Objetivo: Identificar possíveis interações medicamentosas (IM) nas intervenções terapêuticas das pessoas com Doença Falciforme (DF), considerando a relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) e comorbidades, como: hipertensão, diabetes, desordens psiquiátricas e infecções. **Metodologia:** Seis medicamentos foram selecionados para avaliação quanto à presença de IM baseados nos parâmetros: 1- Indicação para terapia medicamentosa na DF e 2- Oferta de medicamentos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) como componente básico de acordo com a RENAME 2017. Assim, os seguintes fármacos foram elencados: ácido fólico, hidroxiureia, penicilina, diclofenaco, sulfato ferroso e paracetamol. Cada um desses medicamentos foi avaliado para a presença de IM frente aos seguintes grupos de medicamentos: anti-hipertensivos: Captopril, anlodipino, Carvedilol, Enalapril, Nifedipino, Losartana, Valsartana; hipoglicemiantes: Metformina, Glibenclamol, psicotrópicos: Fluoxetina, Clonazepam, Ácido Valpróico, Citalopram, Buspirona, Bupropiona, Sertralina, Haloperidol, Carbamazepina; diuréticos: Hidroclorotiazida, furosemida e espironolactona; antibióticos: Norfloxacin, Ciprofloxacino, Nistatina, Fluconazol, Amoxicilina, Clavulanato de Potássio, Aciclovir, Azitromicina, Micafungina, Itraconazol; e anti-inflamatórios não esteroidais: Ibuprofeno, Nimesulida, Ácido acetil salicílico e dipirona, totalizando 35 medicamentos. A escolha desses medicamentos foi feita com base em: A- Indicação para intervenção terapêutica medicamentosa de condições como hipertensão, diabetes, tratamento de infecções e desordens psiquiátricas, B- Oferta de medicamentos pelo SUS (n = 26), C- Mesma classe de medicamentos oferecidos pela rede SUS, mas não disponíveis para dispensação ambulatorial (n = 9). Para busca das informações foi utilizado o banco de dados de fármacos DrugBank. As informações pesquisadas foram: Avaliação de descrição de IM na seção própria de cada fármaco; busca de informações sobre inibição e estimulação das enzimas do sistema microsomal hepático (CYP 3 A4) na seção de metabolismo do fármaco. **Resultados:** A avaliação da IM em seção própria mostrou 45 interações medicamentosas, 21 delas estão relacionadas e são relativas aos medicamentos oferecidos pela rede SUS. Além disso, 9 medicamentos foram classificados como inibidores de CYP 3 A4, potencial fonte de IM, o que demonstra a possibilidade de presença de interações medicamentosas não descritas e não elucidadas em seção própria no banco de dados. **Discussão:** A DF é a hemoglobinopatia genética mais comum entre pardos e pretos, a maioria da população brasileira. Causa eventos agudos de alta letalidade, compromete todo o organismo e comorbidades. Intervenções medicamentosas melhoram a qualidade de vida das pessoas com DF, desde tenra idade. Identificar potenciais interações medicamentosas é uma ação qualificada em saúde. **Conclusão:** Os medicamentos levantados mostraram potencial para interações medicamentosas. Dessa forma, não só a capacitação de profissionais de saúde para atenção e cuidado dessa população, mas também a capacitação comunitária serão fundamentais para garantir o sucesso terapêutico, qualificar a atenção e promover saúde.

TERAPIA CELULAR

TERAPIA CELULAR

1217 INF- γ REALÇA O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DEPENDENTE DE CONTATO DAS CÉLULAS-TRONCO, MAS FALHA EM PROMOVER IMUNOSSUPRESSÃO LIVRE DE CÉLULAS.

Serejo TR^a, Braga LF^a, Carvalho AES^a, Neves FAR^a, Pereira RW^b, Carvalho JL^a, Araujo FS^a

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

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

As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido investigadas como importante ferramenta para terapia celular, especialmente devido a

sua capacidade para controlar a resposta imune. Atualmente, existe uma busca ativa por estratégias capazes de potencializar os efeitos das CTMs sobre o sistema imunológico e de diminuir o número de células necessárias para uso terapêutico. Nesse sentido, o licenciamento de CTMs é uma das principais estratégias investigadas até o momento. Além disso, parte da comunidade científica investiga a capacidade terapêutica do secretoma das CTMs, a fim de se evitar a complexidade da terapia celular. Neste trabalho, investigamos os efeitos do licenciamento de CTMs com INF- γ e Poly (I:C) (agonista do receptor tipo toll 3; RTT3) sobre a proliferação, migração e função imunomoduladora dessas células. Além disso, avaliamos se o licenciamento com INF- γ e Poly (I:C) afetam a função imunossupressora do sobrenadante derivado das CTMs. Por fim, investigamos o perfil transcricional das CTMs submetidas a essas diferentes estratégias de licenciamento. Interessantemente, as CTMs licenciadas com INF- γ apresentaram expressão elevada de IDO e ICAM, que realçaram o potencial imunossupressivo dessas células. Surpreendentemente, o sobrenadante obtido das CTMs submetidas ou não às estratégias de licenciamento com INF- γ e Poly (I:C) não garantiram maior capacidade de modular a resposta de linfócitos T, quando comparados ao secretoma de CTMs não licenciadas. Com objetivo de explorar mais esse resultado, isolamos microvesículas do sobrenadante de CTMs e encontramos que esses componentes carregam TGF- β e Galectina-1, sendo capazes de suprimir com sucesso a proliferação de células-T. Nossos dados mostram que o licenciamento com INF- γ aumenta a função imunorreguladora das CTMs em um contexto celular, mas que essa estratégia de licenciamento não se sobrepõe às CTMs não licenciadas em uma terapia livre de células. Esses resultados são importantes para o campo e contribuem fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que buscam controlar a resposta imune por uso de CTMs e de seu secretoma. **Financiamento:** CAPES, CNPQ e FAPDF.

1218 INFLUÊNCIA DO PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO SOBRE O POTENCIAL IMUNOSSUPRESSIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MASENQUIMAIS

Carvalho AES^a, Serejo TR^a, Alborguetti MR^a, Schivianato J^b, Simoes BP^b, Bettarello G^c, Araujo FS^a

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

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

^c Instituto de Cardiologia do Distrito Federal, Brasília, DF, Brasil

As células-tronco mesenquimais (CTMs) apresentam-se como uma importante ferramenta terapêutica devido a inúmeras características biológicas, incluindo sua capacidade de modular o sistema imune. Nesse cenário, diversos estudos mostram benefícios promovidos por essas células quando aplicadas para o tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), tanto crônica, como aguda. Entretanto, nota-se que é necessário um grande número de CTMs para se alcançar o efeito esperado. Além disso, nem todos os pacientes respondem à infusão de CTMs. Para contornar esses obstáculos, parte da comunidade científica tem buscado estratégias de licenciamento para realçar as propriedades das CTMs. Neste estudo investigamos uma estratégia inovadora, submetendo CTMs ao plasma de pacientes com DECH e investigando alterações nas propriedades biológicas dessas células. Os plasmas de pacientes com DECH foram obtidos no Hospital das Clínicas da FMRP/USP e no Instituto de Cardiologia do Distrito Federal. Apesar de apresentarem constituição heterogênea, de modo geral, os plasmas de pacientes com DECH apresentaram maior expressão de TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-1 β , IL-12p40 e IL-15, quando comparados a plasmas de doadores saudáveis. Os plasmas de GVHD (n = 19) não influenciaram a proliferação e viabilidade das CTMs. Entretanto, surpreendentemente, alguns plasmas de pacientes com DECH foram capazes de realçar o potencial imunossupressivo das CTMs e de modular completamente a expressão de genes pró e anti-inflamatórios produzidos por essas células. Esses dados mostram claramente que o ambiente inflamatório complexo da DECH interfere nas propriedades das CTMs, sendo capaz de modular seu perfil transcricional e de aumentar seu potencial imunomodulador. Em suma, nossos achados podem servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratamento da DECH, em que se poderia utilizar o plasma do próprio paciente para realçar o potencial das CTMs. **Financiamento:** CAPES, CNPQ e FAPDF.

