

^c *In Situ Terapia Celular, Ribeirão Preto, SP, Brasil*

Introdução: As úlceras cutâneas crônicas representam um importante fardo clínico para pacientes com anemia falciforme (SCD), condição caracterizada por inflamação sistêmica, disfunção endotelial e comprometimento da cicatrização. Terapias convencionais frequentemente falham em promover resolução completa, resultando em redução da qualidade de vida e aumento dos custos em saúde. As células estromais mesenquimais (MSCs) apresentam potencial promissor na medicina regenerativa; entretanto, sua eficácia terapêutica é limitada pela baixa sobrevivência e função no microambiente das feridas crônicas. **Objetivos:** Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial terapêutico de biocurativos bioimpressos em 3D contendo células estromais mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano (hUCMSCs) pré-condicionadas com 5-azacitidina (5-AZA) no tratamento de feridas cutâneas graves em modelo murino de anemia falciforme. A proposta foi investigar se a combinação do pré-condicionamento epigenético com a entrega por biocurativo poderia potencializar a capacidade regenerativa das MSCs, promovendo fechamento mais rápido das feridas, e melhora na reepitelização e remodelamento tecidual aprimorado. **Material e métodos:** Neste estudo, MSCs derivadas de cordão umbilical humano (hUCMSCs) foram pré-condicionadas com 5-azacitidina (5-AZA) e incorporadas em um biocurativo bioimpresso em 3D. O potencial terapêutico foi avaliado em um modelo murino robusto de SCD, portador de feridas excisionais com dispositivo de contenção, que mimetizam de forma fidedigna a dinâmica da cicatrização crônica em humanos. Os desfechos incluíram a cinética de fechamento da ferida, análises histológicas de reepitelização e remodelamento tecidual, bem como análises proteômicas de fatores angiogênicos e imunomodulatórios. **Resultados:** O pré-condicionamento das hUCMSCs com 5-AZA aumentou a secreção de fatores tróficos associados à angiogênese (VEGF, PDGF-BB, FGF, PlGF), imunomodulação (IL-4, IL-10, TGF- β) e remodelamento da matriz extracelular (MMP-8, MMP-9). Estudos *in vitro* mostraram que os sobrenadantes das células mesenquimais que receberam o pré-condicionamento exibiam uma potencialização dos efeitos imunomoduladores (IL-4, IL-10, LIF) e angiogênicos (VEGF, FGF-4) quando comparado às células sem condicionamento. Os biocurativos contendo hUCMSC e hUCMSC-AZA aceleraram a cicatrização promovendo reepitelização mais precoce e completa e restaurando a arquitetura cutânea, incluindo anexos dérmicos, até o 14º dia. Os animais que receberam o biocurativo com hUCMSC-AZA exibiram um perfil mais angiogênico e promoveram o fechamento da ferida de pele mais rapidamente quando comparado aos grupos de avaliação. A estrutura histológica foi completamente restaurada nos animais que receberam o biocurativo contendo as células mesenquimais. A análise proteômica confirmou o aumento da neovascularização e a melhora na resolução da inflamação nos tecidos tratados. Notavelmente, a eficácia terapêutica das MSCs pré-condicionadas com 5-AZA superou a de MSCs não tratadas e controles acelulares, alcançando regeneração tecidual em um modelo de cicatrização comprometida. **Discussão e conclusão:** Este estudo demonstra que o pré-condicionamento com 5-AZA constitui uma estratégia simples, porém eficaz, para

potencializar a capacidade regenerativa das hUCMSCs. Quando associado a um biocurativo bioimpresso em 3D, representa uma terapia com viabilidade translacional para o tratamento de feridas crônicas em pacientes com SCD, uma vez que não há alternativa resolutive e eficaz.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.105488>

ID - 1736

BIOENGINEERING OF HUMAN T CELLS WITH CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR TO CONTROL THE PROLIFERATION OF CRYPTOCOCCUS SPP. AND EXPANSION OF NEOPLASTIC B CELLS

M Barrocali de Araújo Melo ^a,
N Ferreira Fregonezi ^a, G Matheus Amaro ^a,
I Held Lemos ^a, L Felipe Domiciano ^a,
M Procópio Machado ^b, T Aparecido da Silva ^a

