

A hipercoagulabilidade é uma característica importante da doença falciforme (DF), e sua fisiopatologia está relacionada à ativação concomitante da hemostasia e da imunidade inata, em um processo conhecido como imunotrombose. Recentemente, estudos destacam a via podoplanina/CLEC-2 como importante no processo de ativação plaquetária e trombose. A podoplanina (PDPN) é uma proteína que já foi descrita em monócitos, e tem como único ligante conhecido a CLEC-2, expressa principalmente em plaquetas. Apesar do papel da via PDPN/CLEC-2 não seja totalmente esclarecida, evidências sugerem que ela pode se encaixar como uma nova via dentro do conceito de imunotrombose. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão de PDPN e CLEC-2 em pacientes com DF e explorar sua relação com a gravidade da doença. Foram incluídos 31 pacientes com DF (genótipo SS=23; genótipo SC=8), além de 10 controles saudáveis, com aprovação ética (CAAE: 53121421.0.0000.5404). A avaliação da expressão de PDPN e CLEC-2 foram feitas por citometria de fluxo do sangue periférico de pacientes DF na fase estável da doença, além dos indivíduos saudáveis. Foram utilizados anticorpos anti-CD45, Anti-CD41, Anti-P-Selectina, Anti-PDPN e Anti-CLEC-2. O FSC (tamanho) e SSC (granulosidade) foi utilizado para separar as populações celulares. Para tal, foram analisados “gates” de células monocitárias e granulocíticas, e os resultados foram descritos como porcentagem. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos dos prontuários eletrônicos. A expressão de PDPN em monócitos mostrou tendência a aumento nos pacientes DF-SS quando equiparados aos indivíduos saudáveis (teste Kruskal-Wallis [$X^2(2) = 3,69$; $p = 0,156$]; $p = 0,06$, Bonferroni, post-hoc). Nas células granulocíticas não houve diferença na expressão de PDPN entre os grupos, teste Kruskal-Wallis [$x^2(2) = 1,06$; $p = 0,58$]. Já a expressão de CLEC-2 em monócitos foi diferente entre os grupos, teste Kruskal-Wallis [$x^2(2) = 19,82$; $p < 0,0001$], com os pacientes DF-SS apresentando aumento da porcentagem de expressão de CLEC-2 quando equiparados aos pacientes DF-SC ($p = 0,03$) e indivíduos saudáveis ($p < 0,0001$). Não observamos diferença entre os pacientes DF-SC e saudáveis ($p = 0,57$). Também observamos diferenças entre os grupos na expressão de CLEC-2 em granulócitos, teste Kruskal-Wallis [$x^2(2) = 10,11$; $p = 0,006$], com maior expressão em pacientes DF-SS quando comparados aos pacientes DF-SC ($p = 0,02$) e indivíduos saudáveis ($p = 0,006$). Houve correlação de monócitos PDPN⁺ com marcadores laboratoriais, tais como: monócitos CLEC-2⁺ ($R = 0,646$), monócitos P-Selectina⁺ ($R = 0,540$), monócitos CD41⁺ ($R = 0,525$), granulócitos PDPN⁺ ($R = 0,664$) e reticulócitos ($R = 0,434$). Também houve correlação de monócitos CLEC-2⁺ com marcadores laboratoriais, como: monócitos P-Selectina⁺ ($R = 0,823$), monócitos CD41⁺ ($R = 0,720$), granulócitos CLEC-2⁺ ($R = 0,884$), hemoglobina ($R = -0,533$), plaquetas ($R = 0,415$) e reticulócitos ($R = 0,563$). Estes resultados sugerem que a via PDPN/CLEC-2 possa fazer parte da fisiopatologia da DF, de forma análoga a outras vias imunotrombóticas já descritas como a expressão de fator tecidual em vesículas extracelulares e a geração de NETs. Estudos para explorar o papel da mediação das interações plaqueta:leucócitos nestes resultados estão em andamento. Embora preliminares, nossos dados

representam a primeira avaliação da participação desta via da DF, que pode abrir caminho para novas estratégias prognósticas e terapêuticas para esta condição.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.173>

PIPKII α NA REGULAÇÃO DOS GENES DA HEMOGLOBINA HUMANA EM CÉLULAS KU812: ESTUDOS PRELIMINARES DE KNOCKDOWN DO GENE PIP4K2A E INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

