

terminando as quantificações celulares, bem como demonstra com maior precisão alterações internas nas células. Há ainda contadores que conseguem realizar a contagem de eritroblastos e sua subtração do valor de leucócitos, possibilitando realizar uma contagem real de glóbulos brancos na amostra. Os contadores que utilizam essa metodologia são Abbott CellDyn 4000, Sysmex XE2100 e o BeckmanCoulter LH750, dispensando de certa forma a contagem manual de eritroblastos em lâmina. Porém, existem algumas alterações em que os equipamentos hematológicos não conseguem identificar, muitas delas de natureza morfológica, como poiquilocitose, policromatofilia, roluax eritrocitário, granulações tóxicas, plasmocitose e Hairy Cells. Segundo Failace & Pranke, devido ao aumento da sensibilidade nos citômetros, o número de *flags* falso-positivos também pode ser consideravelmente aumentado, elevando o custo dos laboratórios em relação à necessidade de mão de obra para a análise microscópica, sendo necessário que o laboratório clínico conheça os equipamentos nos quais se trabalha para diferenciar os alertas não previstos em sua grade de *flags* e que necessitam obrigatoriamente de revisão de lâmina. Portanto, as análises obtidas no decorrer do trabalho confirmam que a sensibilidade e a confiabilidade dos equipamentos de automação são mesmo muito importantes nos laboratórios de hematologia. No entanto, a microscopia ainda tem importância fundamental para a identificação de várias anormalidades hematopoéticas associada a dados obtidos dos exames de hemograma que são muito importantes para um diagnóstico preciso das alterações que acometem o sangue e a medula óssea.

1233. USO DE MEDICAMENTOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE POR PORTADORES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA NA FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS

Menezes AD^a, Fraiji NA^a, Paula EV^b

^a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

^b Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Objetivo: Analisar as condições do uso de medicamentos inibidores de tirosina quinase (ITQs) por portadores de leucemia mieloide crônica (LMC) atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM). **Material e métodos:** O estudo foi observacional, transversal, no ambulatório da FHEMOAM, com pacientes com mais de três meses de uso de um dos ITQs (imatinibe, dasatinibe ou nilotinibe) por meio de entrevistas com questionários realizadas no período dezembro de 2015 a abril de 2016. **Resultados:** Foram entrevistados 63 pacientes, com uma média de idade de 51,5 anos, dos quais 60% eram homens e 52,4% com uma renda entre dois a três salários mínimos. Em relação ao conhecimento sobre aspectos relacionados ao uso do ITQ, 95,2% tomavam no momento correto, 93,7% não usavam concomitantemente outro medicamento, 63,5% guardavam em local adequado. Sobre a finalidade de tomar o ITQ, 90,5% relataram saber, enquanto 83% sabiam o que aconteceria se parassem de tomar; 60% não sabiam por quanto tempo tomariam e 73% acreditavam na possibilidade de parar de tomar o medicamento no futuro. Cerca de 97% dos pacientes receberam orientação prévia do médico sobre o uso, e apenas 1% recebeu orientação do profissional farmacêutico. **Discussão:** A compreensão do uso do medicamento pode ser verificada quando se avaliam os conhecimentos do paciente sobre o nome, a duração e a finalidade de seu tratamento. Além disso, observa-se que a compreensão da terapia medicamentosa também está relacionada à orientação recebida pelo paciente no momento da prescrição, da dispensação ou mesmo em reuniões. O entendimento do uso do ITQ é fundamental para a adesão ao tratamento. **Conclusão:** Os pacientes tinham boa compreensão sobre sua doença e tratamento medicamentoso.

1234. PERFIL HEMATOLÓGICO EM PACIENTES CARDIOPATAS ANTES DA CIRURGIA CARDÍACA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO FRANCISCA MENDES

Brito RO^a, Brito VM^b, Souza PE^a, Terrazas MB^c, Neto JPM^c

^a Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

^b Universidade Nilton Lins, Manaus, AM, Brasil

^c Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

O conhecimento dos índices hematimétricos no paciente submetido a cirurgia cardíaca é de extrema importância. Nosso trabalho avaliou os

dados hematológicos em pacientes que iriam se submeter a procedimento cirúrgico cardíaco no Hospital Universitário Francisca Mendes de Manaus (AM). Os dados hematológicos foram obtidos em analisador hematológico Advia 120, e a análise estatística foi realizada com o software SPSS versão 20. Um total de 100 pacientes foi incluído no estudo, dos quais 60 (60%) eram do masculino, com 43 (71,67%) dos homens e 22 (55%) das mulheres apresentando anemia pré-operatória, totalizando 75 pacientes. Destes, 43 (57,33%) receberam média de 12 bolsas de componentes sanguíneos (hemácias, plaquetas, plasma fresco congelado e crioprecipitado) durante a cirurgia. A média de leucócitos foi de 8.870 ($\pm 3,2$), hemácias de 4,20 milhões ($\pm 0,9$), hemoglobina 11,75 g/dL ($\pm 2,50$), hematócrito 36,31% ($\pm 7,79$), neutrófilos 65,97% ($\pm 15,10$), linfócitos 22,74% ($\pm 12,46$), monócitos 6,10% ($\pm 3,57$), eosinófilo ($\pm 3,75$), basófilo 0,51% ($\pm 0,60$), ureia 45,63 mg/dL ($\pm 32,46$) e creatinina 4,84 mg/dL ($\pm 11,12$). Nossos resultados demonstram que a presença de anemia leve a moderada em pacientes que irão se submeter à cirurgia cardíaca, além do próprio risco cirúrgico, pode ainda ter influência negativa em sua recuperação, além do elevado risco de complicações pós-operatórias e tempo maior de internação hospitalar. Esses dados reforçam o que já se demonstra na literatura sobre a elevada comorbidade nesse tipo de cirurgia, o que reforça a necessidade de se atentar não só a estudo de coagulação, mas também ao estado hematimétrico e bioquímico nesses pacientes.

TERAPIA CELULAR

TERAPIA CELULAR

1235. EFFICIENT PRODUCTION OF DENDRITIC CELL VACCINES FOR THE TREATMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS AND COMPARISON OF TWO DIFFERENT CELL SEPARATION METHODS

Benites BD^a, Duarte ASS^a, Basso AJ^a, Longhini ALF^a, Honma HN^b, Gilli SCO^a, Saad STO^a

^a Hemocentro de Campinas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Medicina Interna, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Aims: Dendritic cell (DC) vaccines have demonstrated good efficacy in preventing relapse in Acute Myeloid Leukemia (AML) patients (Van Tendeloo et al., PNAS, 107[31], 2010). Nevertheless, this therapy presents high costs precluding the use in low income settings. The aim of this study was to implement the production of vaccines containing DCs electroporated with WT1 (Wilms' tumor 1) mRNA for maintenance treatment of patients with AML followed at the University of Campinas and compare the cost-effectiveness of two methods for cell separation. **Methods:** Patients with AML in complete remission after conventional treatment underwent leukapheresis and the collected bag was submitted to either automatic separation of CD14+ cells using magnetic beads (CliniMacs® system) or monocytes purification by density gradient centrifugation. Monocytes were differentiated into mature DCs in specific medium with cytokines. On the last day of culture, DCs were electroporated with WT-1 mRNA, produced from the plasmid kindly provided by Prof. Evelien Smits (University of Antwerp, Belgium). The final product was subjected to quality control procedures and vaccination schedule consisted of four doses of 1×10^7 cells each, administered intradermally, biweekly, and monitored through blood counts and liver and renal function tests. Blood samples were collected for assessment of WT1 levels by RT-PCR and lymphoproliferation assays (to be monitored during follow-up). **Results:** DC vaccines were produced for four patients, with median age of 41 years (24–57), FAB classification: three M4 and one M1, intermediate risk according to WHO criteria, and high expression of WT1 at diagnosis. The following quality criteria were achieved throughout the production: > 90% viability (< 10% of PI-labeled cells), > 80% positivity for maturation markers (CD83, CD86, HLA-DR), negative bacterial cultures, WT1 positive immunocytochemistry, and documented cell migration on transwell plates with CCL19/CCL21. Separation of

monocytes by automated system yielded a total of 15 doses containing 1×10^7 viable DCs with low lymphocyte contamination (< 5%). In the case of manual separation by centrifugal gradient, 13 doses were produced starting from the same number of total leukocytes. Despite higher lymphocyte contamination (approximately 10%), the same degree of viability and maturation was obtained, guaranteeing the quality of the product with a reduced estimated cost of approximately 1,000 BRL per dose. There were no toxicities reported by patients or observed on clinical examination or laboratory tests. The mean time between completion of consolidation therapy and apheresis was 188 (157–253) days and between diagnosis and initiation of the vaccination schedule was 12 (7–15) months. WT1 levels in peripheral blood normalized after consolidation therapy and remained stable after vaccination. As of July 2017, all four patients are in continuous complete remission, with a median follow-up of 74 (15–204) days since last dose. **Discussion:** We demonstrate the feasibility of producing DC vaccines using two different methods for monocytes separation, with implications in costs for developing countries. **Conclusion:** This study highlights the benefits of international collaborations that contribute to technology transfer improving the healthcare of Brazilian patients.

1236. THE EFFECTS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA DERIVED EXOSOMES UPON DENDRITIC CELL MEDIATED CYTOTOXICITY: IMPLICATIONS FOR IMMUNOTHERAPY

Benites BD^a, Duarte ASS^a, Longhini ALF^a, Santos I^a, Alvarez MC^a, Ribeiro LNM^b, Paula E^b, Saad STO^a

