



However, NK transgene expression level is a major technical obstacle to the development of NK cell immunotherapy. Promoters, present in vectors, are responsible for maintaining the expression of CAR in host cells. Furthermore, promoters may differ in their ability to produce lentiviral particles and in their transduction efficiency. The present study aimed to evaluate whether different internal promoters result in a different percentage of transduced cells and transgene expression level in NK cells and thus to be able to choose an ideal promoter to drive the expression of CAR.CD19 increasing the antitumor potency of NK cells. **Methods:** Lentiviral particles with EF1a and SFFV promoters driving GFP gene expression or CAR.CD19 were produced, and the virus titer was measured by flow cytometry. Lentiviral particles were used for transduction of NK-92, NK from peripheral blood and NK from cord blood. CAR positive cells were detected by flow cytometry using anti F(ab)2 antibody. CAR-NK cell cytotoxic potential and specificity were assessed using established human Raji and NALM-6 lymphoblastoid cell lines (CD19+) as targets, which express varying antigen levels and MDA-MB-453 (CD19-) cells were used as negative control. **Results and discussion:** First, we explored the potential EF1a and SFFV promoters to drive GFP gene expression. SFFV promoter produced high lentiviral titers and achieved the best transduction efficacy in NK cells. The major difference between the promoters was the ability of SFFV to maintain longer and more robust GFP expression in NK cells. Therefore, we chose this promoter to drive CAR.CD19 expression and interleukin (IL)-15 co-expression in NK cells. There was a transduction efficiency of 13% (+/- 13.7) for NK-92 cells, assessed 48h after transduction. NK cells from Peripheral Blood (NK-PB) and Cord Blood (NK-CB) were also transduced with an efficiency of 27% and 49%, respectively. After 3 weeks in culture, the percentage of CAR-NK cells progressively decreased in primary cells. Cell growth of transduced cells from both sources was not statistically different; despite wild type NK-CB cells had a higher fold-change expansion than wild type NK-PB. CAR-NK-92 cells modified with SFFV were enriched with magnetic beads to 98% of NK cells positive for CAR expression and showed efficient and stable transgene expression during *ex vivo* expansion. The enriched CAR.CD19-NK-92 cells showed a higher killing potential against Raji CD19+ cells, compared with non-transduced NK-92 cells. Further, we evaluated the CAR-NK primary cells *in vitro* cytotoxic potential. CAR-NKs both from PB and CB had a higher killing potential against Raji and NALM-6 CD19+ cell lines than non-transduced NK cells. **Conclusions:** Taken together, these results indicate that the developed vector is functional and able to transduce NK cells from different sources, enhancing their antitumoral activity against tumoral CD19+ cells. Our results highlight that the promoter choice is essential to generate CAR-NK cells suitable for therapeutic applications. **Funding:** Supported by FAPESP 2019/25309-0, 2013/08135-2, 2008/578773; CNPq 573754-2008-0; Capes (88887.140966/2017-00 and 88881.199630/2018-01).

RELAÇÃO ENTRE CÉLULAS CD34+ E UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS PARA ANÁLISE DA QUALIDADE EM PRODUTOS DE AFÉRESE CRIOPRESERVADOS PARA TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGO

SMF Alencar^{a,b}, TSD Santos^{a,b}, GC Silva^{a,b}, TL Pereira^{a,b}, TS Lima^{a,b}, R Shaffel^{a,b}, TL Pereira^{a,b}, ASC Cypriano^{a,b}, A Maiolino^{a,b}, HDS Dutra^{a,b}

