

GENERATION OF CD34+ DERIVED HUMAN MACROPHAGE EXPRESSING CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR CANCER TREATMENT

Ian-Costa ^a, Livia-Furquin ^a, Viviane-Jennifer ^a,
Théo-Gremen ^b, Samuel-Campanelli ^b,
Rafael-Almeida ^a, Vanderson-Rocha ^a,
Rodrigo-Nalio ^c

^a Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil

^b Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, São Paulo, SP, Brazil

Objective: T lymphocytes expressing Chimeric Antigen Receptor (CAR) has proven to be an auspicious strategy in treatment of hematological malignancies, but with low efficacy in solid tumors due to their complex microenvironment. From this perspective, macrophages become promising cells for CAR insertion (CAR^{Mac}) due to their ability to infiltrate the dense tumor matrix, promote phagocytosis and antigen presentation and to secrete pro-inflammatory cytokines. However, sources for obtaining macrophages are limited due to their low proliferative capacity. Knowing that umbilical cord blood CD34⁺ cells are potential progenitors for macrophages, our main aim here is to generate off-the-shelf CAR^{Mac} from umbilical cord blood CD34⁺ cells to treat solid tumors. **Methods:** We use cryopreserved umbilical cord blood CD34⁺ cells to first expand in vitro and to insert a reporter protein (GFP) using the piggyBAC transposon system (pB) prior the differentiation into CD34⁺ derived human macrophages (Mac^{CD34}). Subsequently, Mac^{CD34} were generated using distinct protocols combining the use of growth factors and cytokines: Protocol 1 = SCF, GM-CSF, TNF- α + M-CSF; Protocol 2 = GM-CSF, M-CSF, IL-3 + M-CSF in vitro. Then, Mac^{CD34} were tested morphology, phenotype characterization and phagocytosis capabilities. **Results:** We obtained around 12.9% of GFP-expressing cells within 24 hours after electroporation with a viability of 63.4%. Subsequently for Mac^{CD34} phenotyping using flow cytometry, in protocol 1 about 85% and 53.9% of CD14⁺CD64⁺ Mac^{CD34} were obtained using two distinct culture media (RPMI 1640 (RP) and StemSpan SFEN II (SS)), respectively. Those cells presented CD34^{neg} CD1c^{neg} HLA-DR^{high} CD163^{low} CD16⁺CD86^{low} and showed a typical morphology of macrophage when compared to monocytes derived macrophages (Mac^{Mono}). In protocol 2 about 75% and 36.4% of CD14⁺CD64⁺ Mac^{CD34} were obtained using RP and SS, respectively. Those cells presented CD34^{neg} CD1c^{low} HLA-DR^{high} CD163^{neg} CD16^{high} CD86⁺. During differentiation, cells showed a considerable expansion fold, evidenced by the dilution of Cell Trace Violet dye. In addition, the polarization of CD14⁺CD34^{neg} cells with M-CSF and IL-4 induced high expression of CD64, HLA-DR, CD86 and CD1c, showing a mixed morphologic Mac^{Mono}/DC phenotype. For functional assays, Mac^{CD34} from protocol 2 showed a reduced percentage of phagocytosis of SKBR3 tumor cells and a higher percentage for Nalm6 tumor cell phagocytosis, when compared to blood monocytes and Mac^{Mono}.

Beside that, Mac^{CD34} can efficiently phagocytose pHrodoTM Zymosan microbeads and produce TNF- α (RP = 33.2%; SS = 24.0%) and IL-1 β (RP = 21.9%; SS = 10.4%) in response to LPS activation. **Discussion and conclusion:** Our data indicate that pB is not an effective protocol for insertion of CAR molecules in CD34⁺ cells. In addition, differentiated Mac^{CD34} showed phenotypic and functional similarities with classical macrophages differentiated from blood monocytes. Our ongoing steps are A) the generation of CAR-expressing CD34⁺ cells using lentiviral vectors and B) the differentiation into CAR^{Mac} for their functional characterization.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.1692>