^a Hemocentro de Campinas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia de Tecidos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Aims: Exosomes are nanoparticles with important intercellular communication functions. Due to their internal content dependent on the cells of origin, they could be useful as antigenic pulse in the development of new forms of immunotherapy. The aim of this study was to evaluate the use of exosomes extracted from serum of patients with acute myeloid leukemia (AML) as an antigenic source for dendritic cell (DC) pulse and the effects upon antitumor cytotoxic responses. **Methods:** Exosomes were purified from serum using ExoQuick® and analyzed for concentration and size distribution by Nanoparticle Tracking Analysis. One hundred μ L of the suspension (approximately 10^{15} nanoparticles) were incubated with mature or immature DCs and their internalization was assessed by CFSE labeling. Direct or lymphocyte-dependent cytotoxicity was assessed by the percentage of specific lysis of K562 leukemic cells in co-cultures, compared to that of non-pulsed DCs and analyzed by immunophenotyping. **Results:** Incorporation of exosomes in DCs was up to 94% during the first hour of incubation. Both mature and immature DCs exhibited cytotoxicity against K562 cells, primarily dependent on lymphocyte activation. The addition of AML-patient exosomes to DCs decreased the lysis of K562; this suppression directly correlated to the number of DCs in culture (higher concentrations of DCs reduced the lysis of K562 close to zero or even increased their proliferation). To investigate whether the observed effects were in fact caused by exosome pulsing, we performed the same procedures using exosomes purified from K562 culture supernatants and K562 cell lysates. DCs were also pulsed with exosomes from a healthy subject as a negative control. In mature DCs pulsed with K562 exosomes or lysates, little difference in cytotoxicity was observed in relation to non-pulsed DCs. In the case of immature DCs, we observed that non-pulsed or DCs pulsed with healthy exosomes did not exhibit cytotoxicity over K562 cells; whereas K562 exosomes or K562 lysates importantly enhanced lysis of target cells. Interestingly, there was a substantial increase in CD83 expression in immature DCs pulsed with K562 exosomes or lysates. CD83 is important for stimulation of T cell proliferation, and K562 lysis was an average three times higher in the presence of lymphocytes, highlighting the effect of pulse (and CD83 upregulation) over lymphocyte activation. **Discussion:** Exosomes in serum of AML patients exert an immunotolerance effect on DCs and may correspond to a mechanism of immunological tumor evasion in vivo. K562 exosomes and lysates enhance expression of CD83 in immature DCs and importantly stimulate their cytotoxicity. These differences observed between patients' exosomes and K562 exosomes or lysates may explain why DCs pulsed with exosomes exhibited important efficacy in *in vitro* studies though

sometimes failed to reproduce outcomes in immunotherapy clinical trials (Kunigelis et al., Vaccines, 3[4], 2015). **Conclusion:** Development of vaccines using patients' exosomes would probably add no benefits to the treatment of AML. Instead, vaccines using other sources of exosomes (such as engineered exosomes or exosomes from cultured cells) may represent an effective way for maturing DCs into a cytotoxic phenotype without the immunosuppressive effects observed in patients' exosomes.

1237. APPLICABILITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN THE PRACTICE OF AN ONCOLOGY SERVICE

Santis JO^a, Teixeira PMN^b, Camilo J^b, Deffune E^c, Inácio JC^c, Bittencourt RAC^a

^a Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista (UNIP), Assis, SP, Brazil

^b Hospital do Câncer de Ourinhos, Ourinhos, SP, Brazil

^c Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

Objective: Monoclonal antibodies (mAbs) are immunoproteins capable of recognizing and binding to specific or tumor-associated antigens, have a lower degree of toxicity in healthy cells, which reduces the side effects caused by cancer treatment, and can be a factor in the improvement of survival rate. The objective of this paper was to verify the applicability and use of monoclonal antibody therapy in the Santa Casa da Misericórdia's Oncology Service in the city of Ourinhos (SP). **Methods:** The method used was a survey of mAbs' use in cancer patients who attended the institution from January 2011 to July 2017. **Results:** Monoclonal antibodies were indicated 71 times during this period, considering single indication, change of mAbs and cancer recurrence. The antibodies used and their prevalence were: cetuximab, more prevalent, was used 26 times (36.3%) and indicated in cases of colorectal cancer (CRC) and laryngeal cancer; bevacizumab, found in 18 medical records (25.1%), was indicated as a second line for CRC, and as the first treatment for lung cancer, hepatocellular carcinoma and glioblastoma multiforme; rituximab was used 11 times (15.5%) in treatments of non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukemia (CLL); trastuzumab, used exclusively for breast cancer, was prescribed for nine patients (12.6%); panitumumab, nivolumab and pembrolizumab had a lower prevalence of use, being used, respectively, by four, two and one individuals (6.5%, 2.7%, and 1.3%). **Discussion:** According to Shepard et al. (2017),¹ there are 27 monoclonal antibodies approved for cancer therapy. They aim to block oncogenic pathways in order to inhibit tumor growth and induce apoptosis. Among the mAbs, there are specific ones for various targets present on the membranes of tumor cells. The indication of the antibodies varies according to their specific target. The results found in the research agree with the literature^{1,2} in relation to the use of the therapy: cetuximab for CRC and head and neck cancer; trastuzumab, indicated for HER2 positive breast cancer; bevacizumab, with a greater number of indications for CRC, lung and renal cancer, glioblastoma and cervical cancer; rituximab, indicated for CLL and non-Hodgkin's lymphoma. **Conclusion:** Considering the variety of options for immunotherapy, and their application in the different types of cancers, it is concluded that the use of mAbs in the practice of the institution is in agreement with the indications found in the literature.

References:

1. Shepard HM, Phillips GL, D Thanos C, Feldmann M. Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. Clin Med (Lond). 2017;17:220-32.
2. Chiavenna SM, Jaworski JP, Vendrell A. State of the art in the anti-cancer mAbs. J Biomed Sci. 2017;24:15.

1238. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS ALOGÊNICO, AUTÓLOGO E SINGÊNICO: VANTAGENS E DESVANTAGENS

Vivian GK, Souza TA, Ferreira ECPM

Centro Universitário Lusíada (UNILUS), Santos, SP, Brasil

Objetivo: Demonstrar as principais características dos transplantes de células-tronco hematopoiéticas alogênico, autólogo e singênico, destacando suas vantagens e desvantagens para a qualidade de vida do paciente, de modo a facilitar a consulta de profissionais de saúde e acadê-

micos nas áreas de medicina, enfermagem e biomedicina tanto para desenvolver materiais de consulta clínica ou futuras pesquisas.

Material e método: O estudo dividiu as doenças onco-hematológicas em três grupos: leucemias, linfomas e mieloma múltiplo, e tem como base teórica trabalhos acadêmicos (artigos, livros e teses) desenvolvidos no período de 2000 a 2016, com ênfase em pesquisas produzidas no Brasil. Esta escolha se deve ao fato de nem sempre a realidade estudada no exterior ser a mesma ou similar à do nosso país, em especial, o tempo de descoberta da doença (informação sobre a mesma) e seu protocolo de tratamento. Para tanto, a pesquisa foi realizada nos bancos de dados PubMed, Scielo, IbiCT e Scopus, com os descritores células-tronco hematopoéticas – transplante autólogo – transplante alogênico – transplante singênico. **Resultados:** Foi realizado o levantamento de dados em 16 anos de estudos na literatura nacional, em 55 artigos, nove livros, quatro teses de doutorado, duas dissertações de mestrado e um trabalho de conclusão de curso nas áreas de hematologia e hemoterapia, oncologia, saúde pública, enfermagem e biomedicina. Além disso, o uso sites de instituições nacionais (INCA, SBTMO, SBHH, ABRALÉ) e internacionais (Sociedade Canadense de Câncer; Hôpital Maisonneuve-Rosemont – Canadá e Fundação contra o Câncer – Bélgica) para a consulta sobre transplante singênico, pois não foi encontrado um estudo detalhado nas pesquisas nacionais. **Discussão:** O transplante de células-tronco hematopoéticas é terapia eficaz para muitas doenças fatais malignas e não malignas. Contudo, o paciente que se submete a esse transplante já está correndo algum tipo de risco nas fases do transplante. O transplante autólogo, apesar de o enxerto ser do próprio paciente, exige altas doses de drogas quimioterápicas na tentativa de eliminar a doença base, e com isso, o posterior resgate da função medular. Os riscos desse transplante envolvem falha da enxertia, desenvolvimento de bacteremia, infecção fúngica e imunidade celular. O sucesso do transplante alogênico depende de doador geneticamente similar, o que inclui características do antígeno leucocitário humano; esse tipo de transplante envolve ainda a possibilidade de desenvolver a doença do enxerto contra o hospedeiro, uma das principais causas de mortalidade pós-transplante. Já o transplante singênico é tratado como alogênico, pois embora o doador e o receptor sejam irmãos gêmeos univitelinos, a pureza genética dos mesmos é rara. **Conclusão:** Diferentes tipos de transplantes de células-tronco exigem maior estudo sobre sua viabilidade prática ou como último protocolo para cura ou sobrevida nas doenças onco-hematológicas, devido ao alto risco para o paciente pré e pós-transplante.

1239. EVALUATION OF IN VITRO CYTOTOXICITY OF ANTI-CD19 CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR CELLS AGAINST CD19 POSITIVE LEUKEMIC CELL LINE

Moco PD^{a,b}, Mizukami A^a, Vaz LD^{a,b}, Palma PVB^a, Antonietto KS^c, Farias KCRM^c, Covas DT^{a,b}, Picanco-Castro V^a

^a Centro de Terapia Celular (CTC), Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Immunotherapy using T cells modified with chimeric antigen receptor (CAR) has been proven effective in the treatment of leukemia and lymphomas resistant to chemotherapy. CD19 protein has been shown to be an ideal target because it is expressed on most B-cell tumors and normal B cells, but not in other cells. Recent clinical studies have shown excellent responses of CAR T-cells in a variety of B-cell tumors. This project aims to develop an efficient platform for lentiviral production and test the functionality of those vectors so that they can be used in clinical therapy. Mononuclear cells were collected from the leukoreduction filter of a healthy platelet donor. T cells (CD3⁺) were isolated by magnetic selection (EasySep™ positive selection human CD3 – StemCell™). The isolated T cells were activated with anti-CD3/CD28 magnetic beads (Dynabeads™ human T-activator CD3/CD28 – Gibco™) in a 3:1 ratio (cells:beads) and cultured in RPMI 10% AB serum supplemented with 100 IU/mL IL-2 (Xuri™ – GE Healthcare). Lymphocyte activation was assessed by the expression of CD25 and CD69 by flow cytometry. On the first two days after activation, we observed the largest number of cells expressing these markers (54.9% CD4/CD25 on day 1;

54,1% CD4/CD69 on day 2; 38% and 41,2% CD8/CD25 and CD8/CD69, respectively, on day 2). A third-generation lentivirus packaging system, composed of a vector plasmid, two packaging plasmids gag-pol and rev, and an envelope plasmid VSV-G in the ratio 3:1:1:1, respectively, was used to transiently transfect HEK293T cells. We collected the lentiviral supernatant after 24 and 48 hours of incubation. The supernatant was then concentrated by ultracentrifugation at 19,200 rpm (rotor SW28 – Beckman Coulter). The titer of the lentivirus was calculated via real time PCR. For this, CD3⁺ Jurkat cell line was infected with the lentiviral vectors, and the viral LTR region integrated in its DNA was amplified. We obtained an average titer of 1.6×10^9 UI/mL. The activated T cells were transduced with anti-CD19 CAR lentiviral vector with a multiplicity of infection of 5, being called 19CAR-T cells. We next evaluated the cytolytic potential of 19CAR-T cells co-culturing with B cell lines Sup-B15 (CD19⁺) and LAMA-84 (CD19⁻). A ratio of 10 effector cells for each target cell was used. The analysis of cytotoxicity was done by flow cytometry after four and 24 hours of incubation. After four hours of incubation, we observed a significant increase in the number of apoptotic CD19⁺ cells (positive for Propidium Iodide – PI, 21.95%), as compared to cocultivation with nontransduced T cells (11.19%). After 24 hours, this increase was even more significant: 89.83% of B cells were positive for PI in the cocultivation with 19CAR-T cells. No difference in the number of apoptotic CD19⁻ cells during the coculture with 19CAR-T cells was observed. So, this *in vitro* result suggested that the 19CAR-T cells are functionally active and detected only B cells that are CD19⁺. We have successfully demonstrated the feasibility of the lentiviral transduction of primary CD3⁺ T cells with anti-CD19 CAR. The cell type showed that the expressed anti-CD19 CAR was active by cytotoxicity in response to cocultivation with CD19⁺ cell line Sup-B15. **Grant:** #2016/08374-5, São Paulo Research Foundation (FAPESP). Xuri™ IL-2 was provided by GE Healthcare Life Sciences.

