

implementação dessa solução gera menor perda na qualidade do produto.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.1712>

ESTIMATIVA DE CÉLULAS CD34+ VIÁVEIS EM PRODUTO PÓS CRIOPRESERVAÇÃO: ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PLATAFORMA DUPLA

ASCP Campos, ANMM Lima, TS Lima, TL Pereira, A Maiolino, R Schaffel, HS Dutra

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

Introdução: A quantificação das células progenitoras hematopoiéticas CD34+ por citometria de fluxo em produtos criopreservados possui divergências interlaboratoriais conhecidas. A falta de uma padronização replicável segundo cada condição de trabalho é a base dessas diferenças. Neste trabalho comparamos dados que poderiam ser analisados sob diferentes ópticas a fim de revelar se existe uma forma mais adequada de interpretar os valores gerados por grupos que trabalham com plataforma dupla. **Objetivo:** Avaliar a massa de células CD34+viáveis/kg que o paciente está efetivamente recebendo na infusão do produto criopreservado. **Material e métodos:** Foram selecionadas 33 amostras de produto de aférese criopreservados para transplante autólogo. A quantificação de células CD34+ foi feita seguindo orientação da ISHAGE com aquisição e análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto II usando o programa FACSDiva™. A viabilidade celular foi avaliada por microscopia óptica usando azul de Trypan, ou por citometria de fluxo, com uso do corante 7AAD. As leucometrias foram obtidas por contador automático (produto pré-criopreservação) e por câmara de Neubauer (produto pós-criopreservação). Para avaliar a massa de células CD34+/kg viáveis (v) recuperada pós congelamento foram utilizadas 3 estratégias, obtidas em plataforma dupla, a saber: 1ª) Subtração da taxa de células mortas dos valores de CD34+/kg quantificadas pré-criopreservação; 2ª) Percentual de células viáveis (CD34+v/CD45+v) calculadas com base na massa de células CD45+v recuperadas pós criopreservação; 3ª) Percentual de células viáveis (CD34+v/CD45+v) multiplicadas na massa de células viáveis da contagem (por microscopia óptica) pós-criopreservação. **Resultados:** A viabilidade de células nucleadas (CN - CD45+) na citometria de fluxo teve uma mediana menor e estatisticamente diferente se comparado a viabilidade por microscopia ($p < 0,0001$). O coeficiente de variação entre a viabilidade das CN totais foi de 6,1% na microscopia e de 18,8% por citometria de fluxo. O cálculo da massa celular absoluta pré e pós criopreservação não apresentou diferença (mesmo utilizando metodologias distintas). A mediana de viabilidade das CN por citometria foi de 75,7% (por microscopia = 86%) e das células CD34+ é de 85,3% ($p < 0,0001$), mostrando que a sensibilidade à criopreservação é maior nas células nucleadas totais. Considerando as 3 estratégias de estimativa da massa de CD34+/kg, viável pós criopreservação comparada à massa pré-crio, na 1ª estratégia tivemos uma redução estatisticamente significativa;

enquanto que na 2ª estratégia e 3ª estratégia, observamos que 48% e 73% (respectivamente) das amostras apresentaram aumento no valor previamente estimado. **Discussão:** A detecção de CD34+ por citometria em CN criopreservadas requer padronização e interpretação de fenômenos bioquímicos relacionados ao uso do DMSO. O aumento de células CD34+ influencia nos valores absolutos de CD34+/kg, sendo, um parâmetro importante para grupos que trabalham com plataforma dupla. **Conclusão:** As células CD34+ foram mais resistentes à criopreservação que as CD45+ totais. A citometria de fluxo mostrou-se mais efetiva para revelar viabilidade do que azul de trypan. Das 3 estratégias de cálculo para quantificar a dose de CD34+/kg, tendo como parâmetro a recuperação de células viáveis por citometria de fluxo, a estratégia de determinar CD34+ subtraída das previamente enumeradas revela com maior coerência a perda inerente ao processo.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.1713>

