mar. 2014.

LALIC, Hrvoje; AURER, Igor; BATINIC, Drago; VISNJIC, Dora; SMOLJO, Tomislav; BABIC, Antonija. Bendamustine: a review of pharmacology, clinical use and immunological effects (review). *Oncology Reports*, [S.L.], v. 47, n. 6, p. 1-20, 3 maio 2022. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2022.8325>.

Levine BL, Bernstein WB, Connors M, Craighead N, Lindsten T, Thompson CB, et al. Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells. *J Immunol*. 1997;159:5921–30.

LEVINE, B. L. *et al.* Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, v. 4, n. March, p. 92–101, 2017. LEVINE, Bruce L. *et al.* Global Manufacturing of CAR T-CELL Therapy. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, [s.l.], v. 4, p.92-101, mar. 2017. Elsevier BV.

LI, J. et al. Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 51, n. 9, p. 879–889, 2019.

Martin, M. Cutadapt. Disponível em: <https://cutadapt.readthedocs.io/>. Acesso em: 17 out. 2023.

MAUDE, Shannon L.; LAETSCH, Theodore W.; BUECHNER, Jochen; RIVES, Susana; BOYER, Michael; BITTENCOURT, Henrique; BADER, Peter; VERNERIS, Michael R.; STEFANSKI, Heather E.; MYERS, Gary D.. Tisagenlecleucel in Children

and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 378, n. 5, p. 439-448, fev. 2018. Massachusetts Medical Society.

MAYER, Erica L.. Early and Late Long-Term Effects of Adjuvant Chemotherapy. *American Society Of Clinical Oncology Educational Book*, [S.L.], n. 33, p. 9-14, maio 2013. American Society of Clinical Oncology (ASCO).

MOURA, M. DE; HOUTEN, B. VAN. Review Article. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 405, n. April, p. 391–405, 2010.

MultiQC. MultiQC. Disponível em: <https://multiqc.info/>. (12/04/2023)

MURPHY, Kenneth. Imuno Biologia de Janeway. In: MURPHY, Kenneth. *Imuno Biologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap.5 . p. 169-173. Denise C. Machado, Gaby Renard, Lucien Peroni gualdi.

MURPHY, Kenneth. Imuno Biologia de Janeway. In: MURPHY, Kenneth. *Imuno Biologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap. 8. p. 290-315. Denise C. Machado, Gaby Renard, Lucien Peroni gualdi.

MURPHY, Kenneth. Imuno Biologia de Janeway. In: MURPHY, Kenneth. *Imuno Biologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap. 9. p. 335-382. Denise C. Machado, Gaby Renard, Lucien Peroni gualdi.

NACHMAN, J. B. et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 110, n. 4, p. 1112–1115, 2007.

NARKHEDE, Mayur; MEHTA, Amitkumar; ANSELL, Stephen M.; GOYAL, Gaurav. CAR T-cell therapy in mature lymphoid malignancies: clinical opportunities and challenges. *Annals Of Translational Medicine*, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 1036-1036, jun. 2021. AME Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.21037/atm-20-5546>.

NCBI. GRCh37 - hg19 - Genome - Assembly - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/2758>. (12/04/2023).

NEELAPU, Sattva S.; LOCKE, Frederick L.; BARTLETT, Nancy L.; LEKAKIS, Lazaros J.; MIKLOS, David B.; JACOBSON, Caron A.; BRAUNSCHWEIG, Ira; OLUWOLE, Olalekan O.; SIDDIQI, Tanya; LIN, Yi. Axicabtagene Ciloleucl CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 377, n. 26, p. 2531-2544, 28 dez. 2017. Massachusetts Medical Society.

NIMBKAR, Pratiksha H.; BHATT, Vaibhav D.. A review on touch DNA collection, extraction, amplification, analysis and determination of phenotype. *Forensic Science International*, [S.L.], v. 336, p. 111352, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111352>.

NOGAI, H.; DÖRKEN, B.; LENZ, G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 14, p. 1803–1811, 2011.

OGURI, Shigeyuki; SAKAKIBARA, Tohru; MASE, Hideshi; SHIMIZU, Takayoshi; ISHIKAWA, Kiyoyasu; KIMURA, Kiyoji; SMYTH, Robert D.. *Clinical Pharmacokinetics*

of Carboplatin. The Journal Of Clinical Pharmacology, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 208-215, mar. 1988. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1552-4604.1988.tb03134.x>.

PANTHER: Protein Analysis Through Evolutionary Relationships [Banco de dados online]. Disponível em: <https://www.pantherdb.org/>. Acesso em: (10/07/2022).

R_K-GREGORY. True. British Journal Of Cancer, [S.L.], v. 82, n. 12, p. 1907-1913, 21 jan. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1054/bjoc.2000.1203>.

REACTOME. Reactome Pathway Database [Banco de dados online]. Disponível em: <https://reactome.org/>. Acesso em: (10/07/2022).

RECHKOBLIT, Olga; JOHNSON, Robert E.; BUKU, Angeliki; PRAKASH, Louise; PRAKASH, Satya; AGGARWAL, Aneel K.. Structural insights into mutagenicity of anticancer nucleoside analog cytarabine during replication by DNA polymerase η . Scientific Reports, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-30, 8 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52703-7>.