^a Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Araraquara, SP, Brazil

Introduction: Cryptococcosis is a disease caused by fungi of the genus *Cryptococcus*, a WHO priority pathogen, and nearly one million cases diagnosed annually. Patients affected by lymphoproliferative neoplasms are more susceptible to *Cryptococcus* spp. infection, and novel therapeutic approaches are encouraged to address invasive fungal infection (IFI) in lymphoproliferative disorders. The polysaccharide GXM (glucuronoxylomannan) composes *Cryptococcus* spp. capsule that is targeted by CAR (Chimeric Antigen Receptor) technology previously reported as GXMR-CAR. This chimeric receptor expressed by T cells mitigated the progression of cryptococcosis, however, the improvement of signaling transduction triggered by GXMR-CAR is in progress by our group. The success of CAR application to treat hematological neoplasms opened a research field related to CAR beyond cancer, and the association of CAR cell therapy redirecting immune cells to target cancer cells and *Cryptococcus* spp., side-by-side, is the main goal of the current proposal. **Aim:** Then, this work is focused on the modification of human T cells to co-express GXMR-CAR and CD19-CAR for the controlling of cryptococcosis and neoplastic B cell expansion. **Material and methods:** (i) Generation of GXMR-CAR variants and CD19-CAR using Gibson assembly and overlap PCR approaches; (ii) Production of lentiviral particles through transfection of HEK-293T cells; (iii) Isolation of human T cells from PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) using Ficoll density gradient centrifugation, followed by stimulation with anti-CD3/CD28 beads before the transduction of T cells using the spinoculation method; (iv) Evaluation of cytotoxic activity by luciferase assay using the Raji-Luc cell line, a neoplastic B cell line expressing luciferase; (v) Quantification of pro-inflammatory

mediator secretion by ELISA (OptEIA Kit; BD Biosciences); (vi) evaluation of the fungicidal effect by CFU assay. **Results:** Thus, we generated GXMR-CAR variants containing CD28, CD137, or iCOS as costimulatory domains, and CD19-CAR. So far, preliminary data demonstrated the cytotoxic activity of CD19-CAR modified T cells against Raji-Luc cell line, after incubation for 24 hours RLU determination. CD19-CAR T cells in the presence of Raji cell line showed a significant increase in the production of IFN- γ or IL-2, compared to the unmodified T cells. The expression of cellular exhaustion markers was also investigated, and both PD-1 and TIM-3 had increased expression in CD19-CAR T cells. In addition, T cells modified with GXMR-CAR variants were co-cultivated with *C. gattii* or *C. neoformans* yeasts for 24-hours. *Cryptococcus* burden was determined through the CFU assay, and GXMR-CD137-CAR T cells promoted a significant reduction in the *C. neoformans* burden, compared to unmodified T cells. **Discussion and conclusion:** Notably, additional experiments are required to validate these findings. The next steps, GXMR-CAR variants and CD19-CAR will be co-expressed by human T cells verifying the effect on *in vitro* control of *C. neoformans* and *C. gattii* infection, as well as the ability to reduce the expansion of neoplastic B cells. Finally, modified T cells co-expressing GXMR-CAR and CD19-CAR will be used in the therapy of NSG mice previously infected with *Cryptococcus* spp. or infused with neoplastic B cell line. **Financial support:** CAPES - PROEX; CNPQ (process 167848/2023-2); FAPESP (process number: 2024/00300-9).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.105489>

ID - 3020

CINÉTICA DA VIABILIDADE E INTEGRIDADE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS HUMANAS APÓS 10 ANOS DE CRIOPRESERVAÇÃO: IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E OTIMIZAÇÃO DO PREPARO PRÉ-INFUSIONAL

