

^a Genetics Postgraduate Program, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

^b Department of Experimental Hematology, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

^c Department of Internal Medicine, Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Recife, Brazil

^d Cardiology Emergency Unit of Pernambuco, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brazil

Objectives: Fetal hemoglobin (HbF) levels have long been associated with a milder clinical course in sickle cell anemia (SCA). Given the importance of HbF in SCA pathophysiology, studies have focused on describing how HbF ameliorates the clinical phenotype and identifying previously uncharacterized modulators of gamma globin expression. Here, we performed a transcriptomic analysis of reticulocytes from SCA patients with high and low HbF levels to unravel genetic programs associated with high HbF levels. **Methods:** Eight individuals with SCA, older than 18 years and regularly followed at a single reference center in northeast Brazil, were recruited. All patients were without clinical presentation of acute symptoms and not undergoing hydroxyurea treatment. RNA was extracted from the patients' reticulocytes, and the RNA-seq libraries were sequenced in paired-end mode on the NextSeq 500. To compare the degree of contamination with leukocytes, we employed the CIBERSORTx tool, which revealed two samples with high leukocyte contamination that were excluded from further analysis. Three individuals with high baseline HbF (median: 20.9%) and three with low baseline HbF (median: 5.2%) were used gene expression analysis. Functional enrichment analysis was performed with Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), Gene Ontology (GO), and Metabolic Flux Balance Analysis (METAFlux). **Results and discussion:** We identified 293 differentially expressed genes between the conditions (247 upregulated and 46 downregulated in the HbF high group). GSEA associated patients with high HbF levels with the terms "regulation of reactive oxygen species (ROS) process", "lipid biosynthetic process", and "cellular oxidant detoxification", while HbF low samples were associated with "transcription by RNA polymerase", "methylation", and "regulation of translational initiation". These results suggest that high HbF levels drive a molecular program in reticulocytes associated with ROS generation and cellular detoxification pathways. We further identified the leading-edge gene subsets from the significant GSEA analysis. A total of 176 genes were consistently upregulated in several GSEA processes associated with high HbF levels, including SOD2, PRDX2, SYK, and LYN. GO analysis of the core members of high-scoring gene sets showed several pathways involved in the regulation of response to stimulus, response to oxidative stress, and regulation of key metabolic processes that were overexpressed in the high HbF group. Moreover, the processes that were downregulated in the high HbF group were related to RNA metabolic processes, regulation of gene expression, and methylation, suggesting a mechanism of genetic silencing in reticulocytes with low HbF levels in SCA. To further validate these findings, METAFlux analysis, revealed a clear distinction between the metabolic programs,

with up-regulation of terms associated with the downregulation of ROS generation and fatty acid detoxification in high HbF group. **Conclusions:** SCA patients with high HbF levels show improved oxidative stress management and metabolic activity, while those with low HbF have increased gene silencing. These findings offer insights into potential therapeutic targets to ameliorate disease severity through HbF modulation.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.130>

SUPERANDO OS DESAFIOS DA ANÁLISE DE HEMOGLOBINAS EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SOB TRATAMENTO COM VOXELOTOR NO HEMORIO: UM ESTUDO COMPARATIVO DE PLATAFORMAS HPLC

RA Louback, ION Cabral, CLC Lobo, PG Moura

Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: O Voxelotor é um medicamento inovador desenvolvido para o tratamento da Doença Falciforme (DF), que atua se ligando diretamente à hemoglobina S (HbS), aumentando sua afinidade pelo oxigênio. Com isso, é capaz de impedir sua polimerização e falcização das hemácias, diminuindo hemólise e vaso-occlusão. No entanto, essa interação forma um complexo (HbS-Vox) que interfere na quantificação das frações das hemoglobinas por Cromatografia Líquida de Alta Performance por Troca Iônica (HPLC). **Objetivo:** Descrever as alterações observadas nos gráficos cromatográficos de pacientes com DF em uso de Voxelotor por meio de Programa de Acesso Expandido no HEMORIO, bem como propor abordagens para lidar com tal interferência. **Materiais e métodos:** Foram utilizadas amostras de oito pacientes do Programa de Acesso Expandido do Voxelotor no HEMORIO, que foram incubadas a 37 e 39 °C por até 24 horas e analisadas por HPLC, no analisador VARIANT II TURBO (BIO-RAD) ou PREMIER RESOLUTION (TRINITY BIOTECH), para avaliar o efeito da temperatura sobre a porcentagem do pico de HbS-Vox. **Discussão e resultados:** Foi observado que nas amostras colocadas no analisador VARIANT, a interferência aparece como uma sobreposição de picos dificultando a análise do cromatograma, já no PREMIER, a interferência é menor, sem o aparecimento de picos duplos. Admiravelmente, no VARIANT, após incubação por 24 horas a 37°C ou 39°C o complexo HbS-Vox diminui consideravelmente, chegando a não ser mais detectado em diversas vezes. Embora no PREMIER esse efeito seja similar, o complexo não chega a desaparecer. Analisamos que após 24 horas da retirada da amostra da condição de incubação, o complexo volta a se formar. Curiosamente, o aquecimento de amostras de pacientes com DF que não utilizavam o Voxelotor não causou nenhuma alteração no cromatograma. Tendo esses resultados em vista, constatamos que o Voxelotor interfere no gráfico de HPLC, mas o processo de aquecer a amostra parece ser capaz de desfazer o complexo formado com a HbS, resultando em um gráfico adequado para o