1219 PREVALÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTIICAS

Siqueira THR^a, Dotoli GM^a, Silva ACG^a, Zanelatto LC^a, Orellana MD^a, Covas DT^{a,b}, Santis GC^{a,b}

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

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

Objetivo: Avaliar a prevalência de contaminação dos produtos de células progenitoras hematopoéticas (CPH) de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) para transplante autólogo e alogênico, entre janeiro de 2003 a junho de 2018, em um único serviço. **Materiais e métodos:** Trata-se de uma análise transversal retrospectiva de dados. Foram analisados 1.423 produtos de CPH de 1.181 pacientes, sendo distribuídos em: 1.039 (817 pacientes) de CPH-SP autólogo, 210 (190 pacientes) de CPH-SP alogênico, 164 de CPH-MO alogênico e 10 de CPH-MO autólogo. Registrou-se o microrganismo isolado e os destinos dos produtos (infundidos ou descartados). Além disso, foi analisada a presença de contaminação de acordo com os tipos de processamento aos quais os produtos foram submetidos (criopreservação, deseritrocitação/desplasmatação e controle de qualidade). **Resultados:** 27 dos 1.423 produtos (1,9%) foram positivos para bactérias, sendo que 11 (0,7%) foram CPH-SP autólogo e 15 (1,05%) CPH-MO alogênico. Apenas um produto (0,07%) de CPH-MO autólogo foi positivo (*Staphylococcus capitis*). Não houve amostra positiva para produtos de CPH-SP alogênico. Os microrganismos em produtos de CPH-SP autólogo foram do tipo enterobactérias (6), bactérias contaminantes do ambiente (3) e microrganismos da microbiota da pele (2). Cinco desses produtos de CPH-SP autólogo criopreservado com evidência de contaminação foram infundidos e seis deles foram descartados. Entre os produtos infundidos, apenas uma amostra positivou após o descongelamento (*Ralstonia mannitolityca*). Nos produtos de MO-alogênico, a maioria dos microrganismos identificados faz parte da microbiota natural da pele, tais como o grupo *Staphylococcus* coagulase negativa (9), *Staphylococcus aureus* (2), *Micrococcus* sp. (1), além de microrganismos presentes no ambiente, como a *Burkholderia cepacia* (1). Em 2 produtos, não houve identificação do microrganismo. Em 93,3% (14 unidades) dos produtos de CPH-MO contaminados, foi realizada deseritrocitação e/ou displasmatação da medula em razão da incompatibilidade ABO entre doador e receptor. Em uma unidade que também apresentou contaminação foi feito apenas controle de qualidade para quantificação celular e o próprio teste de esterilidade. **Discussão e conclusão:** Esses achados estão de acordo com a literatura, que mostrou índices de contaminação de 1,6% a 4,5%. Os microrganismos comumente encontrados em CPH-SP são da microbiota da pele, como o grupo *Staphylococcus* coagulase-negativa. No entanto, há relatos de contaminantes do ambiente e, mais raramente, entéricos, considerados de maior risco. Os microrganismos encontrados em CPH-MO são em geral de pele, o que condiz com os achados da literatura. Existem relatos de que o DMSO possui propriedades microbicidas, bem como de que alguns microrganismos teriam baixa resistência a temperaturas negativas, além de possível ação de fagócitos ativados, o que poderia proporcionar o achado de culturas negativas após o descongelamento. Os produtos de CPH-MO submetidos a deseritrocitação ou displasmatação tiveram índices de contaminação maiores que aqueles em que apenas foram realizados os testes de controle de qualidade, o que poderia ser atribuído ao maior manuseio do produto. Como é sugerido, produtos contaminados com enterobactérias foram descartados. A infusão de produtos contaminados não influenciou o desfecho clínico. Dessa forma, pode-se concluir que os índices de contaminação de produtos de CPH estão dentro do esperado.

1220 AÇÃO CITOTÓXICA DA LINHAGEM CELULAR NK-92 CONTRA DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS TUMORAIS

Silvestre RN, Mizukami A, Pereira MSF, Fantacini DMC, Moco PD, Farias KCRM, Antonietto KS, Covas DT, Castro VP

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

Objetivos: Alguns tipos de leucemias e linfomas possuem opções limitadas de tratamento, especialmente em casos de paciente com re-

caída. Dessa forma, as imunoterapias se desenvolveram como uma alternativa de tratamento para o câncer. O uso de células Natural Killers (NKs) é uma excelente opção nessa área, devido ao fato do transplante alogênico dessas células não induzir a doença do enxerto contra hospedeiro. Entre as linhagens celulares de NK, destaca-se a NK-92, uma linhagem altamente citotóxica, que pode ser facilmente expandida *ex vivo* e tem grande potencial de ser utilizada no tratamento de pacientes com neoplasias. Dessa forma, o intuito desse trabalho foi avaliar a capacidade citotóxica da célula NK-92 *in vitro* contra diferentes linhagens celulares de leucemias e linfoma. **Material e métodos:** Células NK-92 foram cocultivadas com linhagens de linfoma de Burkitt (RAJI); de Leucemia Linfoblástica Aguda (SUP-B15) e de Leucemia Mieloide Crônica (K562), nas proporções de células efetoras: alvo de 1:1 e 5:1 por 24 horas. Após esse período, a avaliação do potencial citotóxico das células NK-92 foi realizada por dois métodos diferentes: medição de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante e por citometria de fluxo, utilizando o marcador PKH67. **Resultados:** No ensaio de LDH, o cocultivo de células NK-92 na proporção 1:1 com as linhagens Raji, K562 e Sup-B15 teve uma taxa de citotoxicidade de 19,3% ($\pm 0,007$), 7,7% ($\pm 0,002$) e 23,1% ($\pm 0,004$), respectivamente. Para a proporção 5:1, Raji apresentou taxa de 46,5% ($\pm 0,007$) ao passo que K562 e Sup-B15 apresentaram taxas menores, 14,9% ($\pm 0,009$) e 28,0% ($\pm 0,014$), respectivamente. Na análise de citometria de fluxo, a porcentagem média de morte celular para as linhagens Raji, K562 e Sup-B15, todas marcadas com PKH67, na proporção de 1:1 foi de 12,9% ($\pm 1,838$), 18,7% ($\pm 0,495$) e 14,0% ($\pm 0,283$), respectivamente, enquanto que na proporção 5:1, a linhagem celular K562 apresentou a maior porcentagem, 55,1% ($\pm 0,813$), comparada com Raji e Sup-B15, 28,2% ($\pm 0,813$) e 20,7% ($\pm 0,919$), respectivamente. **Discussão:** Os resultados apresentados demonstram que NK-92 elimina de maneira eficiente as células Raji (linfoma de Burkitt) nos dois ensaios, apresentando taxa de citotoxicidade duas vezes maior na proporção 5:1; tendo sido observada maiores taxas de morte celular pelo ensaio de LDH. As células K562 são reconhecidamente sensíveis à ação citotóxica de NKs, usadas como "feeder cells" para auxiliar no processo de expansão celular. Tanto no ensaio de LDH quanto na citometria, houve um aumento considerável da morte celular na proporção 5:1 em relação à proporção 1:1, demonstrando que K562 é sensível ao efeito citotóxico da NK-92, apesar de terem sido demonstrados níveis mais elevados de citotoxicidade pela citometria do que pela análise de LDH (55,1% vs. 14,9%, na proporção 5:1). A linhagem Sup-B15 é considerada resistente a NK-92, o que foi confirmado por não ter ocorrido alteração significativa da citotoxicidade entre as proporções 1:1 e 5:1. **Conclusão:** Pode-se concluir que a linhagem celular NK-92 apresenta uma alta atividade citotóxica *in vitro* contra determinados tipos celulares de linfoma e leucemia (Raji e K562). O uso dessa linhagem celular em novas estratégias de imunoterapia poderá ser muito eficaz, especialmente se sua ação antitumoral for potencializada através de modificação genética para expressar receptores quiméricos de antígeno (CAR) específicos para marcadores de células tumorais.

