

CÉLULAS T CD4 MODIFICADAS PARA EXPRESSAR CAR E RORT PRODUZEM IL-17 E IFN- E POSSUEM ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA TUMORES CD19+

H Brand^a, LC Batista^a, IP Furtado^a, R Rossetti^a, RM Silveira^a, DMC Fantacini^b, DT Covas^b, LEB Souza^a

^a Centro de Terapia Celular (CTC), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Núcleo de Biotecnologia Hemocentro de Ribeirão Preto, Instituto Butantan, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Objetivos: Células T-CAR são eficazes no tratamento de neoplasias de células B. No entanto, em casos como de leucemia linfocítica crônica, a eficácia ainda é limitada, destacando a necessidade de aumentar a eficiência destas células. Alguns trabalhos demonstram que a polarização de células T-CAR ao fenótipo Th17 aumenta a lise tumoral contra melanoma e câncer de pulmão. No entanto, a polarização para Th17 envolve o uso de citocinas e anticorpos neutralizantes que elevam o custo de produção. O fenótipo Th17 também é dependente da expressão do fator de transcrição ROR γ t cuja superexpressão em células de camundongos é suficiente para induzir Th17. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de produzir células T CD4 CAR com fenótipo Th17 através da expressão ectópica de ROR γ t e testar o potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*. **Métodos:** Clonamos dois vetores lentivirais que codificam o CAR anti-CD19 (vetor CAR) e, em um deles, adicionamos ROR γ t para produzir células rTh17-CAR. Em paralelo, estabelecemos um protocolo de polarização à Th17 com o coquetel de citocinas e anticorpos rhIL-6, rhIL-1 β , rhIL-23, α IFN- γ , e α IL-4 (células cTh17) e testamos a adição de um agonista de ROR γ t. Após a polarização, fizemos qPCR para avaliar a expressão dos genes RORC2 e IL-17A. Transduzimos células cTh17, CD4 e CD8 com os vetores e misturamos 1 CD4:1 CD8 para as análises funcionais. Fizemos cocultivo com células Raji^{luc} e a citotoxicidade foi mensurada pela quantificação da bioluminescência (sistema IVIS Lumina). Durante o cocultivo, quantificamos a secreção de IL-17 e IFN- γ por ELISA. Na análise de citotoxicidade *in vivo* infundimos 5×10^5 Raji^{luc} por via intravenosa em camundongos NSG. Após 6 dias da indução da doença, tratamos os animais com 2×10^6 T-CAR. A progressão tumoral foi mensurada periodicamente pela quantificação da bioluminescência. **Resultados:** A presença do agonista de ROR γ t aumentou a expressão de IL-17A em 45%, embora não influenciou na expressão de RORC2. Portanto, utilizamos o agonista para produção das cTh17. Após a padronização do protocolo, produzimos células cTh17-CAR, CD4-CAR e CD8-CAR e fizemos o cocultivo, que resultou em alta lise tumoral pelas células T-CAR. Na análise de ELISA, as células cTh17-CAR+CD8-CAR secretaram mais IFN γ que as CD4-CAR+CD8-CAR e rTh17-CAR+CD8-CAR. Já a secreção de IL-17 foi de 1000 e 2000 pg/mL/24h pelas rTh17-CAR+CD8-CAR e cTh17-CAR+CD8-CAR, respectivamente. A análise de citotoxicidade *in vivo* resultou na similaridade no efeito citotóxico entre os grupos analisados. **Discussão:** Assim como em linfoma de Burkitt, as Th17 são citotóxicas *in vitro* contra câncer de pulmão e melanoma. Nestes casos, as Th17-CAR foram superiores às T-CAR convencionais devido à menor expressão

de PD-1 e TIM-3. A menor secreção de IL-17 pelas rTh17-CAR+CD8-CAR, pode ser explicada porque a diferenciação para Th17 é dependente de vias como STAT-3, que é *upstream* à ROR γ t. Já o resultado obtido na análise *in vivo* pode estar relacionado ao modelo tumoral utilizado. **Conclusão:** Células Th17-CAR não possuem maior potencial antitumoral em relação às T-CAR convencionais em modelo de linfoma de Burkitt. No entanto, desenvolvemos um método simplificado de produção de células com perfil associado à Th17, cuja eficácia superior já foi demonstrada em outros tipos de tumores.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.1105>