REINHOLD, Dirk; GUTTEK, Karina; REDDIG, Annika; VOSS, Linda; SCHUBERT, Claudia; KAHLFUSS, Sascha; GRÜNGREIFF, Kurt; SCHRAVEN, Burkhardt; REINHOLD, Annegret. Zinc Aspartate Induces IL-16 Secretion and Apoptosis in Human T Cells. Biomedicines, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 246, 1 mar. 2021. MDPI AG.

RIX, U. et al. A Target-Disease Network Model of Second-Generation BCR-ABL Inhibitor Action in Ph+ ALL. PLoS ONE, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2013.

SALZ, Lucia; SEITZ, Alexander; SCHÄFER, Daniel; FRANZEN, Julia; HOLZER, Tatjana; GARCIA-PRIETO, Carlos A.; BÜRGER, Iris; HARDT, Olaf;

ESTELLER, Manel; WAGNER, Wolfgang. Culture expansion of CAR T cells results in aberrant DNA methylation that is associated with adverse clinical outcome. Leukemia, [S.L.], v. 37, n. 9, p. 1868-1878, 14 jul. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-023-01966-1>.

SALZ, Lucia; SEITZ, Alexander; SCHÄFER, Daniel; FRANZEN, Julia; HOLZER, Tatjana; GARCIA-PRIETO, Carlos A.; BÜRGER, Iris; HARDT, Olaf; ESTELLER, Manel; WAGNER, Wolfgang. Culture expansion of CAR T cells results in aberrant DNA methylation that is associated with adverse clinical outcome. Leukemia, [S.L.], v. 37, n. 9, p. 1868-1878, 14 jul. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-023-01966-1>.

SAR, Daniel García; MONTES-BAYÓN, Maria; ORTIZ, Leticia Aguado; BLANCO-GONZÁLEZ, Elisa; SIERRA, L. María; SANZ-MEDEL, Alfredo. In vivo detection of DNA adducts induced by cisplatin using capillary HPLC–ICP-MS and their correlation with genotoxic damage in *Drosophila melanogaster*. Analytical And Bioanalytical Chemistry, [S.L.], v. 390, n. 1, p. 37-44, 12 out. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1634-z>.

SCHULER, Bryce A.; NELSON, Erica T.; KOZIURA, Mary; COGAN, Joy D.; HAMID, Rizwan; PHILLIPS, John A.. Lessons learned: next-generation sequencing applied to undiagnosed genetic diseases. *Journal Of Clinical Investigation*, [S.L.], v. 132, n. 7, p. 1-9, 1 abr. 2022. American Society for Clinical Investigation.

SHEYKHHASAN, Mohsen; MANOOCHERHI, Hamed; DAMA, Paola. Use of CAR T-cell for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment: a review study. *Cancer Gene Therapy*, [S.L.], v. 29, n. 8-9, p. 1080-1096, 5 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41417-021-00418-1>.

SPENCER, Damian M.s.; BILARDI, Rebecca A.; KOCH, Tad H.; POST, Glen C.; NAFIE, Jordan W.; KIMURA, Ken-Ichi; CUTTS, Suzanne M.; PHILLIPS, Don R.. DNA repair in response to anthracycline–DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, [S.L.], v. 638, n. 1-2, p. 110-121, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.09.005>.

SPRANGERS, Ben; COSMAI, Laura; PORTA, Camillo. Conventional chemotherapy. *Onco-Nephrology*, [S.L.], v. 21, n. 18, p. 127-140, 01 ago. 1982. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-54945-5.00025-4>.

TERESA, Benilde García-De; HERNÁNDEZ-GÓMEZ, Mariana; FRÍAS, Sara. DNA Damage as a Driver for Growth Delay: chromosome instability syndromes with intrauterine growth retardation. *Biomed Research International*, [S.L.], v. 2017, p. 1-14, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8193892>.

THOMAS, X.; ARCHIMBAUD, E.. Mitoxantrone in the treatment of acute myelogenous leukemia: a review. *Hematology And Cell Therapy*, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 163-174, ago. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00282-997-0163-8>.

TORGOVNICK, Alessandro; SCHUMACHER, Björn. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers In Genetics*, [S.L.], v. 6, p. 1-45, 23 abr. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2015.00157>.

VERMA, Vishesh; SHARMA, Shivam; GAUR, Kritika; KUMAR, Nitin. Role of vinca alkaloids and their derivatives in cancer therapy. *World Journal Of Advanced Research And Reviews*, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 794-800, 30 dez. 2022. GSC Online Press. <http://dx.doi.org/10.30574/wjarr.2022.16.3.1378>.

VILAS-ZORNOZA, A. et al. Frequent and simultaneous epigenetic inactivation of TP53 pathway genes in Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, 2011.

WATANABE, Norihiro; MO, Feiyan; MCKENNA, Mary Kathryn. Impact of Manufacturing Procedures on CAR T Cell Functionality. *Frontiers In Immunology*, [S.L.], v. 13, p. 20-140, 13 abr. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.876339>.

WOODS, Derek; TURCHI, John J.. Chemotherapy induced DNA damage response. *Cancer Biology & Therapy*, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 379-389, maio 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.23761>.

ZANDEN, Sabina Y. van Der; QIAO, Xiaohang; NEEFJES, Jacques. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *The Febs Journal*, [S.L.], v. 288, n. 21, p. 6095-6111, 19 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.15583>.

ZIO, Daniela de; CIANFANELLI, Valentina; CECCONI, Francesco. New Insights into the Link Between DNA Damage and Apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 559-571, 20 ago. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4938>.