1221 IMPACTOS DA RESOLUÇÃO RDC Nº 214/2018 NO LABORATÓRIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE CPH

Arsenares LFS, Alves SCR, Luzo ACM

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

Objetivo: O processo de criopreservação de células progenitoras hematopoéticas (CPH) celular no Brasil é regido pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que atualizou a normativa e publicou a resolução RDC nº 214/2018, revogando a RDC nº 56/2010, que abrange os Centros de Processamento Celular e demais estabelecimentos envolvidos no ciclo produtivo de células e produtos de terapias avançada. O objetivo do trabalho é comparar as principais mudanças das normas da resolução RDC nº 214/2018 e avaliar os impactos da mesma nos laboratórios de processamento de CPH, a fim de normatização e adequação necessária para o cumprimento da legislação. **Material e métodos:** A resolução RDC nº 214/2018 foi analisada e discutida junto ao laboratório de processamento celular da UNICAMP no período de 07 de fevereiro a 01 de junho de 2018. A pesquisa foi dividida em: 1) leitura e segregação das normativas referentes ao laboratório de criopreservação, 2) comparação com a RDC nº 56/2010 e 3) discussão sobre os impactos relacionados ao processo de criopreservação e sistema de qua-

lidade. **Resultados e discussão:** Notam-se diferenças no âmbito geral das duas legislações, observando mudanças de nomenclatura, objetivos e maior abrangência na nova legislação em comparação com a RDC 56/2010 revogada. Houve uma maior inclusão de artigos na nova legislação, não antes descritos na RDC 56/2010, como, furto, roubo ou extravio de CPH; b) implementação de sistema de gestão de documentos que abranja e descreva regras para a sua revisão periódica; c) liberação excepcional de CPH, para circunstâncias emergenciais; d) ambiente limpo com contagem de partículas equivalente a classificação ISO 5. De acordo com o Art. 15 §1º da RDC 214/2018, é permitido realizar terciarização de armazenamento em produtos em quarentena, uma vez que na RDC 56/2010 Art.9 §1º essa permissão não era concedida. Às triagens laboratoriais, tanto os produtos autólogos quanto alogênicos, a RDC 214/2018 exigiu a realização do teste de ácido nucleico (NAT) em exames de Hepatite B, Hepatite C e HIV para os doadores/pacientes. O centro de processamento celular deve implementar um fluxo de gerenciamento de risco relacionado às ações de retrovigilância instauradas em decorrência de resultados obtidos durante a triagem laboratorial de doadores. Essa norma não era descrita na legislação revogada. O controle microbiológico de ambientes limpos se tornou obrigatório e deve ser realizado, pelo menos, durante a condição “em operação”. Algumas informações dos rótulos das unidades de transplante pós-processamento foram inseridas, como: validade, informação “apenas para uso autólogo” em caso de doação autóloga e resultados de contagem de células e concentração celular. Foram inseridas informações na solicitação de recebimento de unidades de CPH-MO e CPH-SP, como a descrição “uso terapêutico” para indicar o motivo do uso do produto e registrar a verificação da integridade da embalagem e temperatura de chegada do material após o transporte. **Conclusão:** Com a ampliação do escopo da regulamentação, que inclui pesquisa clínica e produtos de terapias avançadas, a legislação foi modificada e possui maior abrangência e riqueza em detalhes de segurança, padrões técnicos e de qualidade. Nosso laboratório está adequado às melhorias relativas ao cumprimento da legislação vigente, a fim de oferecer e obter produtos de qualidade.

1222 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE (ALDH) E A CAPACIDADE PROLIFERATIVA “IN VITRO” DAS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO

Pederzoli PRMP^a, Cruz NG^a, Scheucher PS^b, Prata KL^a, Libânio MRIS^a, Rego EM^a

^a Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais (Hemominas), Belo Horizonte, MG, Brasil

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

A utilização das células progenitoras hematopoéticas (CPH) obtidas do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) apresenta vários benefícios para o transplante de CPH em comparação às células provenientes de outras fontes. Entre eles, a maior disponibilidade e a maior imaturidade imunológica das CPH, o que permite certa flexibilidade nos critérios de compatibilidade entre doador e receptor e uma menor taxa de reação do enxerto-versus-hospedeiro. A legislação brasileira e órgãos internacionais exigem a realização de vários testes para garantir a qualidade do produto hemoterápico contendo CPH a ser transplantado. O objetivo deste estudo foi confirmar que o teste para quantificação de CPH com elevada atividade da enzima ALDH1 (ALDH^{br}) pode ser considerado um teste funcional e é um teste com a mesma aplicabilidade do ensaio de formação de colônias. Para isso, foram utilizadas 40 unidades de SCUP coletadas e processadas pelo Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Cetebio/Fundação Hemominas. As unidades foram processadas por método automatizado e amostras do creme leucocitário (*buffy coat*) foram coletadas para a realização da quantificação de células ALDH^{br}, quantificação de células CD34+, ensaio clonogênico (CFU), hemograma e cálculo do total de células nucleadas (TCN). A citometria de fluxo foi utilizada para a quantificação das CPH ALDH^{br} e CD34+ e das subpopulações CD45^{dim} e CD38+. Outras informações como idade materna, idade gestacional e sexo do recém-nascido também foram coletadas para descrição das unidades. Para verificar a viabilidade da utilização do teste de ALDH pelos BSCUP foi realizado o levantamento do seu custo. A capacidade

funcional das CPH em proliferar e se diferenciar em tecido hematopoético foi avaliada por meio do ensaio clonogênico. Detectou-se correlação entre a quantidade de células ALDH^{br} e o número de colônias no ensaio clonogênico ($p < 0,001$), entre o número de células ALDH^{br} e de células CD34+ ($p = 0,001$) e entre o número de colônias no ensaio clonogênico e o número de células CD34+ ($p < 0,001$). A imunofenotipagem mostrou que 46,25% das células ALDH^{br} eram CD45^{dim} CD38+ CD34+. Os dados sugerem que a quantificação de células ALDH^{br} em unidades de SCUP pode ser considerada teste adequado, de baixo custo, de execução simples, rápida e menos dependente do operador em relação ao ensaio clonogênico.

1223 HIGH CONTENT SCREENING PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POTENCIALIZADORES DA PROPRIEDADE IMUNOMODULATÓRIA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Costa PNM^a, Santos DFD^a, Lima IMS^a, Rós FA^a, Orellana MD^a, Panepucci RA^a, Covas DT^{a,b}, Kashima S^a

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

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

A infusão de células estromais mesenquimais multipotentes (MSC) é uma terapia alternativa para pacientes com doenças inflamatórias sendo baseada na atividade parácrina imunomodulatória das MSC. Um dos desafios é a expansão *ex vivo* para atender a taxa de infusão, que é cerca de $6-8 \times 10^6$ MSC/kg do paciente. Assim, as abordagens que potencializam a propriedade imunomodulatória das MSC previamente à infusão proporcionariam uma demanda menor de células, bem como aumentariam a eficiência do tratamento. O objetivo deste trabalho é utilizar a abordagem de *High Content Screening* (HCS), que se baseia na análise multiparamétrica celular para se estabelecer um ensaio de triagem de compostos sintéticos que potencializariam a ação imunomoduladora das MSC. Para tanto, foram utilizadas MSC do cordão umbilical (UC-MSC) e estabeleceu-se como parâmetros para avaliação do ensaio: a determinação dos compartimentos celulares (citoplasma e núcleo) e a expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2), enzima responsável pela síntese da prostaglandina E2. Primeiramente, a cultura de UC-MSC foi adaptada em placas de cultivo de 384 poços e foram testadas densidades celulares distintas (1; 1,5; 1,75; 2; 2,25 e 2,5 x 10³ células/poço). Também, foi avaliado a concentração de DMSO adequada ao cultivo (5; 4; 3; 2; 1,5; 1; 0,5 e 0%) e o melhor método de fixação e permeabilização [fomaldeído/Triton X ou Metanol 100% (MeOH)] das células para posterior marcação com o anticorpo anti-COX-2 conjugado com AlexaFluor 488. Definidas as condições ideais, testou-se a citocina inflamatória TNF- α como controle experimental indutor da expressão de COX-2. Foram testadas três concentrações (150, 100 e 50 ng/mL) em um período de 24 horas. Após este período, a cultura foi fixada, permeabilizada, marcada com o anticorpo e adquirida no microscópio da plataforma ImageXpress^{micro}XLS (Molecular Devices). Foram avaliados a área do citoplasma e do núcleo das UC-MSC e a expressão COX-2, através da intensidade de fluorescência. Os dados quantitativos mostraram que a melhor densidade celular na placa de 384 (pelo menos 50% da área de cultivo tomada) é a de 1,5 x 10³ células/poço e que uma concentração de 1% de DMSO não compromete a viabilidade da cultura. O método de fixação/permeabilização por MeOH se mostrou mais simples e de rápida execução, além de garantir a preservação de um maior número de células. A avaliação do TNF- α como indutor de COX-2 sugere que a concentração de 150 ng/mL é citotóxica, pois houve diminuição significativa da área do citoplasma e do núcleo das UC-MSC. Houve marcação de COX-2 tanto nos tratamentos quanto no controle experimental, indicando expressão constitutiva, contudo não foram observadas diferenças entre os tratamentos, indicando que algumas adequações serão necessárias, especialmente no tempo de indução e/ou nas concentrações de TNF- α . Em conjunto, os dados propõem que as UC-MSC podem ser cultivadas em placa de 384 poços para a realização de testes de triagem e que quantificação de COX-2, associada à avaliação de parâmetros morfofenotípicos, pode permitir a identificação de compostos com a atividade farmacológica desejada em uma triagem em larga escala. **Apoio Financeiro:** CTC/INCTC (465539/2014-9), FAPESP (2014/02245-3), CAPES, CNPq, FUNDHERP, BNDES.

