

^c Centro Universitário Adventista de São Paulo, Engenheiro Coelho, SP, Brasil

Introdução: A hemofilia A adquirida (AHA) é uma doença hemorrágica adquirida rara caracterizada pela presença de autoanticorpos neutralizantes anti-FVIII. Sua incidência é maior em indivíduos idosos e há poucos estudos que permitam compreender os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela quebra da tolerância imunológica e pela autorreatividade dos linfócitos B. **Objetivos:** Determinar os mecanismos imunes envolvidos na AHA através da avaliação longitudinal da produção de citocinas por linfócitos B e T isolados de pacientes com AHA. **Método:** Este é um estudo unicêntrico longitudinal que incluiu 20 pacientes diagnosticados com AHA. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram coletadas dos pacientes durante todo o acompanhamento, incluindo: (1) ao diagnóstico antes do início da terapia imunossupressora (TI), (2) durante a TI, (3) quando alcançaram remissão completa (RC, com títulos de inibidor <0,6 UB/mL e FVIII >50 UI/dL), ou (4) quando considerado falha ao tratamento, ou recidiva. Para as análises celulares, o PBMC foi descongelado e cultivado em meio RPMI-1640, na proporção de $7,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 48 poços. Após 24h, as células foram estimuladas com 1 UI/poço de fator VIII recombinante (rFVIII). Após 24h, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD25-FoxP3, interleucina (IL)-17a, IL-4, TGF- β , IFN- γ , TNF- α , IL-21, anti-CD19, BAFF, APRIL e SHIP-1 e analisadas por citometria de fluxo no citômetro FACSCalibur™. **Resultados:** A TI de primeira linha mais utilizada foi a combinação de prednisona e ciclofosfamida (85%), seguida da monoterapia de prednisona (10%) ou ciclofosfamida (5%). Desta coorte, 70% dos pacientes alcançaram remissão completa, onde 55% mantiveram a remissão sustentada e 15% recaíram. Além disso, 10% foram censurados, 10% evoluíram com falha à TI e 10% ainda estão em acompanhamento. Ao comparar os níveis intracelulares das interleucinas (IL) de indivíduos saudáveis com dos pacientes ao diagnóstico, observou-se que todos os pacientes com AHA possuem produção aumentada de IL produzidas por diferentes tipos de linfócitos TCD4⁺, incluindo: Th17 [IL-17a ($p=0,0002$) e TGF- β ($p=0,004$)] e Tfh [IL-21 ($p=0,007$)]. Além disso, foi possível observar aumento na expressão de APRIL ($p=0,001$) e BAFF ($p=0,005$). Ao diagnóstico os pacientes que recidivaram ou falharam após TI também apresentaram elevada produção de IL em células Th1 [TNF- α ($p=0,006$) e IFN- γ ($p=0,0007$)] e Th2 [IL-4 ($p=0,004$)]. Observamos anteriormente que mais de 90% dos pacientes com AHA produzem IgG4 anti-FVIII ao diagnóstico. Encontramos correlação positiva entre a IgG4 e os níveis intracelulares de IL-4 ($r=0,8986$) e IL-21 ($r=0,9856$) ao diagnóstico dos pacientes que recidivaram. **Conclusão:** Nesse estudo os pacientes com remissão completa sustentada apresentaram resposta imune Th17 e Tfh. Além disso, observamos uma resposta imune Th1 e Th2, associada a elevada expressão do BAFF nos pacientes que posteriormente evoluíram com recorrência da resposta autoimune ao FVIII.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.498>

TRANSPLANTES DE MEDULA ÓSSEA E TERAPIA CELULAR

TRANSPLANTES DE MEDULA ÓSSEA E TERAPIA CELULAR

VALIDAÇÃO DE NOVA FÓRMULA DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA LINFÓCITOS DO DOADOR – EXPERIÊNCIA DO HOSPITAL SANTA MARCELINA