IMPACTO DA CRIOPRESERVAÇÃO E DO DESCONGELAMENTO NA QUALIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

MH Angeli, MDS Lobo, GD Salton, JM Furlan,
AB Araújo, LM Rohsig

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil

Introdução: O transplante autólogo de Células-Tronco Hematopoéticas (CTH) faz parte da estratégia de tratamento da maior parte dos pacientes com mieloma múltiplo. A infusão das CTH pode ser realizada dias ou meses após a coleta e, nesta situação, faz-se necessária a criopreservação das células a fim de manter sua viabilidade. Durante a criopreservação e o descongelamento, a morte celular pode estar associada ao impacto da variação de temperatura durante todo o processo e ao armazenamento a longo prazo em baixas temperaturas. **Objetivo:** Avaliar o impacto da criopreservação e do descongelamento na qualidade das CTH criopreservadas de pacientes com mieloma múltiplo. **Metodologia:** Foram analisadas 69 coletas de CTH por aférese de pacientes com mieloma múltiplo realizadas entre 2020 a 2024, criopreservadas em solução contendo hidroxietilamido 6%, albumina humana 3% e dimetilsulfóxido 5%, armazenadas em freezer mecânico a -80°C e infundidas entre 2021 e 2024. Os parâmetros avaliados comparando os dados pré e pós criopreservação foram: tempo entre a data da coleta e a data da infusão das CTH, recuperação de células nucleadas totais, recuperação de células CD34⁺ viáveis e perda de viabilidade celular por 7AAD. As quantificações celulares foram realizadas em contador hematológico e citômetro de fluxo. O descongelamento foi realizado a 37°C em banho-maria. Os critérios utilizados para considerar as CTH com qualidade adequada foram: média da recuperação de Células Nucleadas Totais (CNT) $\geq 70\%$, média da recuperação de células CD34⁺ $\geq 60\%$, média da perda de viabilidade celular por 7AAD $\leq 30\%$. O tempo de armazenamento (em dias) das CTH foi apresentado como média (mínimo-máximo) e os demais resultados como média $\pm$ desvio padrão. **Resultados:** O tempo médio de armazenamento das CTH foi de 121 dias (5–331). A comparação entre os dados pré e pós-criopreservação resultou nos seguintes valores médios: recuperação de CNT: $94,05 \pm 8,8\%$; recuperação de células CD34⁺: $69,3 \pm 25,1\%$ e perda de

viabilidade celular por 7AAD: $16,9 \pm 8,8\%$. **Discussão:** A perda de células e de viabilidade são parâmetros importantes a serem considerados quando é realizado o processo de criopreservação, e vários fatores podem influenciá-los, como a centrifugação, as condições e o tempo de armazenamento e o descongelamento do produto. A quantificação de células CD34+ é o principal indicador da qualidade das CTH para transplante; dessa forma, torna-se muito importante manter a quantidade e a viabilidade dessas células durante a criopreservação para garantir a enxertia. Os resultados encontrados demonstram que a contagem de CNT é pouco afetada pela criopreservação e pelo descongelamento, enquanto a quantificação de células CD34+ sofre maior impacto com esse processo, assim como a viabilidade celular por 7AAD. Apesar de haver perda de células e de viabilidade, CTH criopreservadas a -80°C apresentam qualidade adequada para o transplante, segundo os critérios estabelecidos. **Conclusão:** A criopreservação e o descongelamento das CTH coletadas por aférese de pacientes com mieloma múltiplo, considerando os parâmetros avaliados, não afeta de modo significativo a qualidade celular, permitindo sua utilização no transplante de CTH autólogo, mesmo após períodos prolongados de armazenamento.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.1693>

CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PRODUTO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS: ESTUDO RETROSPECTIVO EM CENTRO ÚNICO

FS Fernandes, TR Fernandes, SR Caruso, DM Toro, E Silva, MD Orellana, GC De-Santis