1224 ESTUDO COMPARATIVO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS CONGELADAS EM DIMETILSULFÓXIDO A 5% E 10%

Schiefferdecker PM, Bronzel F, Almeida PTR, Koury WK

Instituto Pasquini de Hemoterapia e Hematologia S/S Ltda, Curitiba, PR, Brasil

Introdução: O Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas (TCTH) tem sido muito utilizado no tratamento de doenças malignas. Estudos são constantemente realizados no intuito de gerar uma padronização dos processos relacionados ao TCTH. Como parte do protocolo do Transplante Autólogo, as Células-Tronco Hematopoéticas (CTH) são congeladas utilizando o crioprotetor Dimetilsulfóxido (DMSO) para reduzir o risco de morte celular. Contudo, pacientes que recebem infusões de CTH congeladas com DMSO, podem apresentar efeitos colaterais como náusea, vômitos, calafrios, rigidez, e eventos cardiovasculares como bradicardia e hipotensão, causados devido à toxicidade desta substância. Com o intuito de prevenir manifestações clínicas indesejadas, a concentração de DMSO do meio de congelamento utilizado pela instituição foi reduzida de 10% para 5%. Outra medida realizada para redução de efeitos colaterais foi a implementação de lavagem de células pós-descongelamento para retirada de DMSO, metodologia descrita por Pablo Rubinstein. **Objetivo:** Comparar resultados quanto à recuperação da viabilidade e do CD34 e pega do enxerto de células congeladas em meio DMSO a 10% e 5%. **Materiais e métodos:** O Instituto Pasquini de Hemoterapia e Hematologia S/S Ltda. realizou no ano de 2017 146 transplantes de CTH, foram analisados dados relacionados a 20 TCTH Autólogos, sendo 10 congelados em DMSO a 10% e a outra metade em DMSO a 5%. **Dados analisados:** Recuperação nos índices de quantidade e viabilidade de CD34 pós-descongelamento e tratamento; pega leucocitária e plaquetária do enxerto. **Resultados:** A média de recuperação celular obtida nas CTH em DMSO a 5% foi 88,71% e no grupo em DMSO a 10% foi 84,08%. Quanto ao rendimento de viabilidade foram obtidos resultados de 97,17% para CTH em DMSO a 10% e 97,12 para CTH em DMSO a 5%. A pega plaquetária das CTH em DMSO a 5% ocorreu entre o décimo e décimo quinto dia pós-TCTH, e a pega leucocitária entre o nono e décimo primeiro dia pós-TCTH. O grupo de receptores de CTH em DMSO a 10% apresentou pega plaquetária entre o décimo primeiro e vigésimo dia pós-TCTH, e pega leucocitária entre o oitavo e décimo segundo dia pós-TCTH. **Discussão:** Pode se observar a semelhança entre as recuperações na viabilidade e quantidade de CD34 em células congeladas em ambas as concentrações de DMSO. Constatou-se também um discreto aumento quanto ao rendimento celular e leve redução no tempo de pega plaquetária e leucocitária no grupo de CTH em DMSO a 5%, sugerindo que a utilização de DMSO na concentração a 5% não interfere na proteção celular e melhora a eficácia do enxerto. **Conclusão:** As diferenças encontradas nos dados relativos às concentrações de DMSO a 5% e 10% não foram significativas, logo a execução desta técnica se torna interessante por não interferir na qualidade do enxerto beneficiando o receptor com uma menor exposição da substância crioprotetora.

1225 AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE DESCONGELAMENTO A SECO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS DE SANGUE PERIFÉRICO (CPHSP) CRIOPRESERVADAS

Battaglini RP, Alexandre W, Costa SSM, Langhi DM

BIOTEC Processamento do Sangue, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: As células progenitoras hematopoéticas representam chance de cura real para pacientes submetidos a transplante de medula óssea. Podem ser criopreservadas e armazenadas por longos períodos de tempo. O descongelamento dessas células é realizado habitualmente em equipamento Banho-Maria, podendo ainda ser realizado a seco em equipamento específico (Barkey Plasmatherm), o que representaria uma alternativa com possíveis vantagens em relação ao Banho-Maria. **Objetivo:** Avaliar procedimento de descongelamento a seco de CPHSP utilizando equipamento descongelador Barkey Plasmatherm em comparação com método tradicional com equipamento Banho-Maria. **Materiais e métodos:** Foram submetidas ao procedimento de descongelamento a seco células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico, criopreservadas com DMSO 5% e

armazenadas em freezer mecânico a -80°C, de pacientes que foram a óbito e cujo material seria descartado, após termo de consentimento e de acordo com a legislação vigente. Foram avaliadas oito bolsas de CPHSP criopreservadas, que foram pareadas para descongelamento a seco e descongelamento em Banho-Maria, tendo sido utilizadas amostras pareadas do mesmo paciente e da mesma coleta, com volumes e concentrações celulares semelhantes e submetidas ao mesmo procedimento de criopreservação e armazenadas por período de tempo que variou de 7 a 8 anos. O descongelamento foi realizado alternadamente pelos dois métodos com registros do tempo e da temperatura necessários para os descongelamentos. O equipamento Banho-Maria foi programado para manter temperatura constante a 37°C, bem como o equipamento Barkey Plasmatherm, nunca tendo sido atingida temperatura superior a esta em ambos. O tempo de descongelamento no equipamento Banho-Maria foi de 5 a 6 minutos, e no equipamento Barkey Plasmatherm foi ajustado para 5 minutos – em algumas amostras foi de 6 minutos, de forma pareada com a amostra correspondente do Banho-Maria. Imediatamente após o descongelamento, amostras dos produtos foram coletadas para avaliação da viabilidade celular através de método de coloração por *Tripán Blue* 0,4%. **Resultados:** A viabilidade celular obtida dos produtos descongelados no Banho-Maria variou de 73% a 91% (mediana 87%) e no equipamento Barkey Plasmatherm de 78% a 93% (mediana 86%). A viabilidade inicial destes mesmos produtos antes da criopreservação variava de 92% a 95%, uma diminuição de 1% a 20,6% na viabilidade celular em um período de 7 a 8 anos de armazenamento em freezer mecânico a -80°C. **Discussão:** O equipamento de descongelamento a seco Barkey Plasmatherm foi utilizado para descongelamento de produtos CPHSP criopreservados em comparação com o método tradicional utilizando o Banho-Maria a 37°C e apresentou desempenho semelhante, tanto em relação à temperatura atingida, tempo de descongelamento e viabilidade celular, sendo de fácil operacionalidade e manuseio. Além disso, o procedimento a seco apresenta o benefício teórico de menor taxa de contaminação bacteriana em relação ao equipamento de Banho-Maria, conforme relatado em literatura científica. **Conclusão:** O equipamento de descongelamento a seco Barkey Plasmatherm apresentou-se como alternativa segura e eficiente para o procedimento de descongelamento de CPHSP criopreservados, com desempenho semelhante à do equipamento tradicional de Banho-Maria.

1226 NOVA PROPOSTA TERAPÊUTICA PARA OSTEONECROSE DE CABEÇA DE FÊMUR EM PACIENTES FALCÊMICOS USANDO CULTIVO DE CÉLULAS MESEQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA

Miranda GD, Barbosa LR, Lombardi MF, Takamori ER, Borojevic R, Carias RBV

Faculdade de Medicina de Petrópolis, Petrópolis, RJ, Brasil

Objetivo: Propor um novo tratamento para a osteonecrose de cabeça de fêmur em pacientes falcêmicos (Ficat I-II), visando a simplificar a intervenção cirúrgica e garantir o resultado clínico. **Materiais e métodos:** Análise das opções terapêuticas atuais, comparadas com as potências propostas de manipulação *in vitro* de células mesenquimais autólogas, para a injeção em regiões necrosadas da cabeça de fêmur em pacientes falcêmicos. Elaboração de uma nova proposta terapêutica. **Resultados:** A osteonecrose falcêmica da cabeça de fêmur, caracterizada como "avascular", é típica do fim de adolescência, quando o disco cartilaginoso epifisário ainda dificulta a vascularização do tecido ósseo espongiado. O suprimento de sangue depende das artérias subinováias superiores, tributárias das artérias laterais circunflexas da coxa, cujos ramos não podem ainda penetrar no tecido espongiado epifisário, sendo substituídas pela microvasculatura sensível à obstrução pelos trombos falcêmicos. A terapia deve ser assim essencialmente dirigida à regeneração vascular. Diversos estudos clínicos mostram que a introdução no tecido em necrose de células autólogas, derivadas da medula óssea, pode reverter o quadro clínico de forma duradora e definitiva. Progenitores endoteliais e células mesenquimais são aparentemente os mediadores desse processo regenerativo. Ambas as categorias celulares são raras nos aspirados da medula óssea e nossos estudos mostraram que nos casos mais graves da doença falcêmica esses números são ainda menores. A quantidade do aspirado medular deve ser alta para atender a demanda, necessitando uma intervenção cirúrgica agressiva que antecede a principal. A