D Malimpensa, JO Gonçalves, FF Costa, SE Jorge

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

Introdução: A regulação dos genes HBE, HBG, HBD e HBB da hemoglobina (Hb) é realizada pela região de controle do locus β (β -LCR), onde se ligam fatores de transcrição, como EKLF, ou repressores gênicos - quais BCL11A. Estudos demonstram que esta relação também possa ser influenciada por vias quais PTEN/AKT/mTORC1 e MAPK, bem como pela atuação epigenética da proteína de metilação UHRF1, reguladas por fosfoinositídeos das vias que envolvem as fosfatidilinositol-fosfato quinases. Estudos realizados pelo Laboratório de Hemoglobinopatias (FCM-Unicamp) apontam que o gene PIP4K2A, da fosfatidilinositol-fosfato-quinase-II-alfa (PIPKII α), está altamente expresso em precursores eritróides CD34⁺ e traz evidências de seu envolvimento na regulação da expressão dos genes HBA, HBB e HBG em modelos eritroleucêmicos K562 e KU812. **Objetivos:** Investigar os efeitos do silenciamento gênico de PIP4K2A bem como da inibição da atividade de PIPKII α na expressão e síntese de globinas. **Materiais e métodos:** Realizou-se ensaios de knockdown de PIP4K2A por CRISPR-Cas9 utilizando 2.5 μ g de vetores plasmidiais contendo as sequências de RNAs guias (gRNAs) complementares a PIP4K2A: 5-TTTTAACAAGTAAGTACAAG-3, 5-GATCCGAACATCGACGTCTA-3 (Genscript, EUA), transfectadas à linhagem KU812 (ATCC CRL-2099) por nucleofecção (4D Nucleofector X Unit - Lonza - Basileia, CH). Análise proteica por Western Blotting foi realizada após 72h de nucleofecção ($n = 1$) e a quantificação proteica relativa (em porcentagem-%) medida pelo programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA). A viabilidade celular foi avaliada por azul de trypan 0,4% (Thermo Fisher Scientific, USA) ($n = 3$). Para os ensaios de inibição enzimática, as células KU812 foram tratadas com 50 μ M (12h) do inibidor de PIPKII α AG-82 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) ($n = 3$). Análises de expressão gênica foram realizadas pelo método de comparação relativa (ddCT) à expressão dos genes ACTB e GAPDH a partir de ensaios de qRT-PCR (StepOnePlus - Applied Biosystem, EUA). Cálculos de significância estatística ($p < 0,05$) foram atribuídos pelos testes t (distribuição normal) ou Wilcoxon (sem distribuição normal) no programa SPSS (International Business Machines Corporation, EUA). **Resultados e discussão:** Experimentos de CRISPR-Cas9 resultaram na redução significativa da viabilidade celular de KU812 ($p = 0,001$; 72h/nucleofecção, $n = 3$), corroborando com dados de literatura acerca do papel desta

enzima na viabilidade celular neoplásica (THP-1, astrócitos, na leucemia mieloide crônica e leucemia linfocítica aguda). Obteve-se redução parcial (20%) de PIPKII α em relação ao controle (células submetidas à corrente elétrica da nucleofecção) e expressivo aumento das concentrações de globinas (1033%), β (128%) e γ (102%) - $n = 1$, dados estes que deverão ser replicados. A inibição de PIPKII α nas condições supracitadas resultou no aumento significativo dos transcritos *HBB* ($p = 0.009$) e *HBB* ($p = 0.006$) em relação ao controle (tratado com DMSO) ($n = 3$). Não foram observadas alterações significativas na expressão de *HBA*. **Conclusão:** Resultados preliminares de *knockdown* de PIP4K2A por CRISPR e inibição de PIPKII α com o composto AG-82 são bastante concordantes, sugerindo que o silenciamento/inativação de PIPKII α tenha papel preponderante na viabilidade celular tanto quanto no aumento de expressão/síntese dos genes de globina, particularmente no locus β . **Apoio financeiro:** Fapesp, CAPES, CNPq, Funcamp e Faepex.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.174>

SÍNDROME RHNULL ASSOCIADA À DEFICIÊNCIA DE G6PD - RELATO DE CASO

IAA Barcessat, JTFs Pagani, CA Freitas, PM Maki, D Borducchi, VAQ Mauad, DM Christofolini, AC Griciunas, AC Griciunas, DEG Camargo, LMAD Santos, LMAD Santos