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Introdução: As principais fontes de Células Progenitoras Hematopoéticas (CPH) para transplante são a Medula Óssea (CPH-MO) e o Sangue Periférico mobilizado (CPH-SP). A coleta de CPH-MO é realizada por procedimento aberto, enquanto a coleta de CPH-SP é feita por aférese, em sistema fechado. A coleta e manipulação dos produtos de CPH pode ocasionar a sua contaminação, apesar da adoção de medidas antissépticas. Outra possibilidade de contaminação é a coleta de CPH-SP de paciente ou de doador com bacteremia. É de presumir que a infusão de produto contaminado possa provocar a sepsé no receptor. **Objetivos:** Comparar a taxa de contaminação microbiológica dos produtos de CPH-MO e CPH-SP para transplante, entre janeiro/2003 e junho/2024, processadas no Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto. Comparar a taxa de contaminação entre os produtos de CPH-SP coletados de pacientes (uso autólogo) e de doadores saudáveis (uso alogênico). Descrever o tipo (coloração Gram) e a identidade dos microrganismos encontrados. **Métodos:** Trata-se de um estudo transversal e retrospectivo. Foram analisados 1.999 produtos de CPH: 266 de CPH-MO (uso alogênico) e 1.733 de CPH-SP (1.415 para uso autólogo e 318 para

uso alogênico). Os produtos foram avaliados para a presença de contaminação por bactérias aeróbias, anaeróbias e fungos (BacAlert® e BACTEC®). Nos casos de contaminação, foi feita a identificação dos microrganismos. As variáveis foram comparadas com a aplicação do teste de qui-quadrado ou do teste exato de Fisher. Até onde sabemos, este é o estudo com a maior casuística da literatura. **Resultados:** Foram identificadas 42 bolsas (2,1%) com resultados microbiológicos positivos, sendo 30 bolsas (11,3%) provenientes de MO e 12 bolsas (0,69%) de SP. A taxa de contaminação foi significativamente maior nos produtos de CPH-MO em comparação com os de CPH-SP, com risco relativo (RR) de 5,92 (95% IC: 4,56–7,22) ($p < 0,0001$). Nos produtos de CPH-MO contaminados houve a prevalência de bactérias gram-positivas (90,32%), principalmente de *Staphylococcus epidermidis* (32,14%), enquanto nos produtos de CPH-SP (todas para uso autólogo) houve a predominância de bactérias gram-negativas (66,66%), tais como *Escherichia coli* (16,67%) e *Salmonella sp.* (16,67%). Por fim, o risco de contaminação de CPH-SP coletado de pacientes (uso autólogo) foi ligeiramente maior, mas sem significância estatística, que o observado nos produtos de CPH-SP de doador saudável (uso alogênico): RR = 1,23 (95% IC: 0,93–2,5) ($p = 0,14$). **Discussão:** A medula óssea oferece maior risco de contaminação por microrganismos que o sangue periférico. A contaminação da MO e do SP caracteriza-se pelo predomínio de bactérias Gram-positivas na primeira (microbiota da pele) e Gram-negativas no segundo (supostamente por bacteremia). Não se verificou contaminação por fungos em nenhum dos produtos de CPH. **Conclusão:** A contaminação de produtos de CPH é pouco frequente e a MO apresenta taxas superiores à do SP. A contaminação da MO é predominante por bactéria Gram-positiva, enquanto no SP predominam as Gram-negativas. Os dados apresentados estão de acordo com os encontrados na literatura.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.1694>

REATIVAÇÃO DE CITOMEGALOVÍRUS PÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS EM PEDIATRIA: COORTE COMPARATIVA COM ADULTOS QUANTO INCIDÊNCIA, CINÉTICA VIRAL E FATORES DE RISCO

BL Gaio^a, SDM Ribeiro^a, MCR Moreira^{a,b}, BLC Ramos^a, DG Souza^a, A Maiolino^a, M Garnica^{a,b}

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

^b Complexo Hospitalar de Niterói, Niterói, RJ, Brasil

Introdução: Citomegalovírus (CMV) é um evento frequente no transplante alogênico de células hematopoéticas (Alo-TCH), cuja primo infecção ocorre, em geral, no período da infância. A imunossupressão aumenta o risco de reativação e está associada a alta morbidade e mortalidade nessa população. Esse estudo tem por objetivo avaliar se a reativação de CMV