separação da fração total de células mononucleares pode ser realizada nos sistemas fechados no centro cirúrgico, com alto custo e baixo rendimento. A proposta alternativa é colher um aspirado mínimo da medula óssea do paciente, que pode ser realizado antecipadamente num contexto ambulatorial. As células serão submetidas em seguida à expansão *in vitro*, no contexto de um Centro de Processamento Celular, em condições adequadas para expandir as células requeridas. Atingindo a quantidade desejada, as células podem ser transferidas diretamente no centro cirúrgico para a aplicação programada. **Discussão:** O objetivo racional da terapia proposta é introduzir na lesão a quantidade e a qualidade de células requeridas para uma revascularização do tecido ósseo que passa pelo processo de necrose avascular. A atual tecnologia de manipulação *in vitro* de células destinadas à terapia regenerativa permite obter o número requerido de células independentemente da quantidade disponível no tecido doador do paciente, num contexto programável e previsível. Além disso, é possível induzir a ativação de células no sentido desejado para a terapia a ser aplicada. Podemos propor o cultivo e a expansão de células na presença dos fatores de crescimento pro-angiogênicos. Nosso grupo tem a experiência consolidada com o uso dos derivados de plaquetas. Alternativamente, na fase final do cultivo de células, as condições de cultivo podem ser modificadas pela hipóxia, induzindo nas células a serem implantadas uma resposta estimuladora de angiogênese *in situ*. **Conclusão:** Este estudo propõe uma melhora na terapia regenerativa da necrose avascular da cabeça de fêmur em pacientes falcêmicos, visando à simplificação e encurtamento do procedimento cirúrgico, e obtenção de resultados mais confiáveis.

1227 TECNOLOGIA CRISPR/CAS9 COMO MODULAÇÃO TERAPÊUTICA NA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Silva PASR, Melo AS, Juvenale M

Centro Universitário São Camilo, São Paulo, SP, Brasil

Objetivos: O objetivo foi realizar uma breve revisão acima dos aspectos fisiopatogênicos da Leucemia Mieloide Crônica e sobre a técnica CRISPR/Cas9, além de analisar três artigos que pesquisaram abordagens terapêuticas que utilizam a técnica CRISPR/Cas9 para o tratamento de LMC. **Material e métodos:** Foi realizada revisão bibliográfica narrativa com abordagem qualitativa, utilizando literatura básica, como livros e literatura específica em artigos científicos. **Resultados:** A leucemia mieloide crônica é uma doença mieloproliferativa causada por translocação entre os cromossomos 9(q34) e 22(q11) que leva à formação de um gene denominado BCR-ABL, transcrito em um RNAm que irá formar a proteína BCR-ABL, uma enzima com atividade tirosina quinase indutora de proliferação celular. A doença tem três fases (crônica, acelerada e blástica), que podem ocorrer de forma não sequencial em casos diferentes, variando os perfis de história natural, alterando sua abordagem terapêutica, cuja eficácia pode variar de acordo com a fase. O tratamento usual se baseia em uso inibidores da tirosina quinase, citocina, quimioterapia e TCTH. Dados os problemas relacionados à eficácia de tratamentos convencionais e à dificuldade de se realizar um TCTH alogênico, novas medidas terapêuticas devem ser desenvolvidas para possibilitar melhor prognóstico em LMC. Novas técnicas de modulação genética, como o sistema CRISPR/Cas9, são alternativas para possibilitar mudanças no quadro atual de terapias para LMC. O sistema se baseia no uso de endonucleases associadas a moléculas de RNA com especificidade para remover sequências gênicas de células, inclusive humanas, sendo usadas na pesquisa de terapia gênica em ampla gama de doenças, como doenças onco-hematológicas. Três estudos analisam o uso da técnica em modelos de LMC. O primeiro analisou a eficiência da clivagem do gene BCR-ABL para reduzir a carga tumoral em modelos murinos. Observaram que células dependentes de produtos do gene BCR-ABL tiveram depleção das taxas de proliferação, indicando eficiência da técnica. Outro estudo usou a técnica para reverter uma mutação no gene ASXL1, um supressor tumoral que se encontra inativado em células de LMC. A reversão da mutação, junto da recuperação da expressão apresentou correlação positiva com taxas de morte de células de LMC. O último estudo associou CRISPR a nanopartículas que adentram as células. Neste, sgRNAs que se anelam a regiões do gene BCR-ABL clivaram tais regiões, poupando genes BCR e ABL de células normais, diminuindo viabilidade celular, sobrevivabilidade e proliferação das células leucêmicas, aumentando a sobrevivabilidade dos modelos murinos.

Discussão: Apesar da eficiência apresentada, apenas esses foram publicados até o momento. Tendo isso em vista, é difícil dizer se a técnica poderá ser utilizada em abordagem clínica. Dificuldades como clivagem inespecífica e mutações consequenciais observadas em outros estudos com a técnica também são vistas nestes três estudos. **Conclusão:** O uso do sistema CRISPR/Cas9 pode ser alternativa futura para o tratamento da LMC. Por mais que as pesquisas relacionadas ao tratamento de doenças como a LMC se apresentem como eficientes para o tratamento de modelos murinos ou celulares, a instabilidade do próprio sistema, dificuldade de manipulação e escassez de dados fazem com que a aplicação da técnica não seja viável atualmente.

1228 NK CELLS ENGINEERED WITH A CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR TARGETING CD19

Silvestre RN^a, Mizukami A^a, Pereira MSF^a, Fantacini DMC^a, Vaz LD^a, Moco PD^a, Farias KCRM^b, Antonietto KS^b, Covas DT^a, Castro VP^a

^a Hemocentro de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

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

Goals: Chimeric antigen receptors (CARs) have been used to redirect the specificity of autologous T cells against leukemia and lymphoma with promising clinical results. Extending this approach to allogeneic T cells is problematic as they carry a significant risk of graft-versus-host disease (GvHD). Natural killer (NK) cells are highly cytotoxic effectors, killing their targets in a non-antigen-specific manner without causing GvHD. NK cells offer an allogeneic and off-the-shelf source of cells for immunotherapy. NK-92 cell line is an attractive alternative to donor's primary NK cells, since it can be propagated and expanded *in vitro* more easily. Therefore, the objective of this work was to genetically modify NK-92 using second-generation CAR anti-CD19 and to evaluate the potential of these cells to efficiently kill CD19-expressing cell lines. **Material and methods:** The lentiviral vector used in this work contains a single-chain variable fragment for recognition of CD19 derived from the murine antibody and the co-stimulation domain 4-1BB. Transduction was performed on NK-92 cells in RPMI medium and under different conditions: 1) with 10% Fetal bovine Serum (FBS) and without polybrene; 2) with FBS, with polybrene (8 ug/mL); 3) without FBS, without polybrene; and 4) without FBS and with polybrene. Multiplicity of Infection (MOI) of 5 and MOI of 10 were used. After 48 hours, the transduction efficiency was evaluated by flow cytometry using F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG (H+L) antibody (CAR Ab). **Results:** The transduction efficiency of NK-92 cells at MOI concentration of 5 at conditions 1, 2, 3, and 4 was 5%, 26.5%, 16%, and 50.5%, respectively. For MOI of 10 in condition 1 12.5% transduction rate was obtained; in 2, 30%; and in conditions 3 and 4, 43.7% and 53.3%, respectively. Comparing all conditions there was better transduction efficiency in condition 4 using MOI of 10. In addition to transduction efficiency, we evaluated the maintenance of anti-CD19 CAR expression and cell viability for 7 days in culture. CAR expression did not remain constant. In both MOI of 5 and MOI of 10, cell viability in condition 1 was higher than in other conditions, but it had the lowest efficiency of transduction. In MOI of 10, it was possible to observe a lower viability in transduced cells with more efficiency. **Discussion:** Comparing MOI of 5 and MOI of 10, we noticed a higher transduction rate with MOI of 10. Culture without FBS increased the transduction efficiency with the MOI of 5 and 10. FBS contains albumin, which negatively interacts with our lentivirus, limiting its ability to interact with cellular receptors/membrane. Polybrene improves the efficiency of transduction under all conditions. Importantly, the addition of positively-charged polycations such as polybrene, DEAE-dextran and others reduces the repulsion forces between the cell and the virus and mediates the binding of lentiviral particle to the cell surface, resulting in a higher efficiency of transduction. **Conclusions:** Based on our results, NK-92 cells can be transduced with the CAR, especially in the absence of FBS and addition of polybrene reagent, conditions that increase the cell transduction efficiency. However, it is still necessary to culture CAR-NK-anti-CD19 cells in a more appropriate manner to maintain CAR expression. Thus, other culture conditions (for example with IL-15) are being tested to expand these cells *in vitro* and assess their antitumor potential.

