

criopreservadas sendo que dessas, 5 (0,31%) apresentaram abertura do sistema, sendo 3 (0,19%) por quebra do segmento e 2 (0,13%) por fratura da bolsa. Outras 2 bolsas apresentaram estruturas sugestivas de pequenos coágulos. **Discussão:** A avaliação crítica dos produtos após a criopreservação permite a identificação de produtos com risco adicional de falha de enxertia ou que precisam ser descongelados e preparados para uso no laboratório. **Conclusão:** O procedimento de análise crítica e o valor de referência adotado no nosso serviço (viabilidade por azul de tripan < 50%) são efetivos para identificar unidades de CPH-SP com necessidade de conduta adicional antes da liberação para transplante.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.699>

698

**DADOS DE PRODUÇÃO E ANÁLISE DESCritIVA DAS UNIDADES DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO COLETADAS PARA O USO CLÍNICO PELO CETEBIO – FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

P.R.M.P. Pederzoli, N.G. Cruz, J.G.S. Cézar, C.M.G. Moraes, J.S.S. Morais, R.M. Silva, A.R. Belisário, L.A. Costa, M.D.S.B.S. Furtado, R.K. Andrade, A.P.C. Funes, J.R. Luz, M.C. Martins, K.L. Prata, M.R.I.S. Libânia



Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG, Brasil

**Introdução:** A utilização das células progenitoras hematopoéticas (CPH) obtidas do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) apresenta vários benefícios para o transplante de medula óssea (TMO). Neste sentido, o Centro de Processamento Celular (CPC) do Cetebio, integrante da RedeBrasilCord, coleta, processa, criopreserva e disponibiliza CPH-SCUP com qualidade e segurança, seguindo os critérios estabelecidos na legislação brasileira e pela Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB). **Objetivo:** Foi analisar descritivamente as características das unidades de CPH-SCUP destinadas ao uso clínico, bem como os dados de produção do CPC. **Material e métodos:** Avaliou-se, retrospectivamente, os dados de unidades de CPH-SCUP obtidos entre maio 2017 e julho de 2020. **Resultados:** Neste período foram realizadas 5.450 pré-triagens. Destas gestantes, 1.316 (24%) foram abordadas, sendo realizadas 389 (30%) coletas. Os principais motivos para a não realização da coleta foram: parto na água 154 (17%); negativa materna 140 (15%); parto fora do horário de trabalho da equipe 123 (13%); inaptidão em etapas da doação ou trabalho de parto 116 (12%) e encaminhamento para cesárea 96 (10%). Os principais motivos para descarte pós-coleta foram: volume processado inferior a 70 mL (64%) e celularidade (TCN) inferior a 10×10 e 8 (11%). Das 71 unidades processadas, 61 (86%) foram através da plataforma AXP II System e 10 (14%) pela Sepax Cell Separation System. O volume médio inicial das unidades foi de 96,5 mL (71,7–165,3) e a celularidade média de 15,1×10 e 8 (6,1–28,9). O volume médio criopreservado foi de 20,8 mL (20,1–21,3). A recuperação média final de TCN foi 81,5% (54,9–96,7) e a média de células CD34+ viáveis foi 4,0×10 e 6 (0,2–12,2). Após o processamento, 41 unidades estão armazenadas e disponíveis para uso