1240. HIGH CONTENT ANALYSIS APPROACH IDENTIFIES MIRS REGULATING STEMNESS AND CELL DIFFERENTIATION IN HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS

Lima IMS^a, Schiavinato JLDS^a, Leite SBP^a, Bezerra HLO^a, Sangiorgi BB^a, Covas DT^{a,b}, Zago MA^{a,b}, Panepucci RA^b

^a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Background and objective: MicroRNAs (miRs) are important regulators in pluripotent stem cell's biology, but their specific roles remain largely unexplored. We used quantitative automated fluorescence microscopy – High Content Analysis (HCA) – aiming to investigate the functional roles of a selected set of miRs in pluripotency and differentiation.

Methodology: Human embryonal carcinoma cells (NTERA-2) and embryonic stem cells (H1) were individually transfected with 31 distinct miR mimics or control molecules (in 96-well plates) and, following 3-4 days of culture, cells were fixed, permeabilized and stained for the visualization of nucleus and cytoplasm (Hoechst/CellMask Blue), a pluripotency marker (anti-OCT4) and a cell cycle marker (anti-Cyclin B1), and imaged with a Molecular Devices ImageXpress HCA System. The CellProfiler software was used to quantify morphometric and fluorescence intensity parameters at a cellular level. Using the KNIME software, median values of each parameter were calculated for each miR evaluated and normalized against plate controls, generating a miR-specific multiparametric phenotypic profile that, by carrying unsupervised clustering (Cluster 3), helped identify miR-clusters with similar phenotypic effects. Using TargetScan 7.0 database, predicted mRNA targets common to each cluster were identified. Enrichment functional analyses (DAVID) identified pathways potentially mediating miR effects. Validation of predicted targets was carried by miR transfection followed by RT-qPCR. The functional effect of a miR targeting Notch Pathway components was evaluated by coculturing miR-transfected NTERA-2 cells with a cell line expressing a Notch ligand (OP9-DL1) and evaluating their pluripotent status by HCA. **Results:** Two major groups of miRs inducing pluripotency and differentiation were identified in NTERA-2 and H1 cells and, despite some differences, they were highly concordant. As an example, miRs-302a/b/c/d-3p were all found to promote pluripotency in NTERA-2 and H1. The WNT, TGFβ,

PI3K-AKT and NOTCH pathways were found among the miR-regulated pathways identified. In between the validated miR/target pairs, miR-363-3p strongly induced pluripotency; reduced transcript levels of key Notch Pathway components, including NOTCH1, NOTCH2 and PSEN1; and inhibited DL1-induced differentiation, as compared to the negative control. **Discussion:** Some of miRs and pathways identified by our approach are known to be involved in pluripotency and differentiation, validating our methodology. For instance, by identifying shared targets, like Cyclin D1 and D2, MBD2a and HDAC4, previously shown to mediate miR-302 positive effects in pluripotency, we could infer that miR-19a and miR-20a are also able to promote pluripotency in H1 through this specific shared regulatory mechanism. Our results strongly support a previously undescribed mechanism mediating the pluripotency-inducing effect of miR-363-3p that would be mediated, at least in part, through the post-transcriptional inhibition of Notch signaling. **Conclusion:** The HCA assay developed here is capable of identifying miRNAs that modulate pluripotency in human cells and the molecular pathways regulated by them in this context. As an example, we identified miR-363-3p regulating Notch pathway to promote pluripotency features, which is an unprecedented result.

1241. POLY (L-LACTIC ACID) PATCH LOADED WITH ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL/STEM CELLS: THE HEALING EFFECT IN A SWINE MODEL TRACHEAL RESECTION, FIRST RESULTS

Manzini B^a, Santos AS^a, Volpe BB^a, Kharmandayan P^b, Favaro WJ^c, Vassallo J^d, Dávila MA^e, Kalaf R^f, Luzo ACM^a

^a Serviço de Transfusão e Banco de Sangue Humano do Cordão Umbilical, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Cirurgia Plástica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^c Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^d Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^e Departamento de Fabricação e Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^f Departamento de Cirurgia Torácica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Objective: Stenosis and tumors require tracheal resection and current treatments affect patient's quality of life. Stem cell therapy and tissue engineering might be an effective strategy by layering a regenerative scaffold on the trachea named tracheal patch (TP). Mesenchymal stromal stem cells (MSCs) are obtained from adipose tissue (AT) and have mesodermal differentiation and immunomodulatory properties. Biopolymers as Poly (l-lactic acid) (PLLA) guide the regenerative process without removal requirement due to their biodegradation and biocompatibility properties. This study aims to analyze AT-MSCs biocompatibility when cultured in PLLA scaffolds. PLLA will be used to manufacture TP that will be loaded with AT-MSCs and transplanted to a swine model so the regenerative process can be analyzed. **Materials and methods:** PLLA was obtained from L-lactide by ring opening polymerization, solubilized in chloroform/acetone and processed by electrospinning. Fibers were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). AT was obtained by liposuction, digested by collagenase and harvested in DMEM low glucose and FBS medium. Adherent cells (fourth passage) were characterized as MSCs by flow cytometry, morphological changes (confocal microscopy) and mesodermal lineages differentiation capacity. Gene stability analysis was performed by telomerase enzyme activity and karyotype assays. AT-MSCs were seeded on PLLA scaffolds. Adhesion was analyzed by SEM, proliferation by MTT and cytotoxicity by Live/Dead. PLLA mats were cut to manufacture TP. AT-MSCs were cultured on TP (21 days), attached to suture filaments (SF) and then transplanted in swine models submitted to tracheal resection. After one month of transplantation, healing process was analyzed by: Collagen I/II, MMP2, MMP9, VEGF, TNF- α , IL-10, CD105, CD31; hematoxylin/eosin, safranin o and toluidine blue stains. **Results:** PLLA fibers have an average diameter of 10 μ m. Adherent cells were characterized as MSCs. Telomerase enzyme activity and karyotype analyses showed gene

stability. AT-MSCs adhered and proliferated all over the scaffold, thus maintaining viability. The engrafted AT-MSCs differentiated into chondrocytes. Collagen fibers were restored. Collagen type I and neoangiogenesis increased when compared to NC. Non-significant inflammatory reaction was observed. **Conclusions:** PLLA was biocompatible with AT-MSCs. Cells were able to differentiate and restore the tracheal tissue. The cell patch preserved tracheal function after resection, supporting the survival of the transplanted cells. This strategy might be a promise tool for regenerative medicine.

1242. AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA NÃO MÚSCULO INVASIVO

Dias LP^a, Volpe BB^b, Duran M^a, Galdames S^c, Santana MH^c, Luzo ACM^b, Fávoro WJ^a

^a Departamento de Biologia Funcional e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Centro de Hematologia e Hemoterapia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^c Instituto de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Objetivos: O câncer de bexiga urinária representa a segunda doença maligna mais comum do trato urinário. Atualmente, a terapia mais eficaz para o câncer de bexiga urinária não músculo invasivo (CBNMI) é a imunoterapia com BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) associada à ressecção transuretral. Entretanto, a utilização do BCG está associada a efeitos colaterais que variam desde sintomas irritativos leves até reação sistêmica grave, contribuindo para a interrupção do tratamento e índice de recorrência pós-tratamento de 30%. O estudo da relação do sistema imune através dos receptores Toll-like (TLR) com o câncer e a inflamação está cada vez mais interligado, tornando-se uma opção terapêutica para o tratamento do câncer. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um lisado plaquetário que libera uma série de fatores de crescimento, citocinas e interleucinas com propriedades regenerativas que atuam através da promoção de quimiotaxia de fibroblastos, regulação da secreção de colágeno, imunomodulação, apoptose dentre outras funções. O objetivo deste trabalho foi avaliar o PRP como alternativa ao BCG no tratamento do CBNMI quimicamente induzido em ratos. **Materiais e métodos:** O PRP foi produzido de quatro doadores humanos. Foram coletados 10 mL de sangue total, centrifugado a 100 g. O sobrenadante foi coletado e imediatamente administrado via intravesical nos tratamentos em animais quimicamente induzidos. Para isso, foram utilizados 30 ratos Fischer 344, dos quais 20 foram induzidos quimicamente com N-metil-N-nitrosourea (MNU) ao CBNMI, e divididos nos seguintes grupos experimentais: MNU (câncer), MNU + BCG, MNU + PRP e MNU + PRP + BCG. Os outros 10 animais foram considerados controles e divididos em CTL e CTL + PRP. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas a análises histopatológicas e imuno-histoquímicas para os intermediários da via de sinalização dos TLRs (TLR2, TLR4, MyD88, TRIF e IFN- γ). **Resultados:** O resultado das análises histopatológicas desses grupos experimentais mostrou 20%, 40% e 60% de inibição tumoral para os grupos MNU + BCG, MNU + PRP e MNU + PRP + BCG, respectivamente. O perfil das imunorreatividades das proteínas TLR2, TLR4, MyD88, TRIF e IFN- γ revelaram ativação do sistema imune inato nos grupos MNU + BCG e MNU + PRP + BCG. O grupo MNU + BCG o fez através da via dependente de MyD88, ao passo que no grupo MNU + PRP + BCG essa ativação ocorreu tanto pela via dependente de MyD88 quanto pela via dependente de TRIF. **Discussão:** Quando associados os compostos PRP e BCG no tratamento, os níveis proteicos de todos os antígenos estudados atingiram máxima imunorreatividade, o que significa total recuperação do sistema imune para esse grupo. A produção de citocinas como o IFN exerce ação antitumoral por indução de TRAIL, um potente indutor de morte celular tumoral, sendo que o IFN γ é responsável pela estimulação de vias antiproliferativas e apoptóticas, assim como desempenha um importante papel na proteção contra metástases. **Conclusão:** Os resultados obtidos nas condições estudadas demonstraram que o PRP xeno não causou efeito adverso, imunomodulando os animais. Sua associação ao BCG desencadeou melhor resposta de inibição do crescimento tumoral, quando comparada com a terapêutica de BCG e PRP isolados, podendo ser uma importante estratégia terapêutica para o CBNMI.