IMPACTO ECONÔMICO DAS MUDANÇAS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE ENXERTOS ALOGÊNICOS DURANTE A COVID-19: UM ESTUDO DE CASO DO INCA

PFC Vieira ^{a,b}, RG Galvani ^c, MVA Pereira ^c, CCPL Moraes ^a

^a Centro de Transplante de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^c Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: A pandemia de COVID-19 alterou a dinâmica de conservação dos enxertos e de realização dos transplantes alogênicos de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH alogênico). O TCPH, além de ser um procedimento de alta complexidade, também conta com altos custos, sendo necessário uma gestão eficiente dos recursos financeiros. **Objetivos:** Avaliar o impacto econômico na rotina de criopreservação do enxerto alogênico no INCA durante a pandemia de COVID-19. **Material e métodos:** Foram avaliados 38 produtos criopreservados durante o período pandêmico (mar/2020 a dez/2021) e o custo relativo ao processo foi comparado ao período pré-pandemia (mar/2018 a dez/2019) (13 produtos). Posteriormente, foi verificado o impacto financeiro gerado em função da orientação do Ministério da Saúde. Dentre os insumos utilizados no processamento de CPH no INCA, há produtos usados somente na criopreservação, que se utiliza Dimetilsulfóxido (DMSO) (99,9%), Hidroxietilamido (HES) (16,6%) e Albumina (20%) no produto fonte de células progenitoras hematopoiéticas (CPH), com concentrações finais de, respectivamente, 5%, 6% e 2%. Posteriormente, o produto é transferido para uma Bolsa de Criopreservação (100 mL) e resfriado em um freezer -80°C. Os dados relativos aos custos dos insumos foram obtidos por meio do sistema de administração hospitalar (ABSOLUT). Os valores foram obtidos em real e convertidos para a cotação do dólar do respectivo ano. A flutuação do valor dos

insumos foi calculado usando a razão dos valores do período pré-pandemia (2019/2018) e pandemia (2021/2020). Utilizando o software GraphPad Prism 7® foi feita a análise estatística por Two-way ANOVA. **Resultados:** Não houve diferença estatística nos custos ligados à criopreservação, se comparado os períodos pandêmico e pré-pandemia, devido à flutuação observada nos valores entre todos os itens. No entanto, o custo total com criopreservação no período pandêmico foi 2,6 vezes maior que o período pré-pandemia analisado. A bolsa de criopreservação obteve aumento de 21%. Já o valor dos itens DMSO, albumina e HES apresentaram redução de 39%, 30% e 25%, respectivamente. No ano de início da pandemia (2020) o custo de uma criopreservação era de US\$ 650.23 enquanto o valor registrado em 2019 era de US\$ 915.25, ou seja, o ano de início da pandemia não reflete completamente o impacto da mesma nos preços dos itens. Porém, com a extensão da pandemia em 2021, observamos o custo total no valor de US\$ 911.52, sugerindo um aumento no valor final do procedimento, puxado pelo aumento do preço da bolsa de crio. **Conclusão:** Os custos com criopreservação no período pandêmico foram 2,6 vezes maiores que no período de pré-pandemia. Os gastos com insumos podem ser interpretados como um consumo justificado como medida de prevenção de infecção por COVID-19, orientada pelo MS. Por outro lado, a criopreservação recomendada de produtos CPH alogênicos pode impactar na sobrevida dos pacientes submetidos a esse tipo de transplante, além de tal recomendação ser considerada um fardo financeiro e uma carga de trabalho substancial para o laboratório, já que o aumento desse tipo de procedimento durante a pandemia de COVID-19 gera procedimentos adicionais, como descongelamento de CPH, que também consome uma quantidade considerável de tempo de funcionários.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.1714>

DESENVOLVIMENTO DE UMA CÉLULA CAR NK CD70 DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL CONTRA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