clínico, sendo 4 destinadas ao uso aparentado. Os motivos de descarte durante ou após o processamento foram: 10 com quantificação de CD34+ inferior a 1,25×10 e 6; 5 (7%) com intercorrência no processamento ou na criopreservação; 3 (4%) com microbiológico positivo (1 *Bacillus* sp., 1 *Micrococcus luteus* e 1 *Staphylococcus epidermidis*); 3 (4%) com inaptidão clínica e 2 (3%) com sorologia reagente (1 Sífilis e 1 Anti-HBc). Sete (23%) aguardam testes de controle de qualidade. O crescimento de colônias no ensaio clonogênico pré-criopreservação foi observado em 68 (96%) unidades. A presença de hemoglobina S em heterozigose foi identificada em 5 (7%) das unidades SCUP processadas e em 8 (11%) amostras maternas. Uma bolsa foi liberada para a realização de TMO alogênico aparentado em criança com Anemia Falciforme. **Discussão:** Nossos resultados corroboram com o descrito na literatura em relação à baixa taxa de utilização e a dificuldade de se estabelecer um inventário com qualidade, em que pese o grande número de unidades descartadas pré-processamento. Além disso, o baixo número de bolsas coletadas se comparado ao o número de gestantes pré-triadas nos sinaliza que uma avaliação detalhada do perfil de atendimento da maternidade seja importante para o direcionamento das atividades do CPC. **Conclusão:** É possível avaliar que apesar do número elevado de gestantes com potencial de doação, isso não garante um inventário numeroso e de qualidade. Estes resultados podem subsidiar a tomada de decisão ao avaliar a necessidade de buscar novos serviços para captação de doação.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.700>

699

**DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR TRACKING CAR-T CELL PERSISTENCE USING QPCR AND MULTIPARAMETRIC FLOW CYTOMETRY FOR PRECLINICAL AND CLINICAL STUDIES**

L.C. Batista, H. Brand, D.M.C. Fantacini, D.T. Covas, L.E.B. Souza



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

Adoptive transfer of T-cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors (CAR) has shown > 80% complete remission rates in acute B cell leukemias. However, therapeutic efficacy is low or absent for some other hematological malignancies and solid tumors, mostly due to limited CAR-T cell persistence and functional exhaustion post transplantation. It has been reported that anti-CD19 CAR-T cells sustain complete remission of leukemia and normal B cell aplasia even when their numbers in circulation are below the limit of detection by flow cytometry (FC) and detectable only by quantitative PCR (qPCR). Thus, developing a monitoring strategy that combines high sensitivity and multiparametric immunophenotypic evaluation is essential to predict, understand and improve the clinical response to CAR-T cell therapies. In this work, we aimed at developing a platform for monitoring the persistence of CAR-T cells using multiparametric FC and qPCR. To facilitate CAR-T cell tracking by FC in preclinical models, we developed

a new lentiviral vector by cloning the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene downstream the anti-CD19 CAR gene. Lentiviral particles carrying the new construct were used to transduce primary T cells for CAR-T cell generation. FC analysis after transduction demonstrated that 44.8% of cells expressed CAR on the surface and that all CAR+ cells were also EGFP+, confirming the functionality of the new vector. Notably, the median fluorescence intensity of EGFP was 3.8-fold higher than that of CAR stained with an Alexa 647-conjugated antibody, even though this fluorophore has a high brightness index of 4. Thus, through EGFP fluorescence, this new construct allows direct CAR-T cell tracking by FC with a higher sensitivity compared to antibody staining. We next assessed the cytotoxicity of CAR19/GFP cells by coculturing them with Deep Red stained tumor cell lines either CD19+ (RAJI) or CD19- (K562) at a 1:1 effector to target ratio. After 16h of co-culture, FC data showed that CAR19/GFP cells eradicated 47% of CD19+ tumoral cells while sparing CD19- tumor cells, demonstrating that the CAR codified by this new vector is functional and CD19-specific. Lastly, we developed a CAR detection protocol based on qPCR. To that end, we designed a pair of specific primers and a probe spanning the costimulatory 4-1BB and CD3ζ domains of our anti-CD19 CAR. This primer/probe set was used to successfully detect CAR copies by qPCR in a plasmid standard curve ranging from  $10^{10}$  to 1 CAR copy. This high sensitivity was accompanied by a high linearity ( $R^2=0.99$ ) and amplification efficiency (99.7%). To simulate a molecular test for CAR-T cell detection, we added 100 ng of genomic DNA to each point of the standard curve. This led to a slight reduction of sensitivity, allowing detection of at least  $10^3$  CAR copies ( $R^2=0.99$ ; amplification efficiency = 106.8%). Combined, this data demonstrates the generation of a fully functional CAR/EGFP reporter vector and the establishment of a protocol for molecular detection of CAR-T cells with high sensitivity by qPCR. This CAR-T cell-monitoring platform will provide invaluable data in preclinical and clinical studies on CAR-T cell persistence, a parameter intrinsically linked to therapeutic efficacy. **Support:** FAPESP grants 2013/08135-2, 2019/18672-1 and 2019/18702-8.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.701>