1243. REGENERATION OF PRIMARY AFFERENTS FOLLOWING SPINAL CORD DORSAL ROOT SECTION AND REPAIR WITH PLATELET-RICH PLASMA (PRP)Castro MV^a, Volpe BB^b, Luzo ACM^b, Oliveira ALR^a^a Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil^b Centro de Hematologia e Hemoterapia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Motor coordination involves specific neural processes ranging from the perception of stimuli to the achievement of the response, being dependent on delicate sensory-motor integration, which is particularly evident in the spinal cord. Spinal root injuries can lead to motor, sensibility and autonomic losses. This type of lesion constitutes a significant medical problem and usually affects the brachial plexus in consequence of high energy trauma. However, due to the possibility of generating further inflammation and neuropathic pain, surgical procedures do not prioritize the repair of the afferent component. In this context, new therapies need to be developed for dorsal root repair. A promising treatment would be the use of platelet-rich plasma (PRP). Nowadays, PRP is used in a wide range of surgical procedures, and there are several scientific studies demonstrating its benefits in treating various types of injuries. Therefore, to investigate the effectiveness of PRP as an adhesive and inductive element for nerve regeneration, adult female Lewis rats (LEW/HsdUnib; n = 5 per group) were subjected to unilateral rhizotomy (RZ) of the L4-L6 dorsal roots and divided into two groups: (1) RZ without repair; (2) RZ followed by root repair with PRP (RZ+PRP). The reflex arc recovery was evaluated daily through the electronic von-Frey method during eight weeks, while the expression of VGLUT1 (vesicular glutamate transporter 1), GFAP (astrocyte marker) and Iba-1 (microglial marker) was evaluated in the spinal cord by immunofluorescence eight weeks after lesion. Taken together, our results indicate that PRP is efficient in repairing transected spinal roots, restoring the reflex of paw withdrawal, without signs of allodynia (8th week post-lesion: RZ+PRP = 65.13% better than RZ). Also, the use of PRP for this type of injury allowed the reentrance of primary afferents within the spinal cord and did not exacerbate the glial reactivity, promoting the restoration of spinal circuits. We believe that our results will serve as a basis for the use of PRP in accelerating nerve regeneration and may contribute to the future clinical use of this therapeutic approach, fulfilling a critical gap in reparative procedures after this type of injury.

1244. DIGESTIVE FISTULA HEALING PROCESS EVALUATION WHEN TREATED WITH ADIPOSE TISSUE MESENCHYMAL STROMAL STEM CELLS ADDED IN SUTURE FILAMENTSVolpe BB^a, Santos AS^a, Manzini B^a, Kharmandayan P^b, Fávoro WJ^c, Burstoff-Silva JM^d, Luzo ACM^a^a Serviço de Transfusão e Banco de Sangue Humano do Cordão Umbilical, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil^b Departamento de Cirurgia Plástica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil^c Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil^d Departamento de Cirurgia Pediátrica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Aim: Digestive fistulas (DF) are difficult to treat, leading to many adverse effects and a drop in patient's life quality. Stem cell therapy could be a new approach. Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) may be useful, as they have immunomodulatory properties and can be easily obtained from adipose tissue (AT). Previously, we published that AT-MSCs could be added in suture filaments. The use in an enterocutaneous fistula animal model provided a better healing. This study aimed to investigate the involved mechanisms. **Methods:** AT was obtained from healthy donors submitted to lipoaspirate surgery (50 mL). The acquired cells obtained by AT digestion were cultured leading to AT-MSCs. One x 10⁶ cells were fixed in the filaments (Poly Vicryl/ Poliglactine) by adding a patented fibrin glue. Animal experiments were achieved with Wistar rats (25 animals). The cecal fistula was created by

incising the cecum and suturing the opening to the surgical wound subcutaneously with four separate stitches. Three groups were defined: Control group (CG-5 animals); no injury performed, analyzed on day 21; Fistula group (FG), lesion performed with suture filaments without AT-MSCs, analyzed on day 21 (5 animals) and Fistula group/AT-MSCs, with added AT-MSCs, analyzed on days 7, 14 and 21 (5 animals each). After sacrifice, collected samples were fixed with Bouin. Microscopy analyses with Hematoxylin and eosin stain and immunohistochemistry to MMP-2, MMP-9, COL3A1, COL1, VEGF, TLR4, TNF- α , IL-6 were performed. Three aleatory areas per slide were analyzed for two different people.

Results: CG group showed normal glandular epithelium architecture, no neoangiogenesis/inflammatory infiltrate at histological analyses, MMP-2, MMP-9, VEGF, TLR4, TNF- α , IL-6 weak immunoreactivity and collagen type I presence. FG showed glandular epithelium architecture disruption, inflammatory infiltrate among the glands, few neoangiogenesis or collagen presence. The FG-AT-MSCs group showed great inflammatory process in submucosa on days 7 and 14, diminishing on day 21, with architecture repair, collagen type III exchanged to type I, similar to CG, demonstrating histological healing. Neoangiogenesis was detected by a moderate VEGF immunoreactivity presence on days 7 and 14, with great reduction on day 21. F-AT-MSCs group MMP-2 great reactivity was detected on day 7, decreasing up to day 21. These results were related to tissue-remodeling process. MMP-9 results were similar to MMP-2 in the initial phase (7th day) increasing the immunoreactivity up to day 21. A persistent cell migration due to MSCs immunomodulation may led to the high reactivity. The F-AT-MSCs group's IL-6 results showed a moderate reactivity, probably due to the acute trauma phase, even on day 21. However, a complete healing was seen at that time. TLR4 results increased gradually in the F-AT-MSCs group, which may be due to MSCs' immunomodulation property, leading to PGE2 releases that signal to E prostanoïd receptors and increase IL-10 secretion by macrophages, thus preventing neutrophils from migrating/proliferating into the injured areas. The F-AT-MSCs group TNF- α results showed a gradual increase in the first 14 days, decreasing on day 21. These data may explain the histological findings that demonstrated a low number of neutrophils with great reduction of inflammatory reaction. **Conclusion:** MSCs immunomodulatory properties were responsible for a better healing when added to suture filaments, being a useful tool to the treatment of digestive fistulas.

1245. VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE CPHP COM USO DE HIDROXIETILAMIDO

Arzenares LFS, Alves SCR, Metze IGHL, Luzo ACM, Vigorito AC

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Objetivo: No aperfeiçoamento do processo de mobilização de células-tronco, as células progenitoras hematopoiéticas periféricas (CPHP) tornaram-se a principal fonte dessas células para transplantes e terapia celular. O congelamento das CPHP requer a adição de crioprotetores para prevenir lesão celular. O hidroxietilamido, por ser um crioprotetor não penetrante, tem capacidade de proteção extracelular, prevenindo a formação de grumos após o descongelamento e vem substituindo o RPMI por determinação da ANVISA. Assim, nosso objetivo é validar o protocolo de criopreservação de CPHP com adição de hidroxietilamido e ajuste de concentração celular através da avaliação da sua viabilidade pós-descongelamento. **Material e métodos:** Foram processadas 26 CPHP: 13 unidades usando 10% DMSO, 20% plasma e 20% RPMI com concentração final do buffy-coat, cuja média foi de 277.533 leucócitos/mm³ e 13 unidades com o protocolo 10% de DMSO, plasma e hidroxietilamido com a concentração ajustada para 200.000 leucócitos/mm³. Em todas as amostras foram realizadas quantificações de células CD34⁺ viáveis pré-processamento para criopreservação (PRE) e após o descongelamento (POS). Essa quantificação foi feita por citometria de fluxo: plataforma dupla, lise *no wash* segundo protocolo ISHAGE. **Resultados:** Com o ajuste da concentração celular para 200.000/mm³, a mediana do volume criopreservado foi ligeiramente menor no protocolo com RPMI do que no protocolo com hidroxietilamido (150-200, p = 0,13, respectivamente). A razão do volume de aférese e o volume criopreservado nos os dois protocolos foram semelhantes (mediana: RPMI 3,35 e hidroxietilamido 3,41; p = 0,62). O tempo de congelamento no protocolo com RPMI foi de 153 dias, e com hidroxietilamido, 63 dias. A mediana entre as porcentagens de viabilidade das células CD34⁺ pós-descongelamento foi semelhante nos dois protocolos (RPMI 84,75% e hidroxietilamido

86,06%; $p = 0,39$). A perda de viabilidade das células CD34+ após o descongelamento nos dois grupos não foi significativamente diferente (RPMI 14,37% e hidroxietilamido 12,38%; $p = 0,31$). Não houve formação de grumos durante o descongelamento em nenhum caso no protocolo com hidroxietilamido. **Discussão:** A adequação do protocolo de criopreservação às exigências da ANVISA não causou diferença nas viabilidades das células CD34+ pós-descongelamento, fato que nos assegura a confiabilidade do processo de criopreservação com o uso do hidroxietilamido. Esse protocolo teve a infusão de CPHP facilitada pela ausência de formação de grumos pós-descongelamento, o que era constante com o RPMI. Esses achados devem ser confirmados aumentando o número de amostras. **Conclusão:** O protocolo com adição de hidroxietilamido apresentou viabilidade pós-descongelamento similares ao do protocolo com adição de RPMI, o que torna esse protocolo válido.

1246. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E IMUNOFENOTÍPICA DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T DURANTE EXPANSÃO EM LARGA ESCALA

Vaz LD^a, Mizukami A^a, Castro VP^a, Covas DT^a, Malmegrim KCR^{a,b}, Swiech K^{a,c}

^a Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^c Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Introdução: Nos últimos anos, a imunoterapia com linfócitos vem crescendo como uma possível alternativa terapêutica para diversos tipos de neoplasias, podendo ser usada de forma isolada ou em combinação com outras abordagens terapêuticas. **Objetivos:** Estabelecer condições de cultivo para expansão de linfócitos T em larga escala e comparar o perfil de diferentes subpopulações em relação à cinética de crescimento celular e perfil imunofenotípico, visando futura aplicação em estudos clínicos de imunoterapia em nossa Instituição. **Materiais e métodos:** Células de indivíduos saudáveis foram coletadas de filtros de leucoaférese e isoladas por gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque™, Thermo Fisher Scientific) em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC). Em seguida, linfócitos TCD3+ ($n = 3$), TCD4+ ($n = 1$) e TCD8+ ($n = 1$) foram purificadas com beads imunomagnéticas por seleção negativa (StemCell Technologies). Após purificação, as três diferentes subpopulações foram cultivadas por sete dias sob as mesmas condições, em frascos *spinners* sob agitação de 15 rpm com meio RPMI suplementado com 10% soro AB humano. As células foram mantidas em cultivo em uma concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL e receberam doses diárias de 100 UI/mL de interleucina-2 (GE Healthcare LifeSciences). As células T foram quantificadas diariamente pelo método de coloração com azul de Trypan em câmara de Neubauer. Além disso, foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo para CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD16, CD56, CD69, CD25, iodoeto de propídio (PI) e anexina V (BD Biosciences). **Resultados:** Foi observado um perfil de crescimento semelhante dos linfócitos TCD3+ purificadas de três doadores, com fator de expansão de $36,6 (\pm 8,9)$ e viabilidade celular acima de 80%. Houve também manutenção do perfil imunofenotípico dos linfócitos durante o processo de expansão. Em relação à expansão das subpopulações, os linfócitos TCD4+ proliferaram mais (fator de expansão: 39,11) em relação à subpopulação TCD8+ (fator de expansão: 8,28) em sete dias de cultivo. Similarmente, a viabilidade dos linfócitos TCD4+ foi mais elevada e constante durante o cultivo, se comparada aos linfócitos TCD8+. **Conclusão:** Foi possível padronizar a expansão de linfócitos TCD3+ com manutenção do perfil imunofenotípico em condições escalonáveis. Observamos que as subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ apresentam maior crescimento e viabilidade quando cultivadas em conjunto. Próximas etapas incluem a caracterização metabólica e melhor otimização do bioprocesso. Em seguida, este será validado para expansão de linfócitos T modificadas geneticamente com o gene CAR19 (receptor de antígeno quimérico anti-CD19) para tratamento de pacientes com neoplasias linfoides de linfócitos B.