1229 PRODUÇÃO E RESPOSTA DE LINFÓCITOS T CD8⁺ POR ESTÍMULO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS FUSIONADAS COM PLASMÓCITOS DO MIELOMA MÚLTIPLO E DA IL-15

Barbosa MES^a, Lima TS^b, Machado BL^a, Maiolino A^a, Rossi MID^a, Jesus EFO^a, Nogueira CM^a, Magalhães R^a, Porto LC^c, Dutra HDS^a

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

^b Faculdades São José, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^c Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: O Mieloma Múltiplo é uma neoplasia hematológica decorrente da expansão de plasmócitos na medula óssea e mesmo com os tratamentos já existentes, ainda não tem cura. Recentemente, foi observado que a imunoterapia, que faz uso de células dendríticas fusionadas com plasmócitos, pode promover uma resposta antitumoral. Propomos neste trabalho um modelo “in vitro” para estudo das propriedades de estimulação linfocitária por células dendríticas fusionadas com plasmócitos. **Objetivo Geral:** Estudar a imunobiologia de células dendríticas fusionadas com plasmócitos do Mieloma Múltiplo e a resposta de linfócitos T CD8⁺. **Metodologia:** As células dendríticas obtidas “in vitro” por diferenciação de monócitos do sangue de doadores saudáveis foram fusionadas com plasmócitos (linhagem RPMI 8226). Antes de realizar a fusão, a linhagem RPMI 8226 foi marcada com FAR RED e as células dendríticas com CFSE. Após a fusão, as células foram irradiadas com 25 Gy. Para concentrar as células fusionadas (DF) e não fusionadas (DNF) foi feita uma seleção celular por citometria de fluxo. Estas células foram cocultivadas, durante cinco dias, com linfócitos T CD8⁺ autôgenos em placas de 96 poços com 200 µL de meio de cultura. No quinto dia de cultivo foi adicionada a IL-15 para a expansão dos linfócitos respondedores por 12 dias adicionais. Esses linfócitos foram quantificados, fenotipados e submetidos ao ensaio de citotoxicidade contra células da linhagem RPMI 8226 nas proporções de 1:1 – 20:1 (linfócito:célula tumoral). **Resultados:** A taxa de fusão das células dendríticas com a linhagem celular RPMI 8226 foi de 4,2-19,0% e o grau de pureza pós-seleção foi até 91%. A produção de linfócitos T CD8⁺ foi maior nas culturas que tiveram estímulo por DF do que por DNF – 4,77 x 10⁴/poço e 1,94 x 10⁴/poço, respectivamente (p < 0,0253). Esta produção foi semelhante para os linfócitos T com o fenótipo CD8⁺/CD314⁺, CD8⁺/CD314⁺/CD56⁺, CD3⁺/Perforina⁺, CD3⁺/Granzima B⁺ e CD3⁺/Interferon-gamma⁺. No teste de citotoxicidade os linfócitos mantidos com DF proporcionaram uma taxa de mortalidade dos plasmócitos (RPMI 8226) chegando a 78,2% na proporção de 20 linfócitos:1 célula tumoral enquanto que o estímulo por DNF manteve a taxa de mortalidade basal da linhagem celular 33,0% em todas as proporções avaliadas. **Discussão:** A literatura revela uma média de 18-52% de eficiência de fusão. A presença de uma alta taxa de células dendríticas não fusionadas poderia interferir na interpretação da resposta linfocitária; para solucionar essa variável em nossos experimentos, propomos concentrar as células fusionadas. Hayashi, T. et al. (2003), mostraram a citotoxicidade de CTLs induzidos por estimulação com DCs com corpos apoptóticos primários de MM de HLA-A2-positivos contra células de MM autólogas. Em nosso trabalho, o HLA da célula DC e do linfócito não era o mesmo da linhagem tumoral, não reproduzindo o trabalho da literatura citada, porém, por esse HLA ser diferente temos uma estimulação alogênica, produzindo uma maior proliferação e também uma resposta significativa de citotoxicidade. **Conclusão:** A partir desses resultados foi possível demonstrar pela primeira vez num modelo “in vitro” que células dendríticas fusionadas e concentradas por citometria de fluxo podem promover a expansão de linfócitos T CD8⁺ antiplasmócitos do mieloma múltiplo.

1230 PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY WITH SPECIFIC RECOGNITION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL ANTIGENS (IL-1RA)

Inácio JC, Deffune E, Neto FVO

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

A research in Cellular Biology, depending on laboratory techniques that are used to study a cellular structure and function. Important advances in the understanding of cells are succeeded directly in the development of new techniques, allowing new means of investigation.

A major innovation in the biotechnology industry and a production of monoclonal antibodies that are of paramount importance in the medical field. All cells of the organism are a set of surface markers that characterize a biological singularity and a mark of the cells that are contained. However, as mesenchymal stem cells (MSCs) are known as specific immunophenotypic markers, their characterization is defined by the identification of a profile of specific and nonspecific markers. This immunophenotyping is performed using monoclonal antibodies that recognize the surface antigens of the cell membrane, as demonstrated in contemporary studies. In view of the non-market absence of rapid tests for the identification of CTM-TA, we chose to outline a project that develops the diagnostic tool by exploring its potential for use, characterizing the monoclonal antibodies previously produced from mesenchymal stem cells human adipose tissue using Western blot and Flow Cytometry techniques with subsequent proteomic analysis to identify their specificity in a validation and innovation process with a biosensor proposal for rapid testing, with specialization in plastic surgeries and recovery of data of CTM for automatic application. The immunological profile of the clone studied by the results of CBA Assay and Western blotting confirms an IgG1 mAb with molecular weight of 55 kDa. A proteomic analysis indicated the characterization of CTMh3 - 98 A17 mAb with an IL-1Ra membrane antigen-specific recognition profile, confirmed with a high positivity against rare cell populations previously phenotyped with high expression index for a protein. By recognizing a protein expressed in isolated human cell populations but also known for the high expression rate in autoimmune diseases and inflammatory processes, the mAb can be applied in the therapy as a blocker in IL-1ra and for diagnostic purposes as an immunological marker. Further studies confirmed the therapeutic applicability. The patent for the characterization of the anti-IL-1ra mAb (CD121a) mAb was requested with specific recognition for human cells with no interspecies crossing at AUIN and concluded on October 27, 2017 – this product is the property of its inventors, supported by the legal rights of the National Institute of Industrial Property – INPI through ID: 17CI085.

1231 ANTI-CD19 CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR-MODIFIED T CELLS FOR B-CELL MALIGNANCIES: THE DEVELOPMENT OF A NATIONAL PLATFORM

Picanco-Castro V^a, Moco P^a, Mizukami A^a, Vaz LD^a, Pereira M^a, Bomfim A^a, Antonietto KS^b, Farias KCRM^b, Covas DT^a

