



## ACT. EXPRESSÃO DE CD3 $\zeta$ EM CÉLULAS NK-92 PARA INDUZIR MAIOR ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS B NEOPLÁSICAS

Marina de Andrade Biason<sup>1</sup>, Isabele Held Lemos<sup>1</sup>, Michele Procópio Machado<sup>1</sup>, Thiago Aparecido da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara, UNESP

**Introdução:** O câncer é uma doença multifatorial, complexa e heterogênea, caracterizada pela proliferação celular descontrolada e prolongamento da sobrevivência celular, permitindo maior capacidade de evadir da resposta imunitária contra tumores e migrar para diferentes tecidos. As neoplasias hematológicas, destacam pelas alterações das células precursoras ou maduras que compõem o sangue, e nesse caso as células da imunidade podem se tornar malignas. Em especial, o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), tipo de linfoma não-Hodgkin, e a leucemia linfoblástica aguda (LLA) representam desafios clínicos importantes, sobretudo nos casos refratários ou de recidivas. Nesse cenário, a terapia celular, associada com Receptores Antigênicos Quiméricos (CAR), demonstram avanços terapêuticos significativos, sendo uma tecnologia de modificar células T para reconhecer e eliminar células tumorais de forma específica. Os efeitos adversos oriundos das CAR-T, como citotoxicidades causadas por cytokine storm, direcionam as células *Natural Killer* (NK), como a linhagem NK-92, como alternativa na terapia celular através de NK-CAR, devido aos reduzidos efeitos adversos. A inserção do CD3 $\zeta$ , domínio essencial para ativação de células T, em células NK-92 tem potencial para otimizar sua ativação e ampliar a eficácia antitumoral, associada à expressão de CAR, mostrando-se uma estratégia promissora no tratamento de neoplasias hematológicas. **Metodologia:** A sequência codificadora de CD3 $\zeta$  foi subclonada em um vetor lentiviral, utilizando clonagem convencional, e a produção desse vetor lentiviral para a expressão de CD3 $\zeta$  foi validada por enzimas de restrição e visualização em eletroforese em gel de agarose. Após essa confirmação, o plasmídeo carregando a sequência codificadora de CD3 $\zeta$  foi purificado em maior quantidade para a transfecção de células HEK-293T, através de lipofectamina para produção de partículas lentivirais para a expressão de CD3 $\zeta$ . Em seguida, a transdução de células NK-92 com partículas lentivirais foi efetuada, com o objetivo de gerar células estáveis para a expressão de CD3 $\zeta$ . Por fim, pretende-se analisar a atividade citotóxica dessas células modificadas frente às células-alvo. **Resultados e Discussão:** A clonagem do gene codificador de CD3 $\zeta$  foi realizada em vetor lentiviral. Ademais, a inserção da sequência de CD3 $\zeta$  no vetor lentiviral foi confirmada por análise de PCR e digestão com enzimas de restrição com posterior visualização dos fragmentos através de gel de agarose. As partículas lentivirais, codificando CD3 $\zeta$  foram produzidas após transfecção de células HEK-293T, obtendo o título de  $1,335 \times 10^8$  TU/mL. A transdução das células NK-92 resultou em uma taxa de 17,4% de células CD3 $\zeta$ -positivas detectadas por citometria de fluxo no terceiro dia pós-transdução. Uma população de células NK-92 expressando CD3 $\zeta$  foi enriquecida por meio de *cell sorting*, e a população de células NK-92 positivas para CD3 $\zeta$  expandiram e mantiveram a expressão de CD3 $\zeta$ . **Conclusão:** A transdução de células NK-92 para expressar CD3 $\zeta$  de forma estável, demonstrou viável e plausível na manutenção da população purificada e passível de modificação com CAR, viabilizando os ensaios de citotoxicidade e de ativação celular frente as células B neoplásicas.

**Palavras-chave:** CAR; Células NK-92; CD3 $\zeta$ .