SR Fernandes, JSR Oliveira, ST Alves

Hospital Santa Marcelina (HSM), São Paulo, SP, Brasil

Objetivos: Validar uma nova solução crioprotetora como método de criopreservação de Linfócitos do Doador (DLI) no Setor de Criobiologia do Hospital Santa Marcelina (HSM). **Materiais e métodos:** Por meio de análises dos resultados de viabilidade celular, realizadas no Laboratório do HSM, nas amostras do produto DLI criopreservados com a nova solução. **Resultados:** No Setor de Criopreservação do HSM, até 2020, era usado uma solução de 60% de TC199, 30% de plasma e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioproteção para DLI. Baseado em revisão da literatura e experiências de outros centros, mudamos a metodologia e adaptamos a nossa realidade com uma solução crioprotetora composta de DMSO, albumina humana 20% e hidroxietilamido (HES) 22,2%, para preservar a função dos linfócitos T criopreservados. As unidades de DLI foram submetidas a centrifugação e a seguir extraímos o plasma e o descartamos, iniciamos o preparo da nossa solução crioprotetora, na proporção de 1:1 do que foi processado do produto, acomodamos em placas de gelo artificial em gel para fazermos a junção entre produto e solução crioprotetora de forma lenta e homogênea. Ao término são colhidas 3 amostras em tubos criogênicos para realização de controle de qualidade e inspeção do material para assegurar sua qualidade para a infusão no paciente. Após isso, acondicionamos cada bolsa em cassetes de alumínio e o submetemos ao ultra-freezer mecânico de -86°C até solicitação médica do material. Foram avaliadas 4 bolsas de DLI, neste trabalho identificadas como DLI1, DLI2, DLI3 e DLI4. O DLI1 foi coletado em junho/2021; em novembro/2021, os DLI2 e DLI3 e em janeiro/2022, o DLI4. De acordo com a indicação clínica do receptor, os DLI seriam solicitados para infusão com diferentes intervalos após criopreservação e todos tiveram uma primeira infusão à fresco do produto. Os DLI1 e DLI3 pós-criopreservação não foram infundidos por óbito dos receptores e foram descongelados para análise da viabilidade com 13 meses e 8 meses respectivamente. Os intervalos entre criopreservação e infusão de material criopreservado foi de 1 mês para o DLI4, 2 meses para o DLI2. Os resultados do primeiro teste de viabilidade celular, do material fresco, foram de 99% para o DLI1, 98,5% para DLI2 e DLI3, e 99,5% para o DLI4. Após criopreservação e posterior descongelamento, a viabilidade celular foi de 76% (DLI3), 79% (DLI1), 81% (DLI2) e 90% (DLI4). **Discussão:** A infusão de linfócitos do doador (DLI) é uma terapia imunológica que pode ser indicada em recidivas pós transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) e produz um efeito conhecido como GvL (graft-versus-leukemia) ou EvL (enxerto-versus-leucemia), que é benéfico e desejável, mas pode ocorrer também um efeito citotóxico deletério,

como a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) ou aplasia medular. Do mesmo doador do TCTH é coletado por aférese o produto DLI. No material é contado, por citometria de fluxo, a quantidade de células CD3 e uma primeira infusão é feita a fresco, se houver um remanescente pode ser criopreservado, em alíquotas, geralmente em uma dose escalonada. Historicamente, a padronização da técnica de criopreservação do DLI se baseou na experiência com criopreservação das células troncos, mas ainda não há um consenso da melhor fórmula. Em nossa análise, apesar do número pequeno de amostras, todas apresentaram viabilidade pós-descongelamento acima de 75%, consideramos adequada essa taxa. Não houve intercorrência associada ao procedimento de criopreservação. **Conclusão:** A nova metodologia mostrou ser eficiente e efetiva para o procedimento de criopreservação de linfócitos, mantendo-se dentro de critérios aceitáveis de viabilidade e foi aprovado para utilização em nossos produtos de DLI no Hospital Santa Marcelina.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.499>

COMPARISON OF DIFFERENT METHODOLOGIES FOR EXPANSION OF NATURAL KILLER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD AND UMBILICAL CORD BLOOD FOR IMMUNOTHERAPY APPLICATIONS