EK Sousa-Vidal^a, C Ishihama-Suzuki^a,
T Giove-Mitsugi^a, CC Oliveira-Barros^a,
E Verhoeven^b, JTC Azevedo^c,
L Cardoso-Zanetti^a, RM Alves-Paiva^c,
N Hamerschlag^c, L Nassif-Kerbaui^c

^a Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil

^b Centre International de Recherche en Infectiologie, Equipe Enveloped Viruses, Vectors and Innate Responses, Université de Lyon, Lyon, França

^c Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: Apesar do sucesso com a terapia utilizando células T que expressam receptor quimérico de antígeno

(CAR-T) para malignidades hematológicas, o desenvolvimento de uma terapia eficaz para Leucemia Mieloide Aguda (LMA) continua sendo desafiador, devido à falta de antígenos específicos da LMA e sua grande heterogeneidade molecular. Entretanto estudos demonstram que o CD70 é um alvo promissor, pois está ausente em células progenitoras normais e é altamente expresso em blastos LMA. Vale frisar que o uso de células CAR T também enfrenta uma série de desafios como reações adversas e síndrome do enxerto contra o hospedeiro (DECH), por conta disso há um interesse crescente na utilização de células NK no desenvolvimento de células CAR prontas para uso, sem o risco de DECH. Além disso, a utilização de Sangue de Cordão Umbilical (SCU) amplia ainda mais a possibilidade de uma terapia prontamente disponível e alogênica. Sendo assim, o objetivo do nosso estudo foi desenvolver células CAR NK CD70 provenientes de SCU e testar sua função citotóxica contra linhagens celulares de LMA. **Material e métodos:** Isolamos células NK a partir de SCU criopreservados de doadores saudáveis. As células NK foram transduzidas com um vetor lentiviral pseudotipado com envelope Baboon-Less (BaEV-Less) carregando um construto CD70 CAR de quarta geração incorporando a interleucina 15. As células CAR NK CD70 foram expandidas e em seguida conduzimos ensaios *in vitro* de citotoxicidade por análise de Calceína AM utilizando proporções de células alvo:células efectoras (10, 5, 2, 1 e 0.5×10^4). Além disso, conduzimos um ensaio de liberação de citocinas IFN γ e TNF α intracelular e degranulação contra as linhagens LMA alvo CD70+ OCI-AML2 e THP-1. **Resultados:** Após a transdução das células CAR NK de SCU, obtivemos taxas de transdução entre 20% e 25%, estável ao longo dos dias de manufatura, sem nenhum comprometimento de expansão e viabilidade celular durante o cultivo *ex vivo*, obtendo um *fold* de expansão de 520. Na análise de função, o CAR-NK CD70 demonstrou potente citotoxicidade contra as linhagens tumorais OCI-AML2 e THP-1, sendo significativamente maior quando comparadas com as células controle NK não transduzidas ($p < 0,01$, $n = 3$). Por outro lado, quando em contato com células CD70 negativas, como a linhagem NALM6, não houve citotoxicidade além do basal, demonstrando que a lise celular foi antígeno-específica ao alvo CD70 ($n = 3$). Além disso, as células CAR NK CD70 também demonstraram um aumento de produção significativa de IFN γ , TNF α e CD107a quando em contato com seus alvos CD70+ ($n = 3$), o que não foi observado quando em contato com a célula CD70- NALM6 ($n = 3$). Experimentos *in vivo* estão sendo iniciados no momento para validação experimental. **Conclusão:** Nossos dados sugerem que as células CAR NK CD70 tem um alto potencial citotóxico e imunológico - antígeno específico, capaz de fazer o controle tumoral *in vitro* de células de LMA com expressão de CD70. Além disso, mostramos que o uso de células CAR-NK provenientes de SCU são uma possibilidade para uma terapia alogênica, “off the shelf”, ampliando o espectro de terapias disponíveis para os pacientes de LMA.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.1715>