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

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

Goals: Adoptive transfer of T cells expressing a CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR) has been evaluated in multiple clinical trials. CAR recognizes cell-surface tumor-associated antigen without depending on the histocompatibility complex and employs one or more signaling molecules to activate genetically modified T cells for killing, proliferate, and produce cytokines. Targeting CD19 can be achieved through the enforced expression of a CAR that directly recognizes CD19. Our current approach to adoptive immunotherapy is based on a second-generation CAR (designated CD19.41BB) that signals through 4-1BB and CD3- endodomain. Our goal is to develop a national reproducible manufacturing platform of high-quality, cost-effective and clinical-grade CAR-T cell product. **Methods:** The lentiviral vector encoding CAR19.41BB was produced by transient transfection of HEK293T cells. Harvested pelleted lentiviral supernatants were stored at -80°C. Mononuclear cells were obtained from leukoreduction filters used for apheresis platelet donors. The T cells were isolated by magnetic selection and activated with anti-CD3/CD28 magnetic beads in a 1:1 ratio (cells:beads). On the next day, the cells were transduced with lentiviral vector CAR anti-CD19 (MOI 5) and cultivated in RPMI 10% of AB human serum, 100 IU/mL IL-2 in static T-flasks. After 48h, the transduction efficiency was evaluated by flow cytometry using anti-F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG antibody (CAR Ab). To assess cytotoxicity, CAR-transduced cells were cocultured with Sup-B15 (CD19⁺) and K562 (CD19⁻) at multiple E:T ratios; cytotoxicity was measured by LDH release and by flow cytometry. To evaluate the persistence and antitumor effect of CAR-transduced cells in vivo we used a NOD/SCID IL-2R null (NSG)

xenograft model, with the aggressive Raji cell line. **Results and Discussion:** We developed an efficient platform for lentiviral production. Transient transfection of HEK293T cells with plasmids at a 3:1:1:1 ratio (transgene: gag-pol:VSV-G:rev) using cationic liposomes and 5 mM sodium butyrate resulted in the highest viral titers ($1.54 \pm 0.40 \times 10^8$ TU/mL). The lentiviruses were used to transduce the isolated and activated T cells. After two days, the percentage of T cells expressing CAR was $20 \pm 5.3\%$ and at the end of cell expansion process we obtained $70 \pm 10.2\%$ of T cells expressing CAR. The CAR-T cells were expanded in static T-flasks for 13 days resulting in a production of $1,300 \pm 56.3 \times 10^6$ T cells. For patients, the recommended dose is 10^6 CAR-T cells/kg, so the number of expanded cells in our lab ($1,000 \times 10^6$ cells) is sufficient for 12 infusions (patient with 80 kg). We also evaluated the cytolytic potential of CD19CAR-T cells produced by coculturing with B-cell lines Sup-B15 (CD19+) and LAMA-84 (CD19-). A ratio of 10:1 (E:T) cells was used and our results showed that CD19CAR-T cells are functionally active and highly specific, showing cytotoxic activity against CD19+ B-cells only. Finally, to access CD19CAR-T antitumor effect in vivo, we used Raji xenograft model. Tumor growth was monitored by measuring changes in tumor bioluminescence over time. Tumor bioluminescence increased rapidly in mice treated with PBS. By contrast, infusion of CD19CAR-T cells led to improved tumor control and significant prolongation of mouse survival. **Conclusion:** We have developed a platform to produce CD19CAR-T cells that show striking efficacy both in vitro and in vivo.

1232 ESTABLISHMENT OF A PRECLINICAL MODEL OF BURKITT'S LYMPHOMA: EVALUATING EFFICACY OF CAR-T-CD19 CELLS

Pereira MSF^a, Moço PD^a, Vaz LD^a, Fantacini DMC^a, Mizukami A^a, Farias KM^b, Swiech K^b, Castro VP^a, Covas DT^a

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

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

Goals: Immunotherapy has emerged as an important tool to help fight cancer, in special, Chimeric Antigen Receptor (CAR) -engineered T cells. CARs are engineered immune receptors that contain antigen-binding domains, commonly single-chain variable fragments (scFvs), with T cell signaling domains to endow T cells with specificity for cell surface antigens independent of the MHC complex. Lately, many trials have showed impressive activity of CAR-T-CD19 cells against B cell malignancies generated significant potential for the treatment of patients with chemotherapy-refractory acute leukemia and solid tumors. In order to achieve the best results in clinical trials, preclinical models' establishment is a crucial step in evaluating CAR-T treatment. Our goal is to develop a preclinical model for Burkitt's Lymphoma to evaluate the efficiency of CAR-T-CD19. **Methods:** To evaluate the persistence and antitumor effect of CAR-transduced cells in vivo we used a NOD/SCID IL-2R null (NSG) xenograft model, with the aggressive Raji cell line. Mice were injected with 5×10^5 or 5×10^6 Raji-Luc2 cell at day 0 (intravenously [i.v] or subcutaneous, respectively), and tumor growth was monitored by measuring changes in tumor bioluminescence over time by IVIS Lumina System. Mouse experiments were performed in accordance with recommendations under protocols approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation. **Results and Discussion:** Mice were injected with 5×10^6 Raji-Luc2 cell subcutaneously at day 0. After 11 days, each mouse received PBS or CAR-T-CD19 cells. Tumor bioluminescence increased rapidly; in contrast, tumor mass in mouse infused with CAR-T-CD19 cells were $0.32 \text{ g} \pm 0.4$ compared with PBS 1.98 ± 0.42 . For the systemic model, NSG mice were injected with 5×10^5 Raji-Luc2 cell via tail vein injection (i.v) at day 0. Seven days later, the mice received PBS or CAR-T-CD19 cells and tumor growth was monitored by measuring changes in tumor bioluminescence over time by IVIS Lumina System. Tumor bioluminescence increased rapidly within the group treated with PBS; all untreated mice died within 29 days. On the other hand, infusion of CAR-T-CD19 cells led to improved tumor control and significant prolongation of mice survival of a median 25 extra days. **Conclusion:** We have developed a model to evaluate efficacy of CAR-T-CD19 cells in a preclinical model of Burkitt's lymphoma in vivo.

1233 ALTERAÇÕES TRANSCRICIONAIS ASSOCIADAS À CONVERSÃO ENTRE OS ESTADOS DE PLURIPOTÊNCIA PRIMED/NAIVE EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANA PROMOVIDAS PELA DA INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO DE NOTCH

Corveloni AC^{a,b}, Schiavinato JLD^{a,b}, Lima IMS^{a,b}, Panepucci RA^{a,b}

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

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular, Centro de Terapia Celular, Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Durante o desenvolvimento, células-tronco embrionárias (ESC) derivadas do epiblasto do blastocisto pré-implantação encontram-se em um estado de pluripotência Naive, sem tendência de diferenciação para qualquer linhagem, em contraste com ESCs humanas (hESCs) Primed, derivadas de óocitos fertilizados *in vitro*. ESCs Naives são molecularmente caracterizadas por: alta expressão de fatores de transcrição pluripotentes, como OCT4, KLF4 e REX1 (que mantém ambos os cromossomos X ativos em células femininas), e DPPA3/STELLA (que promove a desmetilação passiva global do DNA inibindo DNMTs). Nosso grupo mostrou recentemente que o miR-363 promove a pluripotência em hESCs por inibição pós-transcricional dos componentes de sinalização da via Notch, incluindo os receptores NOTCH1/2 e a gama-secretase mediando sua ativação. É importante ressaltar que ambos os receptores foram recentemente identificados como marcadores de superfície especificamente associados com células-tronco embrionárias humanas no estado Naive. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar as alterações transcricionais resultantes da inibição da sinalização de Notch (pelo inibidor da gama-secretase DAPT) em relação a marcadores de um estado Naive. Para isto, hESCs da linhagem H9 Primed do sexo feminino foram cultivadas em condição *feeder-free* (n = 4), na presença ou ausência de DAPT (2 μm) ao longo de 6 passagens (22 dias). O estado de pluripotência dessas células foi analisado através do ensaio de qPCR, avaliando a expressão dos fatores de transcrição pluripotentes e marcadores do estado Naive, e de microscopia de fluorescência, sendo as células fixadas, permeabilizadas e coradas com Hoechst/CellMask Blue (núcleo/citoplasma), anti-OCT4 (marcador de pluripotência), anti-Ciclina B1 (marcador do ciclo celular) e fotografadas com ImageXpress Micro HCA System. Foi verificado um aumento no número de células cultivadas com DAPT, acompanhado de uma elevada quantidade de células OCT4 positivas, em relação ao controle (DMSO), dado que se encontra de acordo com a literatura, onde a inibição de Notch favorece a autorrenovação em hESCs. Contrário às expectativas, não foi observado redução significativa nos transcritos de NOTCH1/2, porém houve diminuição dos níveis de HEY1, um dos principais genes efetores de Notch. Além disso, não foi constatada nenhuma alteração expressiva na modulação dos fatores de pluripotência (OCT, KLF4, REX1), nem sobre os genes das DNMT3A/B, entretanto, houve um aumento significativo (p < 0,05) nos níveis de DPPA3/STELLA, importante marcador de pluripotência Naive. Atualmente, diversos estudos investigam métodos eficazes para o processo de reversão dos estados Primed para Naive, explorando associações de diversas moléculas que atuam em diferentes vias de sinalização (LIF, MEK, GSK3, PKC, p38/MAPK, FGF). Considerando que nosso trabalho teve o intuito de verificar o papel de uma única via (Notch) e resultou no aumento da expressão de um gene de alta relevância nesta conversão Primed/Naive, nossos resultados preliminares sugerem que a inibição de Notch está de fato diretamente envolvida neste processo de transição, resultado este com importante implicação futura na medicina regenerativa.