700

**EMPREGO DE UM SISTEMA  
SEMAUTOMATIZADO PARA O ISOLAMENTO  
E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS  
MESENQUIMAIAS DE TECIDO ADIPOSO  
HUMANO**

M.A.D.S. Souza<sup>a</sup>, J.A.R. Fracasso<sup>b</sup>, L.F. Marques<sup>c</sup>, M.J. Malagutti-Ferreira<sup>a</sup>, F. Freddi-Rodriguez<sup>a</sup>, J.T. Ribeiro-Paes<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Assis, SP, Brasil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista (UNIP), Assis, SP, Brasil



<sup>c</sup> Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

O emprego de células estromais mesenquimais (MSC) tem sido considerado como uma alternativa terapêutica promissora em diversos estudos pré-clínicos e clínicos. Neste contexto, o tecido adiposo tem se destacado como uma das mais importantes fontes de MSC. Há uma série de propriedades que fazem do tecido adiposo uma alternativa altamente exequível e eficiente para obtenção, isolamento e proliferação de MSC, entre as quais vale ressaltar a abundância de material disponível, que pode ser obtido do próprio paciente (autólogo), em procedimentos pouco invasivos e diferenciação multipotencial (osteócitos, condróцитos e adipócitos). Em função destes aspectos, as células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) têm adquirido um papel relevante para a medicina regenerativa e translacional. Ao longo dos anos um grande número de variantes metodológicas têm sido propostas para isolamento e proliferação de ADSC. Mais recentemente têm sido testados diversos sistemas automatizados e semiautomatizados de diferentes fabricantes para isolamento da SVF e posterior proliferação das ADSC. Neste contexto, pretendeu-se com este projeto realizar uma análise comparativa quanto à eficiência e capacidade proliferativa de ADSC, empregando-se a metodologia convencional ou clássica e metodologia semiautomatizada usando o aparato Kiso Processor, (Keai Bioresearch Inc., Vancouver, Canadá). Foram, também, realizadas análises comparativas quanto à viabilidade, proliferação celular e manutenção dos atributos celulares das ADSC resultantes dos procedimentos de obtenção por convencional e semiautomatizada. Além disso, foram feitas análises qualitativas quanto à capacidade de diferenciação das ADSC *in vitro*, bem como, empregou-se, também, citometria de fluxo para caracterização imunofenotípica, para determinação quantitativa de marcadores抗原性的 de superfície (CD) nas células cultivadas até a 5<sup>a</sup> passagem. Os resultados permitiram estabelecer um protocolo eficiente e reprodutível para extração e proliferação de ADSC para o método semiautomatizado. Este sistema também apresentou, em relação à metodologia convencional, uma redução significativa no tempo de isolamento da fração estromal vascular, bem como menor manipulação das amostras, por ser um sistema fechado e, consequentemente, apresenta, potencialmente, menos risco de contaminação das amostras. Tanto nos sistemas convencional quanto no semiautomatizado foram mantidos os atributos celulares, como marcadores de superfície característicos de MSC e capacidade de diferenciação *in vitro*, permitindo a validação da natureza mesenquimal das células obtidas pelos dois métodos de isolamento. Não se obteve, no entanto, diferença quanto à viabilidade e capacidade proliferativa das ADSC entre convencional e semiautomatizado. Apesar das citadas vantagens apresentadas pelo sistema semiautomatizado, a partir dos resultados obtidos não foi possível validar a hipótese formulada e que orientou o desenvolvimento deste projeto, qual seja, que o sistema semiautomatizado (Kiso), representaria uma alternativa vantajosa em relação ao método convencional no que concerne a maior viabilidade e potencial proliferativo das ADSC.