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

A quantificação de células progenitoras hematopoéticas pelo fenótipo (CD34+/CD45+) ou por cultivo celular (Ensaio Clonogênico – que mede as Unidades de Formação de Colônias - UFC) é usada para determinar a qualidade de produtos de leucaférese aplicados ao transplante de medula óssea. A razão entre os progenitores CD34+ e unidades formadoras de colônia de granulócitos e macrófagos – UFC-GM apresentam grandes variações, mas pode expressar os prejuízos decorrentes da criopreservação destas células. Nosso objetivo foi avaliar a perda de qualidade destes produtos pós criopreservação tendo como referências a relação entre CD34 e UFC pré criopreservação. **Material e métodos:** Esta análise compreendeu 177 amostras pré-criopreservação e 169 amostras pós-criopreservação. 36 amostras pós-criopreservação foram submetidas a novo cultivo para confirmação de redução da perda de capacidade proliferativa. Para avaliar a quantidade de progenitores por citometria de fluxo, as amostras foram incubadas com anticorpos anti-CD45 e anti-CD34 e analisadas conforme método indicado pela ISHAGE/ISCT. O ensaio clonogênico foi realizado pela cultura de células nucleadas do produto de leucaférese, em meio de cultura semi-sólido contendo ágar, soro fetal bovino e meio condicionado de linhagem 5637, como fonte de fatores de crescimento. As placas foram incubadas por 12-14 dias. Após o término da incubação, as amostras foram fixadas com vapor de formol até a data de contagem das colônias. A relação entre células CD34+ e UFC foi determinada pelo quociente entre o número de células CD34+ e o número de UFC no produto da aférese. O método de criopreservação foi automatizado e os produtos foram mantidos em nitrogênio líquido. A análise estatística dos valores foi feita pelo teste de Mann-Whitney e t-paired. **Resultados:** A mediana da relação CD34/UFC em amostras pré criopreservação foi de 36 (3-2143) e em amostras pós criopreservação foi de 102 (2-19171). A perda de capacidade proliferativa pós-criopreservação foi significativa $p < 0,0001$ (Main-Whitney U). Amostras que pós criopreservação apresentavam perdas fora dos níveis de tolerância foram repetidas e apresentaram resultados semelhantes (R CD34/CFU com mediana 425 e pós repetição 473). **Discussão:** A perda de capacidade proliferativa pós congelamento é muito variável entre pacientes, é necessário identificar os fatores de risco associados para prever coleta satisfatória aos pacientes com

maior risco de perda da qualidade do enxerto pós criopreservação, um estudo de características clínicas dos pacientes ou de propriedades citológicas nestes produtos poderá auxiliar na interpretação destes resultados. **Conclusão:** O ensaio clonogênico em produtos criopreservados revela a perda de capacidade proliferativa de progenitores pós-descongelamento e pode agregar valores de qualidade juntamente com a viabilidade celular. Observamos que uma taxa de cerca de 25% de amostras apresentam perda significativa da capacidade hematopoética in vitro. Os resultados foram confirmados por repetição do ensaio clonogênico, que apresentou reprodutibilidade.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.456>

REMISSÃO DE LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA RECAÍDA APÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA DEVIDO DOENÇA DO ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO- RELATO DE CASO

MC Guedes, VAM Funke, AVCDS Gasparine, TDS Baldanzi, LMC Borges, R Galli, LF Soares

Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil

Introdução: a doença do enxerto versus hospedeiro (DECH) aguda ou crônica, é uma das principais complicações após o transplante de medula óssea ocorrendo entre 40-50% dos pacientes. Apesar de representar um fator de morbimortalidade relacionado ao transplante, sabe-se também, que o DECH é um fator importante na menor incidência de recaída da leucemia após o transplante de medula óssea (TMO) devido ao efeito enxerto versus leucemia (GVL). O relato a seguir ilustra o caso de um paciente que teve recaída da leucemia mielóide aguda (LMA) 6 meses após um TMO alogênico e que após o desenvolvimento de DECH apresentou remissão completa da doença. Relato de caso: A.C.S, 62 anos, diagnóstico de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) secundária a síndrome mielodisplásica durante investigação de pancitopenia. O paciente foi refratário a indução e duas consolidações do protocolo 7+3, sendo realizado um ciclo de resgate com FLAG IDA (fludarabina, citarabina e idarubicina) mantendo doença residual mínima positiva pré TMO aparentado 100% compatível. No seguimento pós transplante apresentava quimerismo 100% do doador no D+30 e 99% no D+100. Apresentou DECH aguda grau IV com manifestação em pele e intestino com diarreia refratária e desnutrição, inicialmente tratado com Metilprednisolona sendo corticorefratário. Realizou 3 ciclos de Basiliximabe com controle de DECH. 6 meses após o transplante paciente voltou a apresentar pancitopenia, hemograma com Hb 7,6 Leucócitos 2330 Neutrófilos 357 Plaquetas 74.000. Realizado avaliação de medula óssea com imunofenotipagem evidenciando 29,1% de blastos de linhagem mielóide com fenótipo semelhante ao diagnóstico. Paciente avaliado como recaída de LMA após TMO alogênico, sendo suspenso imunossupressão, solicitado Azacitidina e encaminhado para cuidados paliativos. Permaneceu 3 meses em regime de transfusões sanguíneas e acompanhamento ambulatorial, 4 meses após paciente voltou a apresentar lesões cutâneas