MPO Lima^a, SCF Couto^{a,b}, PDAC Ribeiro^a,
VJ Silva^a, IAP Lemos^a, FA Ros^a, TGM Oliveira^a,
RN Ramos^{a,c}, AM Junior^{a,b,d}, V Rocha^{a,b,c,e}

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

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

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

^d Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, SP, Brazil

^e Churchill Hospital, Department of Hematology,
Churchill Hospital, University of Oxford, Oxford,
United Kingdom

In Immunotherapy, several clinical studies with Natural Killer (NK) cells have shown promising results in the treatment of onco-hematological diseases due to their high cytotoxicity against tumor cells. There are several protocols for the expansion of these cells, but there is no consensus of a gold standard protocol that provides large numbers of functional NK cells required for conducting clinical studies. Thus, we propose the development of a protocol for the expansion of these cells with the subsequent intention of applying them as cell therapy product in the Hematology Service of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Our aim was to compare different methodologies and establish a standardized protocol for the isolation and expansion of NK cells from peripheral blood (PB) and umbilical cord blood (UCB). We also characterized the expanded cells according to their functionality and cytotoxicity. The experiment was carried out at the department of

Hematology and Cell Therapy of the HC-FMUSP, in the Laboratory of Medical Investigation (LIM-31), fresh PB samples were obtained from Fundação Pró-Sangue leukapheresis healthy donors and the cryopreserved UCB units were obtained from Hospital Sírio-Libanês Umbilical Cord Blood bank. Mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation. The isolation and expansion of UCB-derived and PB-derived NK cells was performed with the selection of CD56+ CD3- cells by immunomagnetic separation. Cells were expanded ex vivo for 14 days in RPMI-1640 medium supplemented with different combinations of cytokines, such as interleukin IL-2 alone, IL-2 and IL-21, IL-15 and IL-18 and IL-12, co-cultured or not with CSTX002 feeder cells in a 1:2 ratio (NK:aAPC). The number of NK cells increased significantly when they were co-cultured with aAPC in comparison to conditions without feeder cells. Pre-activation conditions with IL-12, IL-15 and IL-18 for “cytokine-induced memory-like” (ML NK) cells in both PB-NK and UCB-NK expansion yielded a significantly greater fold expansion (12-fold and 8-fold) when compared to expansion with IL-2 alone or IL-2 and IL-21. Moreover, the addition of IL-21 did not have a significant impact in the expansion of CD56+ CD3- cells when compared to conditions that used IL-2 alone. Furthermore, aAPC-mediated expansion yielded a predominantly CD56bright CD16bright mature phenotype in both PB-NK and UCB-NK. To evaluate the functionality NK cells, in vitro assays against tumor target cells was performed and UCB-NK conditions with IL-2 alone or IL-2 and IL-21 showed enhanced degranulation capacity and lytic granules (Granzyme B and Perforin) and cytokine production (IFN- γ and TNF- α) than PB-NK cells. ML NK cells from PB produced higher amounts of cytokines and lytic granules when compared to ML NK cells from UCB. This may be related to a lower expression of NKp46, NKG2D and CD69 activation markers in ML NK UCB, and possibly because the UCB units were cryopreserved. The results suggest that ML NK cells show good ex vivo expansion, but do not show proper functionality against tumor cells. It is possible that with the addition of IL-2, ML NK cells could improve the production of cytokines and lytic granules, as seen in the IL-2 alone and IL-2 and IL-21 conditions.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.500>

CRITICAL FAILURE OF A CELL THERAPY PRODUCTS STORAGE TANK: DESCRIPTION, INVESTIGATION AND IMPLEMENTED IMPROVEMENTS

AR Belisário, EVC Benfica, LA Costa,
MC Martins, RK Andradre, PRMP Pederzoli,
KL Prata

Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais,
Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG, Brazil

Aim: Cryopreserved cell therapy products are usually stored in vapor or liquid storage tanks to maintain long-term viability. Storage tank (ST) failure can lead to the loss of cryopreserved cell therapy (CT) products, which means the only possibility of treating serious illnesses. We aimed to