Centro Universitário FMABC, Santo André, SP, Brasil

Objetivo: Relatar um caso de síndrome Rhnull associada à deficiência de G6PD em paciente submetida a esplenectomia que faz seguimento no Hospital Estadual Mário Covas (HEMC). **Material e métodos:** Realizado revisão de prontuário, análise cronológica de exames laboratoriais, incluindo fenotipagem e sequenciamento genético, assim como revisão de literatura. **Relato de caso:** DGS, feminino, 59 anos, diabética e hipertensa, iniciou atendimento médico com equipe de cirurgia vascular na emergência do HEMC em abril de 2021 devido à necrose infectada em antepé bilateral associada à anemia hemolítica e história prévia de esferocitose hereditária. A equipe de hematologia iniciou o acompanhamento após solicitado concentrado de hemácias e identificado a presença de Rhnull, aloanticorpos (ANTIs-/jkb/Fya-) e numerosos esferócitos em sangue periférico sem alteração na curva de fragilidade osmótica. Devido à gravidade trombótica da microcirculação, por provável doença hematológica associada às comorbidades pré-existentes, em setembro de 2021, optou-se pela amputação transmetatarsiana bilateral. Para maior segurança do procedimento, devido à indisponibilidade de doador compatível para reserva sanguínea, iniciou-se eritropoietina até atingir Hb 7.6%. Após a cirurgia, a paciente manteve seguimento hematológico e apresentava crises hemolíticas recorrentes. Realizada discussão clínica e debatido as evidências literárias de melhora com esplenectomia, o procedimento foi indicado e realizado sem intercorrências em fevereiro de 2023 após preparo adequado. Um mês após a esplenectomia, ela sustentou Hb 14.7%, sem sinais de hemólise e sem uso de medicações de resgate. Para maior

esclarecimento do caso e a fim de identificar os genes envolvidos, solicitou-se exoma NGS, que revelou a presença de homozigose para Rhnull e heterozigose para deficiência de G6PD, levando-nos a orientá-la sobre medicações e alimentos a serem evitados para minimizar crises. **Discussão:** A síndrome Rhnull caracteriza-se pela ausência de antígenos do grupo Rh nos eritrócitos e trata-se de herança autossômica recessiva rara a partir da mutação do gene RHAG. Essa condição faz com que as glicoproteínas do fenótipo Rh estejam reduzidas ou ausentes na membrana plasmática das hemácias acarretando graus variáveis de estomatocitose, esferocitose, aumento da fragilidade osmótica, resultando em anemia hemolítica crônica. Além disso, a paciente apresentava deficiência hereditária de G6PD que resulta em anemia hemolítica aguda quando há aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, sendo assim ambas as alterações genéticas encontradas levam a desencadear hemólise. Estudos prévios evidenciaram a melhora significativa e sustentada da hemoglobina nos pacientes submetidos a esplenectomia, conduta adotada nesse caso. É válido ressaltar que a intensificação da hemólise, muitas vezes relacionada a infecções ou quadros inflamatórios, é compatível com a deficiência de G6PD, que também ajuda a justificar a resposta favorável à esplenectomia. **Conclusão:** Este caso demonstra a importância do diagnóstico genético adequado para doenças raras e reforça a utilidade da esplenectomia no planejamento e tratamento da síndrome Rhnull, em concordância com a literatura.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.175>

GENETIC ASSOCIATION WITH WHITE BLOOD CELL COUNT UNDER INFLAMMATORY CONDITION AMONG SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS

MC Ozahata^a, A Belisário^b, S Kelly^{c,d}, C Máximo^e, D Teles^f, B Custer^c, EC Sabino^a, CL Dinardo^{a,g}

^a Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

^b Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais (Hemominas), Belo Horizonte, Brazil

^c Vitalant Research Institute, San Francisco, United States

^d BCHO – UCSF Benioff Children's Hospital Oakland, Oakland, United States

^e Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), Rio de Janeiro, Brazil

^f Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Recife, Brazil

^g Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil

Introduction: Sickle cell disease (SCD) is a Mendelian disorder characterized by a point mutation in the β -globin gene that leads to sickling of erythrocytes. Several studies have shown that absolute neutrophil count is strongly associated with clinical severity of SCD, suggesting an apparent role of white