escleróticas, mucosite com líquen em mucosa oral, diarreia e alterações de exames laboratoriais em enzimas hepáticas (TGO 193 TGP 287 BT 1,7 BD 1,2) reiniciado ciclosporina e prednisona. Porém, concomitante ao aparecimento do DECH paciente reduziu necessidades transfusionais com normalização do hemograma um mês após o quadro, Hb11,1 VG 32 Leucócitos 8130 Neutrófilos 4715 Plaquetas 352.000. Realizado nova avaliação de medula óssea que demonstrou remissão completa da doença. **Discussão:** Esse caso ilustra um paciente que apresentou uma complicação comum do transplante de medula óssea com DECH crônico, que neste caso, levou ao controle da doença de base, uma LMA secundária a síndrome mielodisplásica recaída após o TMO. Estudos mostram que principalmente o DECH crônico melhora a sobrevida livre de leucemia pós TMO, porém, também é associado a uma maior mortalidade, principalmente nos casos de DECH grau maior do que 2. O caso evidencia a dificuldade encontrada no controle da DECH para manter qualidade de vida e menor mortalidade relacionada o transplante mas a sua importância no efeito GVL.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.457>

REVERSÃO DE QUIMERISMO MISTO COM INFUSÃO DE LEUCÓCITOS DE DOADOR EM CRIANÇAS SUBMETIDAS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH) HAPLOIDÊNTICO

RV Gouveia^{a,b}, VC Ginani^{a,b}, G Zamperlini^{a,b}, MGAD Matos^{a,b}, CN Monteiro^{a,b}, LDS Domingues^{a,b}, CMCZ Oliveira^{a,b}, PAM Soriano^{a,b}, JF Marques^b, MV Pupim^{a,b}, A Seber^{a,b}, FVB Santos^b, PM Paiva^b, CF Andrade^b, A Seber^{a,b}

^a Equipe Onco-TMO em Pediatria, São Paulo, SP, Brasil

^b Hospital Samaritano de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A infusão de leucócitos do doador (DLI) pode ser uma opção terapêutica para pacientes com recidiva da doença de base após TCTH. A dose celular varia com a doença de base, tipo de doador e presença de DECH. A ação dos linfócitos do doador contra a hematopoiese do receptor para reverter quimerismo misto após TCTH não está bem estabelecido. **Objetivo:** Avaliar eficácia e segurança de DLIs realizadas em crianças com quimerismo misto. **Métodos:** Descrição do uso de DLI em três pacientes pediátricos com quimerismo misto após TCTH haploidêntico para evitar a rejeição e, no paciente com leucemia, recidiva da doença. **Resultados:** Três pacientes receberam DLI para tratamento de quimerismo misto: 1º paciente, 15 anos, TCTH haploidêntico, células-tronco periféricas da mãe em 2014 para tratamento de LLA Ph + 3ª remissão. Recebeu fludarabina-TBI-1200cGy, ciclofosfamida-pós, CsA-MMF. DECH aguda pele e intestino resolveram com corticoide. Nove meses pós-TCTH apresentou recidiva molecular tratada com DLI a cada 4 semanas 1 x 10⁴CD3/kg, 1 x 10⁵CD3/kg e 1 x 10⁶CD3/kg. Apesar das DLIs evoluiu com