MTHFR (C677T / A1298C / A1625C), MTRR (A66G / C524T) E SERPINE-1 (G43A) NA HIPERHOMOCISTEINEMIA EM PUÉRPERAS E RECÉM-NASCIDOS PORTADORES DE CARDIOPATIA CONGÊNITA DE MANAUS, AMAZONAS

EJS Freitas^a, AG Gbadamassi^b, RO Brito^b, MS Gonçalves^c, JPM Neto^{a,b,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA/UFAM), Manaus, AM, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFAM), Manaus, AM, Brasil

^c Instituto Oswaldo Cruz Salvador (CPqGM), Salvador, BA

^d Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH-UEA/HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

Objetivo: Análise da influência das variantes da MTHFR (C677T, A1298C e A1625C), MTRR (A66G e C524T) e SERPINA-1 (G43A) na hiperhomocisteinemia (HHcy) de recém-nascidos portadores de Cardiopatia Congênita (CC). **Material e Métodos:** Este trabalho seguiu o modelo caso-controle, realizado em parceria com o Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM) e a Maternidade Instituto da Mulher Dona Lindu, ambas localizadas na cidade de Manaus. Fizemos parte do estudo 245 puérperas e seus respectivos Recém-Nascidos (RN), sendo 173 saudáveis (controle) e 72 portadores de CC (caso). Os dados clínicos foram obtidos através do prontuário e o DNA extraído de sangue periférico utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). A análise dos polimorfismos (SNP) foi realizada pela técnica PCR em tempo real (qPCR), sistema TaqMan[®] e analisada através da plataforma QuantStudioTM6 (Applied Biosystems). Para análises estatísticas foi utilizada os softwares Graphpad Prism5 e SPSS vs23, de acordo com o tipo de variável, considerados significativos aqueles com $p < 0,05$. **Resultados:** Foram encontrados níveis séricos de homocisteína (Hcy) elevados e valores diminuídos de folato e vitamina B12 em RN casos ($p < 0,001$). Para MTHFR C677T (rs1801133), o alelo variante T apresentou risco 2,0 vezes maior para a presença de CC em relação ao alelo C (OR=2,06; 95% IC 1,35–3,14; $p < 0,001$). Os genótipos MTRR, demonstraram que os alelos mutantes 66G (rs1801394) apresentaram

risco de 1,6 vezes ($p=0,021$) e 524T (rs1532268) de 1,97 vezes ($p<0,001$). Não foram observadas diferenças significativas para a variante MTHFR A1298C (rs1801131), A1625C (rs145641996) e para a variante SERPINE-1 G43A (rs6092). **Discussão:** A gênese, mecanismos fisiopatológicos, fatores de predisposição e a heterogeneidade de apresentações das CC ainda não foram plenamente esclarecidos. A presença de variantes genéticas relacionadas a MTHFR e MTRR pode ser considerado um importante fator de risco por potencialmente aumentar os níveis de Hcy que está associada a danos epiteliais e estresse, que pode estar relacionado à malformação do coração, da mesma forma como também está associada a presença de outras malformações congênitas. O uso da Hcy como biomarcador cardíaco é proposto para muitas condições cardíacas com especificidade e sensibilidade moderadas, com pior prognóstico aumentando à medida que a tHcy aumenta. Pode ser uma ferramenta útil para melhorar o diagnóstico associado a outros biomarcadores. **Conclusão:** Acreditamos que a HHcy possa desempenhar algum papel para o desenvolvimento das CC. O genótipo MTHFR 677TT foi quase 4 vezes mais prevalente, enquanto o MTRR 66GG e 524TT foram 2,5 vezes em pacientes portadores de CC e apresentaram níveis 2 vezes maiores de Hcy do que nos controles.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.1106>

DADOS DEMOGRÁFICOS E NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA EM PUÉRPERAS E SEUS RESPECTIVOS RECÉM-NASCIDOS PORTADORES DE CARDIOPATIA CONGÊNITA DE MANAUS, AMAZONAS