TS Melo, BV Ramos, CA Ayoub

Centro de Criogenia Brasil, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A criopreservação de células-tronco hematopoieticas (CTH) viáveis é fundamental para o sucesso de terapias celulares e transplantes. O dimetilsulfóxido (DMSO) é o agente crioprotetor mais utilizado, porém sua toxicidade residual após o descongelamento pode comprometer tanto a viabilidade quanto a integridade fenotípica das células, incluindo a expressão do marcador CD34+. Embora as preocupações geralmente se limitem aos aspectos clínicos, pouco se discute o impacto direto do DMSO a nível celular, assim como a cinética da morte celular ao longo do tempo pós-descongelamento. **Objetivos:** Diante disto, o presente projeto teve como objetivo avaliar as condições de lavagem de CTH humanas criopreservadas por 10 anos, testando protocolos que mimetizam práticas clínicas, a fim de avaliar a cinética da viabilidade e integridade celular, além de estabelecer recomendações para o limite temporal seguro de infusão, contribuindo para a padronização dos procedimentos nos centros de transplante. **Material e métodos:** Foram utilizadas amostras de CTH criopreservadas por 10 anos, descongeladas em banho-maria a

37°C e distribuídas em três grupos: lavagem com solução salina 0,9% + 5% albumina humana (Grupo A); lavagem com Voluven 6% (Grupo B); e controle sem lavagem, com DMSO residual (Grupo C). As células dos grupos A e B foram centrifugadas a 300g por 10 minutos e ressuspensas na solução de lavagem. A viabilidade foi avaliada aos 0, 2 e 4 horas após descongelamento por contagem em azul de tripano (Countess II). A integridade celular foi analisada qualitativamente por coloração fluorescente com calceína AM e iodeto de propídio. Após 4 horas, realizou-se citometria de fluxo para avaliar viabilidade via 7-AAD e expressão percentual do marcador CD34+. **Resultados:** No tempo zero, a viabilidade foi similar entre os grupos: DMSO 85,8% ($\pm$ 2,6), Voluven 87,3% ($\pm$ 2,5) e NaCl + albumina 90% ($\pm$ 2,9). Após 2 horas, o grupo sem lavagem sofreu queda significativa de 32,8%, com viabilidade de 53,0%, enquanto os grupos lavados apresentaram perdas menores: 6,1% para Voluven (81,2%) e 9,25% para NaCl + albumina (80,75%). Aos 4 horas, o grupo DMSO apresentou perda total de 71,6%, com viabilidade reduzida a 14,2% ($\pm$ 3,0), e os grupos lavados mantiveram viabilidades superiores a 75% (Voluven 75,5% $\pm$ 2,8 e NaCl + albumina 77,8% $\pm$ 3,0). Apesar de ambas as soluções terem mantido a viabilidade, observou-se melhor preservação no grupo lavado com NaCl + 5% albumina. As imagens por imunofluorescência corroboram os resultados quantitativos, mostrando maior proporção de células vivas nos grupos lavados e predomínio de células mortas no grupo controle. A citometria de fluxo confirmou baixa viabilidade (12,9%) e redução acentuada da expressão de CD34 (2,79%) no grupo sem lavagem, indicando comprometimento fenotípico severo, enquanto os grupos lavados mantiveram maior integridade celular e expressão de CD34+. **Discussão e conclusão:** A toxicidade do DMSO residual após o descongelamento compromete progressivamente a viabilidade e a integridade fenotípica das CTH, especialmente na ausência de lavagem. A remoção do DMSO com soluções como NaCl + albumina ou Voluven preserva as células por até 4 horas, ampliando a janela segura para infusão. Com a adoção dessas práticas, espera-se otimizar os resultados clínicos e ampliar o sucesso das terapias com células-tronco hematopoieticas. Este estudo reforça a importância da padronização dos protocolos pré-infusionais para garantir eficácia e segurança nos transplantes, promovendo abordagens terapêuticas mais seguras e eficazes.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.105490>

ID - 3293

CISTITE HEMORRÁGICA POR ADENOVÍRUS DE DIFÍCIL MANEJO NO PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS HAPLOIDÊNTICO

CM Melo ^a, ML Puls ^b, CB Prato ^a, TAS Pereira ^a,
IM De Melo ^a, MCM De Almeida Macedo ^c,
RL Da Silva ^c

^a Hospital São Camilo Pompeia, São Paulo, SP, Brasil

^b Hospital São Camilo Pompeia, Hospital Sírío-Libanês, Hospital 9 de Julho, São Paulo, SP, Brasil