1247. CONTROLE DE QUALIDADE DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES ISOLADAS DO CORDÃO UMBILICAL PARA USO CLÍNICO - ANO DE 2016 CTC - HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

Caruso SR, Fernandes TR, Palma PVB, Capeli MF, Bonaldo CC, Dotoli GM, Haddad SK, Orellana MD, Santis GC, Covas DT

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Introdução: O Centro de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto (CTC-HRP) é um dos poucos centros da Rede Nacional de Terapia Celular (RNTC, CNPq) que realiza o cultivo em larga escala, para uso clínico, de células mesenquimais multipotentes em condições BPM. A produção dessas células está em concordância com as normas da Associação Americana de Banco de Sangue (AABB) para Terapia Celular e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Objetivos:** Isolar, expandir, caracterizar, criopreservar e distribuir CMM isoladas do cordão umbilical (CMM-UC) de acordo com as normas BPM para o tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro agudo (DECHA) grau II-IV corticorrefratária. **Material e métodos:** As CMM-UC foram isoladas por aderência ao plástico e expandidas *in vitro* em frascos T175 cm² em meio alpha-mem + 10% PHCS (plasma humano convertido em soro). Foi realizada a expansão celular, e entre as terceira e sexta passagens, as CMM-UC foram submetidas aos seguintes testes: identidade celular (diferenciação celular e imunofenotipagem por citometria de fluxo); viabilidade celular; potência/função celular (ensaio de inibição da proliferação de células mononucleadas); detecção de agentes adventícios (ensaio sorológicos, detecção de endotoxinas bacterianas (PTS–Endosafe®), detecção de micoplasma (Lonza®) e controle microbiológico (bactérias/fungos). As amostras de CMM-UC foram congeladas em bolsas pelo Sistema Bioarchive e foram liberadas para uso quando todos os testes de qualidade citados encontravam-se dentro dos valores de referência. **Resultados:** No ano de 2016, foram infundidas 52 bolsas, com um número total de $9,65 \times 10^6$ CMM-UC em 16 pacientes oriundos de seis diferentes hospitais, na dose de $4,71 \times 10^6 \pm 7,91 \times 10^5$ células/kg do paciente. A mediana foi quatro infusões por paciente (mín: 1; máx: 5). As células apresentaram diferenciação para osteócitos, adipócitos e condrócitos, imunofenotipagem positiva para os marcadores CD90 ($98,48 \pm 0,36$), CD73 ($87,61 \pm 5,42\%$), CD105 ($93,15 \pm 1,81\%$), CD146 ($82,87 \pm 4,40\%$), CD 166 ($89,41 \pm 2,26$) e HLA-ABC ($88,06 \pm 3,23$) e negativa para os marcadores CD14 ($1,31 \pm 0,99$), CD31 ($0,48 \pm 0,26$), CD34 ($1,81 \pm 1,18$), CD45 ($0,23 \pm 0,25$) e HLA-DR ($0,36 \pm 0,24$). A viabilidade média foi $84 \pm 3,87\%$. A inibição da proliferação de linfócitos na proporção 1:2 foi superior a 88% nas células infundidas nos pacientes. Os testes sorológicos para HIV-1 e 2, hepatite B e C, HTLV 1 e 2, doença de Chagas, sífilis, toxoplasmose (IgM), CMV (IgM), teste de micoplasma, teste de endotoxinas bacterianas e controle microbiológico foram negativos em 100% das amostras. **Discussão:** As CMM-UC produzidas pelo CTC-HRP são submetidas a um rígido controle de qualidade, de acordo com as normas exigidas pela AABB (acreditação em agosto/2016). Nenhum dos pacientes apresentou efeitos adversos graves atribuíveis à infusão das CMM-UC. **Conclusão:** A produção dessas células nesse padrão de qualidade pode proporcionar benefício terapêutico em pacientes portadores de DECHA corticorrefratária, bem como para outras finalidades terapêuticas, tais como regeneração óssea, tratamento de feridas crônicas, entre outras.

1248. EFEITO DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS LICENCIADAS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-T

Serejo TR^a, Bravo MO^a, Braga LF^a, Evelin A^a, Neves FAR^a, Covas DT^b, Caralho JL^c, Araujo FS^a

^a Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil

^b Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

^c Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF, Brasil

Introdução: As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm chamado atenção da comunidade científica devido às suas propriedades imunossupressivas. Apesar de diversos estudos mostrarem certa eficiência dessas células na prevenção e no tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro, existem pontos preocupantes nesse tipo de terapia, como

reposta clínica heterogênea dos pacientes e necessidade de grande número de CTMs para infusão. Com objetivo de contornar esses aspectos, estudos de licenciamento têm sido realizados de modo a realçar o potencial supressivo das CTMs. Outro aspecto amplamente discutido consiste no fato dos riscos inerentes à infusão celular, quando poucas CTMs transplantadas são, de fato, encontradas nos sítios de injúria. **Objetivos:** Frente a essa problemática, investigamos neste estudo o efeito do sobrenadante obtido de cultura de CTMs licenciadas sobre a resposta imune. **Materiais e métodos:** CTMs obtidas de lipoaspiração foram condicionadas com o agonista do receptor tipo toll Poly IC e/ou INF- γ e o sobrenadante produzido foi testado quanto à capacidade de controlar a proliferação de linfócitos T. **Resultados:** As CTMs usadas mostraram perfil fenotípico esperado e suprimiram a proliferação de linfócitos T ($p = 0,001$). O condicionamento das CTMs com Poly IC e INF- γ não aumentou a proliferação dessas células; entretanto, CTMs tratadas com INF- γ apresentaram maior capacidade de migração ($p = 0,006$). O tratamento das CTMs por 48 horas com INF- γ aumentou o nível transicional de IDO ($p < 0,0001$), TNF α ($p = 0,0028$), IL-6 ($p < 0,0001$) e IL-1 β ($p = 0,001$), enquanto o tratamento com Poly IC aumentou a transcrição de TNF α ($p = 0,04$) e IL-1 β ($p = 0,008$). Apesar dessa modulação e de alguns estudos mostrarem que CTMs licenciadas por esses fatores se tornam mais supressivas, o sobrenadante obtido da cultura de CTMs tratadas não apresentou vantagem ao modular a proliferação de linfócitos T, quando comparado às CTMs não tratadas. **Conclusão:** Nossos dados mostram que o condicionamento de CTMs altera a propriedade migratória dessa célula, mas em caso de terapia *cell free*, o sobrenadante obtido do licenciamento das CTMs não é suficiente para garantir maior potencial imunorregulatório. **Financiamento:** FAPDF/CNPQ.

1249. ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DO PROCESSAMENTO MANUAL DA MEDULA ÓSSEA EM TRANSPLANTE ALOGÊNICO COM INCOMPATIBILIDADE ABO MAIOR

Garcia-Silva AC^a, Tozetti PA^a, Siqueira THR^a, Orellana MD^a, Dotoli GM^a, Santis GC^{a,b}

^a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Introdução: O transplante de células progenitoras hematopoéticas (CPH) é uma terapia estabelecida para doenças hematológicas malignas e não malignas, imunodeficiências, erros inatos do metabolismo, tumores sólidos e doenças autoimunes. A medula óssea (MO) foi a primeira fonte de CPH utilizada, seguida do sangue de cordão umbilical (SCU) e o sangue periférico mobilizado (SPM). Os genes que codificam os antígenos dos sistemas HLA e ABO são de segregação independente; portanto, é possível que o doador e o receptor sejam HLA compatíveis e ABO incompatíveis. O desenvolvimento de técnicas de remoção de hemácias da MO permitiu a redução dos riscos de hemólise secundários à sua infusão. **Objetivo:** Avaliar a eficiência da remoção manual de hemácias da MO para transplante com incompatibilidade ABO maior. **Materiais e métodos:** Trinta e dois MOs de doadores com incompatibilidade ABO maior com seus receptores tiveram seus registros revisados, de 2002 a 2016. A remoção manual de hemácias foi realizada da seguinte maneira: o hematócrito da MO foi ajustado para 20%-25%; acrescentado 20% de hidroxietilamido (PM = 450 kDa); permitiu-se a sedimentação da suspensão celular por 1,5–2 horas, até que o nível de hemácias estivesse da metade para baixo da bolsa, quando então abriu-se a via de drenagem para uma bolsa vazia, e permitiu-se seu escoamento até que restassem apenas cerca de 2,5 cm da coluna de hemácias sedimentadas, quando então interrompeu-se o processo. Adicionalmente, procedeu-se à remoção do plasma. A análise estatística foi realizada no software Graphpad Prism 5. Para avaliar a distribuição normal das variáveis foi utilizado o teste D'Agostino & Pearson. O teste de Mann-Whitney foi aplicado às variáveis volume total (mL) e volume de hemácias (mL) e o teste t de Student para as variáveis células nucleadas totais (CNT) e células CD34+. **Resultados:** As MOs apresentavam um volume total inicial mediano de 1.272 mL (368,7-2.060) e após o processamento o volume total foi reduzido a 158,3 mL (58,41-407,8) ($p < 0,001$). O volume mediano de hemácias inicial foi de 333,9 mL (98,81-674,3), e após o processamento era de 26,41 mL (12,53-99,87) ($p < 0,0001$). Houve uma recuperação de 70,08% das CNT ($p = 0,001$) e

88,69% para as células CD34+ ($p = 0,0168$). A dose mediana de hemácias incompatíveis infundidas foi de 0,46 mL/kg (0,23-1,85). A reconstituição da hematopoese (neutrófilos = 500 células/ μ L) ocorreu no dia 19 (11-29) enquanto, nos receptores de MO ABO-compatível, foi no dia 17 (6-32) ($p = 0,25$). Nenhum paciente apresentou reação atribuível à infusão de hemácias incompatíveis. **Discussão:** Foi possível reduzir o volume da MO de um volume mediano 1.272 mL para 158,3 mL (12,44%) e de hemácias de 333,9 para 26,41 mL (8,59%), o que explica a ausência de reação hemolítica clinicamente significativa nos receptores. Não foi observada uma perda significativa das células CD34+, o que certamente contribuiu para a recuperação similar da hematopoiese entre os dois grupos. **Conclusão:** A remoção manual de hemácias da MO é um processo eficiente para reduzir o risco da hemólise, sem comprometer a recuperação da hematopoese.