1234 CÉLULAS NATURAL KILLER: MECANISMOS ANTITUMORAIS E BREVES CONSIDERAÇÕES SOBRE IMUNOTERAPIA EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Yamamoto LH^a, Juvenale M^b

^a Centro Universitário São Camilo, São Paulo, SP, Brasil

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

Introdução: As células natural killer (NK) são linfócitos grandes e granulares, diferenciados dos demais devido à ausência de expressão de CD3, e por sua intensa atividade citotóxica e antitumoral. Pela função desempenhada, essas células se tornam naturalmente boas candidatas

no combate ao câncer, em especial, no tratamento de leucemia mieloide aguda (LMA) por meio da imunoterapia. Esse tema tem sido alvo de pesquisas nas últimas décadas. **Objetivos:** Compor breve revisão abordando as células *natural killer*, seus mecanismos antitumorais e seu uso na imunoterapia para o tratamento da LMA. **Métodos:** Revisão bibliográfica da literatura realizada em livros e bases de dados Medline (PubMed), LILACS e Cochrane Library. **Desenvolvimento:** Os mecanismos de ação das células NK resultam de um equilíbrio de sinais transmitidos por meio dos receptores inibitórios ou ativadores presentes nas suas membranas. Entre os diferentes tipos de receptores, os pertencentes às famílias CTLR e KIR reconhecem as moléculas de HLA, baseando-se na hipótese do *missing self*, no qual a célula NK é capaz de identificar células transformadas, infectadas por vírus ou potencialmente tumorais por meio da ausência de expressão ou expressão incompleta de moléculas do MHC-I. Quando ocorre esse reconhecimento, os receptores ativadores estimulam a atividade lítica e secreção de citocinas em direção à célula alvo. A célula NK também apresenta atividade antitumoral, exercida por meio de mAbs (*tumor-targeting monoclonal antibody*) que levam à degradação; e por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como INF- γ , que possui funções imunomodulatórias. O tratamento convencional contra LMA possui como desvantagens inúmeros efeitos colaterais e, em casos de transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), a dificuldade de encontrar doadores compatíveis e altas taxas de mortalidade causada pelo desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (*graft-versus-host disease* – GVHD) tornam a terapêutica limitada. Isso tem impulsionado pesquisadores a procurar novos tratamentos que obtenham máxima ação antileucêmica, com mínimas reações adversas e GVHD. **Discussão:** A imunoterapia com células NK surge como uma estratégia alternativa, e em alguns estudos mostrou-se benéfica, viável e segura para prevenir recaídas em pacientes idosos com prognóstico ruim. Uma hipótese levantada nas pesquisas recentes é de que a incompatibilidade KIR entre os ligantes dos doadores e os receptores expressos nas células do paciente portador de LMA pode estar associada a uma maior reatividade contra as células tumorais, sugerindo que a alorreatividade das células NK do doador pode aumentar a eficácia do tratamento. Apesar dos resultados promissores, a manipulação e os processos para expansão das células *in vivo* ou *in vitro* em quantidades suficientes e altamente citotóxicas ainda é um grande desafio. **Conclusão:** A imunoterapia vem sendo estudada como coadjuvante no tratamento contra LMA em conjunto com as terapias convencionais. Os resultados são promissores, porém ainda carece de padronização das técnicas e métodos para obtenção das células NK, sua expansão *in vitro* e *in vivo*, purificação, procedimentos para estimular a citotoxicidade e dosagem. Uma das maiores dificuldades é tornar o tratamento acessível devido ao alto custo em todo o processo.

Palavras-chave: Natural killer cells; Immunotherapy; Acute myeloid leukemia; Therapeutics; Cord blood stem cell transplantation.

1235 INFUSÃO DE CÉLULAS NK APÓS SEGUNDA RECAÍDA DE LMA EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL: RELATO DE CASO

Rogério DB, Feres CCP, Brisolla HRGB, Bovolenta VDA, Filho LJSM, Buccì KB

Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brasil

Um homem de 23 anos com diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda NOS M4, com t(6,9) aos 15 anos de idade, em Novembro/2010. Feito esquema de indução seguido de transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas aparentado com doador *fullmatch* em primeira remissão. Condicionamento feito com TBI e ciclofosfamida. Em Abril de 2011 apresentou recidiva de doença em Medula Óssea, sendo feito Citarabina + Mitoxantrona, seguidos de DLI. Evoluiu com normalização do mielograma, porém com importante quadro de DECH cutâneo, pulmonar e hepático com melhora apenas após associação de corticoterapia, ci-

closporina, Rituximab e Fotoaférese. Em 2014 apresentou recaída em Sistema Nervoso Central (SNC), sendo tratado com esquema FLAG + Citarabina e Radioterapia de Neuroeixo, com término em Janeiro de 2015. Em Setembro de 2017 apresentou segunda recaída em SNC (63% blastos mieloides por imunofenotipagem), DRM medular de 0,08%. Iniciado tratamento com Gemtuzumab Ozogamicin D1/D4/D7 em Outubro/2017. Reavaliação posterior do LCR evidenciou 79% de blastos mieloides e doença residual mínima (DRM) negativa em medula óssea, mantendo quimerismo 100%, sendo optado por um segundo ciclo de Gemtuzumab além de Metotrexato Intratecal. Nova coleta de liquor em Novembro de 2017, mantendo 50,7% de blastos mieloides. Medula Óssea mantendo DRM negativa. Optado pela realização de infusão de células NK. Em Dezembro/2017 apresentou rebaixamento de nível de consciência e quadro convulsivo, com melhora após anticonvulsivantes. Ressonância de crânio com extensas áreas com sinal hiperintenso em T2/FLAIR em regiões temporais mesiais, não sendo possível afastar atividade da doença de base. Iniciado protocolo de infusão de células NK em Janeiro/2018. Após 14 dias apresentou piora neurológica com sinais de hipertensão intracraniana, sendo refeito RNM crânio, com sinais de piora de edema em lesões previamente existentes, sendo tratado com corticoterapia em altas doses com importante melhora clínica. RNM Fev/2018 com redução do edema em SNC. Avaliação do LCR em Abril/2018 sem evidência de blastos. Evoluiu com Diabetes Mellitus secundário ao uso de corticoide.

1236 AVALIAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO E SOCIODEMOGRÁFICO DAS MÃES DOADORAS DO BANCO DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO PÚBLICO DO RIO GRANDE DO SUL

Sousa BSA^a, Araújo AB^b, Salton GD^b, Schmalfluss T^b, Angeli MH^b, Röhsig LM^b, Amorin B^a, Furlan JM^b

^a Centro Universitário Ritter dos Reis – UniRitter, Porto Alegre, RS, Brasil

^b Unidade de Criobiologia e Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil

Objetivo: Avaliar a soroprevalência de marcadores contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sífilis, Doença de Chagas, vírus T-linfotrófico humano (HTLV), citomegalovírus (CMV), toxoplasmose, vírus da hepatite B (HBsAg e anti-HBc) e hepatite C (HCV) e o perfil sociodemográfico de mães doadoras de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) do banco público do Rio Grande do Sul, localizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Método:** Tratou-se de um estudo transversal, onde os dados foram coletados do software BrasilCord, compilados e analisados de forma descritiva, através de média, mediana e frequências absoluta e relativa. **Resultados:** A população estudada incluiu 1.362 gestantes cadastradas no período de 2011 a 2016. A soroprevalência encontrada foi de 0,1% para HIV Ag/Ac, anti-HTLV e anti-HCV; 0,7% para anti-*Toxoplasma gondii* IgM; 0,3% para anti-*Trypanosoma cruzi* e 0,7% para anti-CMV IgM. Não houve casos positivos para sífilis e HBsAg. Os marcadores sorológicos indicadores de contato, anti-*Toxoplasma gondii* IgG, anti-CMV IgG e anti-HBc, apresentaram sorologia positiva de 47,2%, 95,7% e 1,47%, respectivamente. A faixa etária com maior prevalência de doadoras foi de 21 a 25 anos (31,6%). Observou-se que 76,5% das doadoras são da raça/cor branca; 54,3% estão empregadas e 73,7% residem em Porto Alegre. Em relação à vacinação contra a hepatite B e tétano, 53,2% e 84,8% das gestantes foram vacinadas, respectivamente. A maioria das gestantes (40,9%) apresentou um número médio de consultas pré-natal entre 7 a 9 consultas. **Conclusão:** O perfil sorológico das mães doadoras do BSCUP público do RS é compatível com dados sorológicos já descritos em outras investigações. O acompanhamento sorológico da mãe doadora de SCUP é obrigatório e de suma importância, visto a ocorrência de marcadores sorológicos positivos. Desta forma, garante-se maior segurança do material disponível para transplante de células-tronco hematopoéticas.