cálculo das frações de Hb no VARIANT. A observação de que o gráfico e as frações de Hb permaneceram inalterados nos pacientes que não usavam o Voxelotor indica que as condições de incubação por si mesmas não afetam a amostra, sugerindo que a temperatura influencia apenas na interação do Voxelotor com a Hb. Já para o PREMIER, que apresenta o pico interferente isolado, a incubação não seria necessária, sendo possível utilizar o valor do pico HbS-Vox como forma de acompanhamento da adesão ao tratamento e evolução do paciente. **Conclusão:** Após longos períodos sem inovação terapêutica para a doença falciforme, temos o surgimento de novas drogas, algumas ainda em linha de pesquisa clínica, para melhorar os eventos agudos e danos crônicos causados pela doença. Entretanto, devemos sempre trabalhar em conjunto da assistência clínica com a rede de apoio de análises clínicas para identificarmos as possíveis relações e interferências dos medicamentos nos resultados laboratoriais. Nesse trabalho podemos observar que laboratório pode ser utilizado como uma ferramenta para a inferir a adesão do paciente ao uso do medicamento em questão.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.131>

INVESTIGAÇÃO DO ESTRESSE E DA DIFERENCIAÇÃO ATÍPICA DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS PROMOVIDOS PELA HIDROXIUREIA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Y Teixeira ^{a,b,c}, J Milhomens ^a, JPC Rosario ^{a,b}, C Bonaldo ^a, P Palma ^a, DT Covas ^{a,b}, S Kashima ^{a,b}

^a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), 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

^c Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

A hidroxiureia (HU) é usada para aumentar os níveis de hemoglobina fetal, reduzindo complicações como vasclusão, hemólise e inflamação na anemia falciforme (AF). No entanto, a HU interfere na função das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (CTPHs), o que pode limitar o sucesso de transplantes e terapias gênicas curativas. Considerando a falta de estudos na caracterização detalhada das CTPHs na AF, este estudo investigou a integridade imunofenotípica das CTPHs circulantes em pacientes com AF tratados (HU = 10) ou não tratados com HU (CT = 7), e analisou a diferenciação e proliferação das colônias de CTPHs em outros 5 pacientes com AF (HU = 3 e CT = 2). Para isso, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes e doadores saudáveis (DS, n=5) foram isoladas e analisadas por

citometria de fluxo usando um painel de anticorpos específico para CTPHs, mais as moléculas CD49d e CD235a. Para cultura, 60 células foram selecionadas a partir da gate de CD34: sorting single cell, em uma placa de 96 poços e $1,7 \times 10^3$ por sorting convencional, em uma placa de 24 poços, numa densidade de 210 células por poço. A proliferação, perfil de diferenciação, e intensidade média de fluorescência foram avaliadas ao fim de 20 dias de incubação. A análise estatística foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn ($p < 0.05$). Observou-se que a contagem total de células viáveis CD34⁺ é maior nos pacientes com AF, com o grupo tratado com HU apresentando a maior mediana. As células CD34⁺CD49d⁺ são mais numerosas nos grupos HU e CT em comparação com os DS. No compartimento de células tronco multipotentes (CTM), diferenças significativas na contagem de células foram encontradas entre os pacientes tratados com HU e os DS ($p < 0.01$). As CTMs CD49d⁺ são mais frequentes no grupo CT, enquanto as CD235a⁺ são mais prevalentes no grupo HU. Em relação às células-tronco hematopoiéticas (CTH), os DS não apresentam essas populações no sangue periférico, indicando que a presença delas é característica da AF. A mediana de células CTHs positivas para CD49d e CD235a também é maior nos grupos HU e CT em comparação com os DS. No estudo de colônias, foi observado uma quantidade maior de colônias brancas do tipo granulócito-macrófago (CFU-GM) no grupo HU quando comparada ao grupo CT (ns), que apresenta uma prevalência de colônias vermelhas, como unidades formadoras de colônia-eritroide (CFU-E) e unidades formadoras de erupções (BFU-E) (ns). A presença do marcador de adesão celular e cinética hematopoiética CD49d, em CTHs circulantes sugere uma hematopoiese ineficaz, visto que a expressão normal dessa molécula se dá na medula óssea. A coexpressão de CD235a e CD34 indica uma diferenciação celular acelerada, já que esse receptor é presente em progenitores já comprometidos com a linhagem eritroide. A HU também deve influenciar na proliferação e diferenciação das colônias, dado que nesse grupo houve um aumento no número de colônias brancas, uma provável resposta celular para o caráter citotóxico da droga. Esses resultados revelam uma heterogeneidade imunofenotípica nas CTPHs dos pacientes com AF e uma contribuição significativa da HU para essas alterações. Parte das células envolvidas na hematopoiese desses pacientes demonstra comprometimento da sua função, o que pode afetar a eficácia das CTHs na terapia gênica. **Financiamento:** FUNDHERP, CTC/FAPESP (2013/08135-2), FAPESP (2022/09643-0), INCTC/CNPq (465539/2014-9).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.132>

AVANÇOS E DESAFIOS NA TERAPIA GÊNICA PARA BETA-TALASSEMIA MAJOR: UMA REVISÃO DA LITERATURA

GB Ferreira ^a, BB Ferreira ^b, LER Chaer ^b

^a Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS), Brasília, DF, Brasil

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