1250. SÍNDROME DE SWEET INDUZIDA POR FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS: RELATO DE CASO

Benvenuti CG, Cremonini RM

Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, SP, Brasil

Objetivo: Relatar um caso de síndrome de Sweet, dermatose neutrofilica febril aguda, induzida por fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) – filgrastim, Granulokine®. **Materiais e métodos:** Anamnese, consulta ao prontuário eletrônico e revisão bibliográfica. **Resultados:** Paciente do sexo feminino, 70 anos, ex-tabagista, sem histórico de alergias e com antecedente de histerectomia aos 37 anos e diverticulite aguda. Diagnosticada com carcinoma seroso primário de tuba uterina, ovário e peritônio em agosto de 2014, realizando tratamento sistêmico de doença metastática com carboplatina e placlitaxel de agosto a dezembro de 2014 e citorredução com quimioterapia hipotérmica intraperitoneal em janeiro de 2015. Em dezembro de 2015, devido à progressão da doença, é submetida a tratamento com carboplatina, gencitabina e bevacizumabe. Após o primeiro ciclo, evolui com neutropenia e inicia terapia de suporte com Granulokine® 300 mcg. Paralelamente após início de Granulokine®, manifesta coixites e febre e calafrios associados à celulite extensa em membro inferior esquerdo, sendo optado por internação hospitalar. O protocolo quimioterápico foi alterado objetivando minimizar a possibilidade de reação associada à quimioterapia, entretanto manteve uso de granulokine em janeiro, fevereiro e março e apresentou novas lesões cutâneas em ambos os membros inferiores, com febre acima de 38 °C, herpes simples em glúteo e alterações em exames laboratoriais. **Discussão:** A intensificação das lesões cutâneas após aplicação de Granulokine®, leucocitose e febre demonstram relação temporal entre as administrações, manifestação e exacerbações clínicas, levando à hipótese diagnóstica de síndrome de Sweet, descrita em bula como rara ($\geq 0,01\%$ e $\leq 0,1\%$). Segundo o critério de prevalência da Organização Mundial da Saúde, a síndrome de Sweet se encaixa em doenças raras, as quais afetam 65 em cada 100 mil habitantes, com predominância de mulheres e comum em associação com carcinomas de órgãos genitourinários. Os números no Brasil, entretanto, são consideravelmente menores quando comparados aos países desenvolvidos, podendo ser reflexo de subnotificação ou falta de diagnóstico específico. Foi realizada uma revisão bibliográfica dessa síndrome, também conhecida como dermatose neutrofilica febril aguda, a qual tem como características o envolvimento cutâneo com aparecimento de lesões de placas, nódulos ou pápulas eritematosas, herpes simples, manifestações extracutâneas como febre acima de 38 °C, dor difusa, mal-estar geral e anormalidades nos exames laboratoriais, com elevação da proteína C-reativa, leucocitose (acima de 8.000) e neutrófilos superiores a 70% – todas elas identificadas na paciente. Houve diminuição da intensidade das lesões após tratamento com corticosteroides empiricamente, sem diagnóstico diferencial histopatológico, e melhora do quadro com a suspensão da terapia com Granulokine®. **Conclusão:** Após traçar um paralelo entre o arquivo médico do paciente, o histórico de uso de Granulokine® com a intensificação das lesões, a diminuição da intensidade das mesmas com uso de corticosteroides e ausência de novos episódios com a interrupção do uso, chegou-se à conclusão de que o quadro clínico era compatível com síndrome de Sweet induzida por droga. Portanto, é crucial que essa síndrome seja considerada como diagnóstico diferencial de febre com lesões cutâneas de início abrupto, principalmente quando há uma relação temporal com o uso de medicamento.

1251. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS MULTIPOTENTES DE PACIENTES COM PSEUDOARTROSE CONGÊNITA DA TÍBIA

Romero JM^{a,b,c}, Orellana MD^c, Fernandes TR^c, Caruso SR^c, Palma PVB^c, Haddad SK^c, Santis GC^c, Magalhães AF^d, Bortolin PH^d, Covas DT^{a,b,c}

^a Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

^b Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^c Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^d Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Introdução: A pseudoartrose congênita da tíbia (PCT) é uma das doenças mais desafiantes da ortopedia pediátrica pela dificuldade em obter a união óssea e, quando esta ocorre, em mantê-la. Existem várias hipóteses que sugerem que as células mesenquimais multipotentes (CMM) podem desempenhar um papel na patogênese da doença. **Objetivos:** Isolar e caracterizar as CMM de pacientes com PCT a fim de compreender o papel dessas células no desenvolvimento dessa doença rara. **Casística, material e métodos:** Amostras de medula óssea de dois pacientes com PCT foram coletadas do local da lesão-tíbia afetada (TA), da crista ilíaca do lado afetado (CIA) e da crista ilíaca do lado não afetado (CINA). As células mononucleares foram isoladas e cultivadas em meio α -MEM suplementado com 15% de soro bovino fetal. Em seguida, as células aderentes foram expandidas e mantidas até a terceira passagem. Para a caracterização dessas células, foram realizadas a caracterização morfológica, a análise de unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F), a caracterização imunofenotípica e a análise da capacidade de diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos. **Resultados:** Todas as células isoladas a partir de pacientes com PCT apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos. A análise imunofenotípica das CMM demonstrou que poucas células apresentaram positividade para os marcadores de células hematopoiéticas (CD34, CD14, CD45), endoteliais (CD31) e HLA-DR, e uma alta porcentagem de células expressaram os antígenos CD90, CD73 e CD105, CD166 e HLA-ABC. Por outro lado, a maioria das células da CINA e CIA expressaram CD146 (> 85%); no entanto, poucas células da TA apresentaram positividade para esse marcador (47% e 29%). Além disso, as CMM derivadas de diferentes locais apresentaram capacidade de formar colônias CFU-F e apresentaram diferentes capacidades de formar osteócitos, adipócitos e condrócitos, *in vitro*. **Discussão:** Nossos dados corroboram com os dados existentes na literatura, em relação à caracterização das CMM da CINA e da TA. No entanto, ainda não existem estudos sobre a caracterização das CMM da CIA, bem como a expressão do marcador CD146 nas células dos diferentes locais. **Conclusão:** Os resultados preliminares obtidos neste estudo demonstraram que as CMM da TA e CIA de pacientes com PCT apresentam características morfológicas e imunofenotípicas semelhante às CMM da CINA. Estudos adicionais estão sendo realizados para verificar se o potencial de proliferação e diferenciação das CMM da TA e CIA de pacientes com PCT estão alterados em relação às CMM da CINA.

1252. DIFERENCIAÇÃO HEMATOPOIÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSCS) PACIENTE-ESPECÍFICAS NA ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA

Tellechea MF, Donaires FS, Moreira LF, Calado RT

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

A anemia aplástica é uma doença caracterizada por hipocelularidade da medula óssea e consequente pancitopenia. Pode ter causas genéticas ou ser adquirida. Na sua manifestação idiopática, existem evidências de que o sistema imune tem um importante papel na depleção das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (CTHs e CPHs) presentes na medula óssea. Assim, devido à carência de células hematopoiéticas nesses pacientes, o estudo da doença fica limitado. Grande porcentagem dos pacientes é tratada com terapia imunossupressora, porém, no estado mais grave da doença, o procedimento de escolha é o transplante de

medula óssea. A falta de doadores compatíveis e as escassas CTHs presentes no material de transplante (medula óssea, sangue periférico ou de cordão umbilical) minimizam a eficácia do tratamento. Uma fonte alternativa para obtenção de células hematopoiéticas são as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Essas células são obtidas por reprogramação nuclear de células somáticas. Por serem pluripotentes, as iPSCs têm capacidade de autorrenovação ilimitada *in vitro* e de diferenciação em qualquer tipo de tecido do corpo humano. As iPSCs de pacientes podem ser utilizadas no estudo de doenças e para obtenção de células autólogas para transplantes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de diferenciação de iPSCs de pacientes com anemia aplástica adquirida em células hematopoiéticas. Para isso, iPSCs derivadas a partir de eritroblastos de um paciente com anemia aplástica adquirida (AA-02) e de um controle saudável (Ctrl-01) foram diferenciadas *in vitro*. A metodologia de diferenciação consiste na formação inicial de corpos embrioides e posterior cultivo durante 13 dias em meio específico suplementado com citocinas. O perfil imunofenotípico das células foi avaliado por citometria de fluxo em diferentes momentos ao longo do processo de diferenciação (dias 0, 7 e 13). Ao final da diferenciação (dia 13), tanto o Ctrl-01 quanto o AA-02 apresentaram células com expressão de marcadores de CPHs (CD34⁺CD45⁺). A capacidade de diferenciação e proliferação das CPHs foi avaliada através do ensaio de formação de colônias (CFUs) em meio semissólido durante 14 dias. Como resultados preliminares, observamos a predominância de unidades formadoras de colônias de granulócitos (CFU-G) e de macrófagos (CFU-M) em quantidades semelhantes tanto no controle quanto no paciente. Com o presente trabalho, demonstramos que iPSCs derivadas de um paciente com anemia aplástica adquirida podem ser diferenciadas em células hematopoiéticas de maneira semelhante ao indivíduo saudável. Contudo, novos testes de diferenciação hematopoiética com iPSCs de outros pacientes com anemia aplástica adquirida estão sendo realizados a fim de corroborar esses resultados. As iPSCs paciente-específicas representam tanto um modelo de estudo da fisiopatologia da anemia aplástica adquirida quanto uma potencial fonte para terapia celular.