EJS Freitas^a, AG Gbadamassi^b, RO Brito^b, MS Gonçalves^c, JPM Neto^{a,b,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA/UFAM), Manaus, AM, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFAM), Manaus, AM, Brasil

^c Instituto Oswaldo Cruz Salvador (CPqGM), Salvador, BA, Brasil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH-UEA/HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

Objetivo: Determinar os níveis de Homocisteína (Hcy), folato e cobalamina em puérperas e seus respectivos recém-nascidos portadores de Cardiopatia Congênita (CC). **Material e Métodos:** Participaram do estudo 245 puérperas e seus respectivos recém-nascidos (RN), sendo 173 saudáveis (Controles) e 72 com diagnóstico de CC (casos). Todos pacientes e controles foram atendidos e acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM) e Maternidade Instituto da Mulher Dona Lindu, ambas localizados na cidade de Manaus, Amazonas. Os dados demográficos e histórico gestacional foram obtidos por entrevista, enquanto os clínicos pelo prontuário médico. As dosagens de cobalamina, folato e Hcy foram realizadas no equipamento Architect i4000 (Abbott). As análises estatísticas via softwares Graphpad Prism 5.0 e SPSS versão

23, de acordo com o tipo de variável, considerados significativos aqueles com $p<0,05$. **Resultados:** Foi observado uma maior prevalência de cesáreas (58%), diabetes gestacional (OR=6,04; 95% IC 1,79–20,29; $p<0,001$) e prematuridade (OR=3,20; 95% IC 1,76–5,85; $p<0,001$) nas puérperas caso. Puérperas controle apresentaram maiores níveis de cobalamina ($p=0,006$). Os RN caso apresentaram em média menor de peso ao nascer ($2,7\pm0,73$ kg; $p<0,001$) em comparação aos saudáveis ($3,47\pm0,53$ kg). Foram observados níveis de tHcy elevados e valores diminuídos de folato e cobalamina em RN casos ($p<0,001$). Análise de curva ROC apresentou o seguinte resultado: AUC=0,939; 95% IC 0,912–0,966 ($p<0,001$), com sensibilidade de 86,11% e especificidade de 86,71% para níveis de Hcy $>15,48$ $\mu\text{mol/L}$. **Discussão:** Tanto a diabetes gestacional quanto a prematuridade são fatores de risco descritos para a presença de CC e também podem influenciar na escolha do tipo de parto realizado. A presença de níveis elevados tHcy e diminuídos de folato e cobalamina são associados ao perfil de carência nutricional durante a gestação, o que é associado a malformações congênitas, incluindo o coração. As puérperas e RN caso apresentaram níveis menores de cobalamina e folato, o que está associado a carência nutricional. O uso da tHcy como biomarcador cardíaco é proposto para muitas condições cardíacas com especificidade e sensibilidade moderadas, com pior prognóstico diretamente proporcional aos níveis de Hcy, podendo se tornar uma ferramenta útil para melhorar o diagnóstico associado a outros biomarcadores. **Conclusão:** De acordo com os dados encontrados, acreditamos que os níveis de tHcy podem estar relacionados ao maior risco de desenvolvimento de malformações congênitas, ainda maior quando concomitante a fatores predisponentes de intercorrências gestacionais. Níveis séricos de Hcy $>15,48$ $\mu\text{mol/L}$ podem ser um ponto de referência como indicador de gravidade cardíaca congênita para RN.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.1107>

MTHFR (C677T E A1298C) E SERPINA-1 (G43A) EM PUÉRPERAS COM HISTÓRICO DE PARTO PREMATURO E PERDA FETAL

EJS Freitas^a, RS Brito^b, JPM Neto^{a,b,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA/UFAM), Manaus, AM, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH-UEA/HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFAM), Manaus, AM, Brasil

Objetivo: Avaliar frequência genotípica da MTHFR (C677T e A1298C) e SERPINA-1 (G43A) em puérperas com histórico de parto prematuro e perda fetal como possíveis marcadores de predisposição. **Material e Métodos:** Este estudo seguiu o modelo de corte transversal, realizado na Maternidade Instituto da Mulher Dona Lindu, Manaus – Amazonas e contou com um total de 137 puérperas. Dados de histórico gestacional foram obtidos através de entrevista, enquanto dados clínicos,