1253. CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DO EFEITO IMUNOMODULADOR DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS HUMANAS

Maconetto JM^a, Sandoval ESR^a, Costa PNM^a, Lamarre Y^a, Orellana MD^a, Silveira JC^b, Kashima S^{a,c}, Covas DT^{a,d}

^a Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil

^c Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^d Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

As células estromais mesenquimais (MSC) são células heterogêneas com capacidade de controlar a resposta imunológica. Essa característica faz das MSC uma ferramenta atrativa e relevante na terapia celular, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes. Uma das aplicações na pesquisa clínica é o tratamento de pacientes com a doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD) corticorrefratário a partir de MSC expandidas em plasma humano convertido em soro (PHCS), com o intuito de eliminar o risco de contaminação por xenotransgênicos. Recentemente, estudos sugerem que a atividade de imunomodulação das MSC é em grande parte mediada por fatores parácrinos, dentre os quais, considera-se que as vesículas extracelulares (EV) desempenham um papel importante na comunicação celular, transportando moléculas bioativas para células-alvo podendo alterar seu fenótipo ou comportamento funcional. Nesse contexto, as EV derivadas de MSC (EV-MS) poderão ser utilizadas como uma nova ferramenta para controlar o GvHD corticorrefratário e melhorar a resposta clínica dos pacientes, diminuindo os efeitos secundários do tratamento e superando as limitações do uso das células. O objetivo do trabalho consistiu em caracterizar as EV derivadas de células mesenquimais obtidas do cordão umbilical (MCU) e do tecido adiposo (AT-MS) e avaliar o seu potencial de imunossupressão. Inicialmente, avaliamos a expansão das MSC

em meio de cultura suplementado com PHCS previamente depletado de EV. Em seguida, foram isoladas EV do sobrenadante de cultura das MSC por ultracentrifugação e caracterizadas quanto ao tamanho e concentração, bem como a expressão de proteínas. Também foi avaliada a expressão de genes envolvidos na imunorregulação presentes nas EV e o seu potencial de inibição de linfócitos T. Os resultados mostraram que o cultivo em meio suplementado com PHCS depletado de EV influenciou no tempo de crescimento das MSC das diferentes fontes, mas não alterou sua morfologia e capacidade de imunomodulação. As EV-MSC foram caracterizadas quanto ao perfil de exossomos, com tamanho de aproximadamente 136 nm e expressão das proteínas CD9, HSP70 e Alix. A análise do citocromo c indicou ausência de contaminação com debris celulares. Além disso, as EV derivadas de AT-MSC e MCU apresentaram média de concentração de aproximadamente $4,5 \times 10^{11}$ partículas/mL e $1,05 \times 10^{12}$ partículas/mL, respectivamente. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de as MSC provenientes de tecidos fetais apresentarem maior potencial proliferativo, clonogênico e plasticidade, e menor tempo necessário à duplicação celular em relação às células de tecidos adultos, consequentemente, secretarem uma quantidade maior de vesículas para o meio extracelular. Em relação à avaliação da expressão de genes envolvidos na imunorregulação, as moléculas LGALS1 e PGE2 foram expressas nas MSC e nas suas EV, e a molécula IDO apresentou baixa expressão nas células e não apresentou expressão nas EV. As EV-MSC foram capazes de inibir a porcentagem de proliferação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em três e duas vezes, respectivamente. Como conclusão, foi demonstrado que as EV derivadas de MSC apresentam efeito imunomodulatório em condições livres de xenoantígenos com potencial aplicação terapêutica. **Financiamento:** CTC/FAPESP (2013/08135-2), FUNDHERP, CNPq (404622/2012-7; 465539/2014-9).

1254. CYTOCOMPATIBILITY EVALUATION IN A NEW POS BIOMATERIAL

Steffens D^a, Gamba D^b, Pavulack DP^a, Caberlon B^a, Petzhöld CL^b, Pranke P^{a,c,d}

^a Laboratório de hematologia e células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Instituto de Pesquisas com Células-Tronco (IPCT), Porto Alegre, RS, Brazil

The focus of tissue engineering is to repair lost or damaged tissue through the use of cell therapy and biomaterials. The increasing trend of greater human life expectancy as well as the serious limitations in the use of allogeneic, autologous or xenogenic grafts has encouraged scientists around the world in the search for new alternatives. The synthesis of new polymers that may provide better physico-chemical and biological properties is a constant target. For this purpose, a new biodegradable and biocompatible polymer was synthesised, the poly(octylene succinate) (POS), with a molecular weight of 67,000 g/mol. The scaffolds were constructed by the electrospinning technique after optimization. Morphology and fiber diameter were accessed by scanning electron microscopy (SEM). For cytocompatibility evaluation, mesenchymal stem cells (MSCs) were used and the following analyses were performed: 1) adhesion assay after 1 day of seeding; 2) viability assay on days 1, 4, and 7; and 3) live/dead assay on days 1 and 7. SEM results showed that the best morphology, with well formed fibers and no beads, was achieved using POS 15% in an hexafluoroisopropanol:chloroform solvent mixture (7:3) (w/V). The fiber diameter was 687 ± 259 nm. In the preliminary results, MSC adhesion was similar in the POS scaffolds (12.23 ± 2.51 cells/region of interest – ROI) and in the control, which consisted of cells directly seeded onto plastic wells (11.4 ± 1.8 cells/ROI). In relation to cell viability, the metabolic activity was better in the control group. The absorbances for the POS groups on days 1, 4, and 7 were 0.149 ± 0.059 , 0.502 ± 0.290 and 0.623 ± 0.170 , respectively. For the control groups, the absorbances were 0.502 ± 0.126 , 2.775 ± 0.269 and 1.859 ± 0.026 for days 1, 4, and 7, respectively. The live/dead assay showed an increased number of live cells in the control group. In conclusion, though further cell experiments and analysis should be performed, it was possible to seed and cultivate cells on the new biomaterial. **Funding:** CNPq, CAPES, FAPERGS and Stem Cell Research Institute.

1255. HEMATOPOIETIC DIFFERENTIATION AND TELOMERE DYNAMICS OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FROM A DYSKERATOSIS CONGENITA PATIENT

Donaires FS^{a,b}, Gutierrez-Rodrigues F^{b,c}, Alves-Paiva RM^{b,c}, Silva FB^{b,c}, Tellechea MF^{a,b}, Moreira LF^{b,c}, Santana BA^{b,c}, Calado RT^{b,c}

^a Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Centro de Terapia Celular, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil

^c Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Dyskeratosis congenita (DC) is an inherited bone marrow failure syndrome that usually develops in the childhood and predisposes to leukemia and solid tumors. More than 95% of patients present pancytopenia by adulthood, and bone marrow failure is the leading cause of death. This disease is a consequence of mutations in genes responsible for telomere maintenance. Telomeres are repetitive nucleotide sequences at linear chromosome endings coated by specific proteins (shelterin) that provide chromosomal protection and stability. Telomeres shorten due to the cellular mitotic division but are maintained in cells with high proliferative capacity by telomerase, which enzymatically adds telomere repeats to the three ends of the DNA strand. Telomeres are significantly shorter in DC patients than in the rest of the population. One of the most frequently mutated genes in DC is DKC1, which encodes a protein that provides stability to the telomerase complex. In this study, we derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) from fibroblasts of a DC patient carrying the DKC1 [A353V] mutation (the most frequent in DKC1). The effects of this mutation in telomere dynamics and hematopoietic differentiation were investigated. The iPSCs were maintained in long-term culture (last passage: 140) without signs of spontaneous differentiation. Telomeres shortened during the first passages after reprogramming but were maintained in length after passage 20. Alternative lengthening of telomeres and genome copy number variations in the iPSCs were ruled out as responsible for this telomere behavior, suggesting that telomeres were maintained by late telomerase activation. Hematopoietic differentiation was carried out in two DKC1-mutant iPSCs clones, displaying an increased capacity to generate hematopoietic lineages. In contrast to previous studies, these findings suggest that DKC1-mutant iPSCs overcome the limitations imposed by the DKC1 gene defect by eventually achieving telomere length stability and maintaining cell proliferation and self-renewal at late passages. The model presented here may be useful for further molecular studies on telomere biology and so may serve as a platform for the screening of molecules that potentially overcome the mutant phenotype.

1256. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS INSERIDOS EM UMA MATRIZ TRIDIMENSIONAL À BASE DE COLÁGENO PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

Silva TAE, Cardoso AG, Silva LP, Braga MC, Santana GOS, Andrade RV, Dias SC, Franco OL, Carvalho JL

Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF, Brasil

Objetivos: Desenvolvimento de uma nova forma de tratamento de injúrias da pele, potencialmente minimizando o processo inflamatório e cicatrizes, acelerando o processo regenerativo e prevenindo infecções microbianas por meio do desenvolvimento de uma matriz tridimensional de colágeno com a incorporação de peptídeos antimicrobianos e *host defense* (synoeca-MP e IDR-1018). **Material e métodos:** A concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos foi determinada contra *S. aureus*. A citotoxicidade dos dois peptídeos sobre fibroblastos humanos (hFib) foi então avaliada por meio de MTT, utilizando-se a CIM de synoeca e 64 µg/mL de IDR 1018, concentração da literatura. O comportamento migratório dos fibroblastos tratados com os peptídeos foi avaliado pelo método de *scratch*. O ensaio de contração de colágeno foi padronizado por meio da medição da área do gel contendo hFibs. A análise de expressão gênica foi feita por PCR em tempo real. **Resultados:** Os dados obtidos indicam que IDR-1018 não tem atividade bactericida sobre *S. aureus*, ao contrário de synoeca-MP, que foi capaz de inativar estas bactérias ($> 16 \mu\text{g/mL}^{-1}$). Nessa concentração, porém, synoeca-MP

diminuiu levemente a viabilidade de hFibs ($81\% \pm 3$; $p < 0,05$), enquanto IDR-1018 não comprometeu sua viabilidade significativamente ($94,3\% \pm 1,62$). Quando combinados, o IDR-1018 reduziu o efeito citotóxico de synoeca-MP ($85,8\% \pm 6,4$; $p < 0,05$). Observou-se que IDR-1018 induziu aumento no comportamento migratório de hFibs, superior ao controle positivo após 24 horas ($17,28\%$ controle positivo x $27,1\%$ IDR-1018, $p < 0,05$). Synoeca-MP também foi capaz de induzir esse efeito ($23,77\%$ migração). O comportamento da contração do gel foi observado nos hFibs inseridos em géis contendo synoeca-MP e/ou IDR-1018. Após 120 horas, observou-se que os géis contendo os peptídeos associados tiveram maior contração, em contraposição aos géis contendo synoeca-MP, que tiveram as menores taxas de contração. A análise de PCR em tempo real das amostras das células tratadas com os peptídeos mostrou que o gene Ki67 (associado à proliferação celular) tem sua expressão aumentada quando as células são tratadas com dois peptídeos juntos; já o gene BCL2 (inibição da apoptose) se encontra aumentado nos grupos tratados com os peptídeos isolados. O gene CXCR4 (atividade quimiotática) só teve sua expressão aumentada quando as células foram tratadas com IDR-1018 e por fim, o gene CXCR7 (mediação de quimiotaxia) foi mais expresso quando as células foram tratadas com IDR-1018 e com os dois peptídeos juntos. **Discussão:** Os resultados demonstram que o sistema tridimensional à base de colágeno, juntamente com os peptídeos antimicrobianos e imunomodulatórios, apresentam potencial para aplicação terapêutica no contexto de injúrias da pele. Enquanto o IDR-1018 mostrou potencial regenerativo promovendo a sobrevivência, migração, proliferação, quimiotaxia e contração da matriz de colágeno, o peptídeo synoeca-MP mostrou excelente potencial antimicrobiano, apesar da citotoxicidade. Juntos, os peptídeos tiveram menor toxicidade celular, ainda associada a um comportamento migratório, proliferativo e de contração da matriz extracelular pelas células. **Conclusão:** Os dados obtidos até o momento indicam o potencial de aplicação dessa matriz tridimensional à base de colágeno aliado aos peptídeos que são inseridos nesta, no contexto do tratamento de injúrias teciduais sujeitas à infecção.

1257. AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DE ARMAZENAGEM DAS CPH-SP CRIOPRESERVADAS PARA USO AUTÓLOGO

Dotoli GM^a, Tozetti PA^a, Garcia-Silva AC^a, Siqueira THR^a, Palma PVB^a, Bonaldo CCOM^a, Orellana MD^a, Covas DT^{a,b,c}, Santis GC^{a,b}

^a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^c Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Objetivo: Avaliar a eficiência de sistemas de armazenagem das células progenitoras hematopoiéticas de sangue periférico mobilizado (CPH-SP) para uso autólogo por diferentes períodos de tempo e temperaturas, congeladas em solução crioprotetora com dimetil-sulfóxido (DMSO) a 10%. **Materiais e métodos:** Foram avaliadas unidades de CPH-SP criopreservadas, armazenadas em freezer mecânico (FM) a -80°C ($n = 7$) e em nitrogênio líquido (NL) a -196°C ($n = 7$) por 63 (32-166) e 1.083 (884-1.207) dias, respectivamente. A solução crioprotetora utilizada foi composta de 80% plasma autólogo e 20% DMSO (Origen®), solução V/V com o concentrado celular. Nos pacientes transplantados, a coleta de amostras foi realizada no momento da infusão e, no caso dos pacientes falecidos, as bolsas armazenadas foram descongeladas para a realização dos testes. Após o descongelamento, foram adicionadas 5,0 mL de solução de anticoagulante por bolsa. Uma alíquota de 1,0 mL foi coletada e diluída (1:8) em solução de infusão (SF + 5% albumina humana 20%). Foi realizada contagem das CNT, quantificação de células CD34⁺, viabilidade celular por citometria de fluxo e recuperação CNT e CD34⁺. **Resultados:** Em FM, a mediana de CNT antes do congelamento (AC) foi de 461,3 (148,8-891,8) e após o descongelamento (AD) de 374,4 (123,2-579,2), $p = 0,0156$. Para células CD34⁺, a quantificação teve mediana de AC 401,4 (117,7-1.659,0) e AD 215,9 (77,3-1.216,0), $p = 0,1563$. Quando armazenadas em NL, a mediana de CNT foi de AC 996,5 (155,1-1.112,0) e AD 963,2 (163,2-1.040,0), $p = 0,0313$; e para células CD34⁺, a mediana da quantificação foi de AC 212,1 (83,2-518,6) e AD 113,6 (46,2-585,1), $p = 0,2188$. Na análise da viabilidade das CNT para as bolsas armazenadas

em FM, a mediana foi de AC 99,1% (98,6-99,7%) e AD 74,7% (53,3-95,7%), $p = 0,0156$, e para as células CD34⁺ a mediana foi de AC 98,6% (98,1-99,7%) e AD de 90,9% (60,2-98,1%), $p = 0,0156$. Já para as bolsas armazenadas em NL, a mediana da viabilidade para CNT foi de AC 98,6% (97,8-99,4%) e AD 89,4% (70,4-94,9%), $p = 0,0156$; e para as células CD34⁺ foi de 98,2% (81,4-100%) e 92,7% (81,1-98,6%), AC e AD, respectivamente $p = 0,5781$. Comparando os sistemas de armazenagem (FM x NL), os resultados mostram que não há diferença estatística significativa na análise da viabilidade das CNT ($p = 0,2564$) e de CD34⁺ ($p = 0,2564$). Quanto à análise da recuperação celular a diferença estatística foi significativa para as CNT ($p = 0,0012$) e o mesmo não foi observado para as células CD34⁺ viáveis ($p = 0,9656$). **Discussão:** O uso terapêutico das CPH-SP para o tratamento de doenças onco-hematológicas depende de um processo de criopreservação e armazenagem eficientes. Assim, foi desenvolvida uma metodologia para a avaliação tanto da solução de criopreservação quanto do processo de armazenamento de CPH-SP. Nos dois sistemas de armazenagem, foi observada uma perda pequena, mas estatisticamente significativa de CNT, porém a viabilidade das células CD34⁺ foi preservada de maneira satisfatória, não comprometendo a recuperação da hematopoiese após o transplante. **Conclusão:** Não é recomendada a armazenagem por longo período de CPH-SP em FM. A armazenagem de CPH por períodos prolongados deve ser feita em NL.

1258. A NEW BIOMATERIAL FOR USE AS A SKIN SUBSTITUTE – THE CHARACTERIZATION OF A PDLLA, EGF ENRICHED, COLLAGEN COATED SCAFFOLD

Alcantara BJC^{a,b}, Steffens D^a, Pranke P^{a,b,c}

^a Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Instituto de Pesquisas com Células-Tronco (IPCT), Porto Alegre, RS, Brazil

The treatment of extensive damaged skin areas such as major traumas and large burns is a life-saving approach. Natural skin grafts have been used as the most common treatment but are limited by donor availability, clinical condition, immune rejections, infections and scarring. Replacing these areas with a substitute that cannot only provide protection but also stimulate healing is a major goal for tissue engineering. Therefore, the current study has aimed to produce and characterize an EGF-enriched biomaterial using PDLLA polymer and Type 1 collagen to be used as scaffold for tissue-engineered skin substitutes. For this proposal, scaffolds were constructed by coaxial electrospinning technique and divided into three groups: 1) PDLLA; 2) PDLLA/EGF (coaxial fiber with EGF/albumin solution core); and 3) PDLLA/Collagen (a PDLLA/EGF scaffold with Type 1-collagen coating). Random fibers were obtained for all groups without beads, and characterization of scaffolds was achieved by scanning electron microscopy (SEM) for morphology and pore size evaluation. Confocal microscopy was used to visualize core-shell structure and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to analyze the presence of collagen on the fibers. Contact angle measurements (WCA) were performed for hydrophilicity measurements. Fiber diameters for group 1 were $1.293 \pm 0.320 \mu\text{m}$, $1.235 \pm 0.486 \mu\text{m}$ for group 2 and $1.219 \pm 0.423 \mu\text{m}$ for group 3. All groups showed similar pore size, being $7.750 \mu\text{m}$, $7.410 \mu\text{m}$ and $7.314 \mu\text{m}$ for groups 1, 2 and 3, respectively. Core-shell relation was confirmed by confocal microscopy, and FTIR analysis showed a strong peak in the $1.540\text{--}1.660 \text{ cm}^{-1}$ region on group 3. This was probably due to stretching vibrations of the peptide C=O groups (Amid I), which suggests the presence of collagen in these fibers. A broad and middle amide A at about $3.300\text{--}3.400 \text{ cm}^{-1}$ due to N-H stretching can also be identified in group 3. The same peaks are also present in the collagen FTIR analysis, showing the incorporation of collagen in the scaffold structure compared to groups 1 and 2. Furthermore, the WCA for group 3 was 108.69° , while for group 1 it was 118.21° and 116.58° for group 2. In conclusion, a stable core-shell fiber EGF-enriched scaffold was developed for application in skin tissue engineering, which better demonstrates hydrophilicity with collagen coating. *In vitro* scaffold biocompatibility needs to be performed to evaluate the potential of this new biomaterial that could become an option for skin substitute studies. **Funding:** CNPq, FAPERGS and Stem Cell Research Institute.

1259. ASSOCIAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA COM O ESTRESSE OXIDATIVO EM BOLSAS DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS DEVOLVIDAS À FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS

Nascimento MR^a, Junior ALS^a, Souza ROS^b, Fraiji NA^a, Lima ES^b, Leal RS^c, Neto JPM^b

^a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

^b Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

^c Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil

O concentrado de hemácias (CH) é o componente sanguíneo mais transfundido no mundo, sendo estocado em condições adequadas para transfusão por até 42 dias. Atualmente, o maior desafio mundial é manter estoques suficientes para suprir a crescente demanda, além de diminuir todas as alterações como perda de lipídios e proteínas que levem a alterações morfológicas e redução da sobrevivência pós-transfusão. O objetivo do estudo foi associar os dados hematológicos e bioquímicos com marcadores do estresse oxidativo. Dessa forma, nosso trabalho acompanhou 15 unidades de concentrado de hemácias por 42 dias, coletando 30 mL de cada CH nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 para realização dos testes

oxidativos (TBARS, TIOS, ROS, ABTS), bem como as dosagens de: glicose (Gli), desidrogenase láctea (LDH), sódio (Na), potássio (K), cloro (Cl), magnésio (Mg), fosfatase alcalina (FOSF), cálcio (Ca), proteínas totais (PT), globulinas (Glob) e pH. Com o software SPSS versão 20, realizamos as análises estatísticas dos dados, correlacionando-os com o teste de Pearson. Diversas correlações significativas foram demonstradas: positivas para K21/GLI21 ($p = 0,003$), TIOS21/FOSF21 ($p < 0,001$), TBARS21/GLI21 ($p = 0,002$), ROS42/GLOB42 ($p = 0,003$), MAG42/Ca42 ($p = 0,003$), ABTS42/pH42 ($p < 0,001$) e negativas para PT1/GLI1 ($p < 0,001$), ALB1/GLI1 ($p < 0,001$), K7/Na7 ($p < 0,001$), PH14/CL14 ($p < 0,001$), K21/MAG21 ($p = 0,003$), ALB21/TBARS21 ($p = 0,002$), PT21/TBARS21 ($p < 0,001$), TIOS21/GLI21 ($p < 0,001$), TIOS21/Ph21 ($p = 0,003$) TBARS35/PT35 ($p = 0,003$). Acreditamos que a elevação de potássio e glicose após 21 dias de armazenamento pode ter como causa a hemólise, o que se justifica pela elevada concentração de compostos contendo o grupamento tióis e níveis elevados de acetatos, da mesma forma que concentrações elevadas de TBARS indicam aumento de peroxidação lipídica. O encontro no dia 42 de uma maior concentração de espécies reativas de oxigênio corrobora pelo aumento da globulina, pois a hemólise libera a hemoglobina acidificando o meio. Consideramos a ideia que o armazenamento prolongado (acima de 21 dias) tem efeito deletério irreversível aos CH e recomendamos que as bolsas não sejam transfundidas após período máximo de validade 35 dias.

