

PIEZO1 ACTIVATION INCREASES NEUTROPHIL ADHESIVE PROPERTIES IN SICKLE CELL ANEMIA

FC Leonardo^a, PL Brito^a, S Egée^b, E Nader^c,
P Connes^c, STO Saad^a, FF Costa^a, N Conran^a

^a Centro de Hematologia e Hemoterapia
(Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), Campinas, Brazil

^b Sorbonne Université, CNRS, UMR 8227 LBI2M,
Station Biologique de Roscoff SBR, Roscoff, France

^c Laboratory LIBM EA7424, Vascular Biology and
Red Blood Cell team, University of Lyon, France

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited disorder caused by a mutation in the gene encoding β -globin. This mutation brings about alterations in the hemoglobin molecule, resulting in abnormal red blood cell (RBC) properties, shape, and subsequent destruction in the circulation, leading to anemia and various complications. Genetic mutations that increase the activation of Piezo1, a mechanosensitive protein involved in calcium influx and Gardos channel activation, have been shown to be responsible for hereditary xerocytosis, a disorder in which RBCs are severely dehydrated. We recently showed that Piezo1 plays a role in some of the RBC properties that contribute to SCA vaso-occlusion, indicating that Piezo1 may represent a potential therapeutic target molecule for this disease (Nader et al.; PMID: 37011913). The aim of the current study was to explore the role of Piezo1 in neutrophil adhesive properties in SCA. This investigation was conducted collaboratively between Lyon and UNICAMP (Fapesp grant 2020/06133-6). Neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy control individuals (HbAA; N=7) and individuals with SCA (HbSS; N=7), by density separation. Neutrophils were incubated with Yoda1 (0.1-10 μ M), a Piezo1 channel agonist that does not require mechanical activation, or DMSO vehicle, for 30 min (37°C), and then perfused over fibronectin-coated microchannels (400 μ m-wide) using the Venaflux microfluidic platform, under 0.5 dyn/cm² shear stress, 37°C, 3 min for monitoring adhesion. Flow cytometry analysis was performed with fluorescent antibodies to detect activated CD11a (LFA-1 integrin subunit) and CD11b (Mac-1 integrin subunit) epitopes. Yoda1-treated neutrophils (0.1-10 μ M) were co-incubated with antibodies that bind to either the activated epitopes of CD11a or CD11b when in their activated states (MEM-83 antibody/anti-mouse IgG-FITC, and CBRM1/5-PE; Invitrogen), and cells were analyzed by flow cytometry. Interestingly, in the microfluidic adhesion assays we found that incubation of SCA neutrophils, but not neutrophils from control individuals, with 1 μ M Yoda1 significantly increased the adhesion of the cells to fibronectin ligand ($p=0.001$). Yoda1-induced adhesion of the SCA neutrophils was not associated with any increase in the activation of either the MAC-1 or LFA-1 integrin subunits, as demonstrated by flow cytometry assays ($p > 0.05$). These results suggest that Piezo1 may influence the adhesive properties of neutrophils in SCA, implying that changes in flow and shear stress could also modulate this mechanosensor on neutrophils. This study highlights the significance of Piezo1 in the pathophysiology of

SCA and could offer new insights for therapeutic approaches for treating this condition.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.163>

EFEITOS DO TRATAMENTO COM CANNABIS MEDICINAL SOBRE O SISTEMA IMUNE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM DOENÇA FALCIFORME: RELATO DE CASO

BD Benites, AS Santos, LBO Souza,
AB Zangirolami, NG Amôr, I Santos, STO Saad,
JPG Sicoli

Centro de Hematologia e Hemoterapia
(Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Objetivos: O sistema endocanabinoide consiste em uma complexa rede de sinalização celular primariamente responsável por manutenção da homeostase e regulação de processos fisiológicos e, por isso, tem sido alvo de interesse pelo potencial terapêutico em diversas condições patológicas. Um de seus receptores, CB2, é preferencialmente expresso nos tecidos periféricos, tendo sido demonstrado em todas as populações de leucócitos humanos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com Cannabis medicinal sobre as subpopulações de leucócitos em paciente portadora de Doença Falciforme (DF). **Material e métodos:** Os dados clínicos e sociodemográficos foram compilados através de análise retrospectiva de prontuário médico, e a avaliação de subtipos de leucócitos foi realizada por citometria de fluxo. Para isso, 4 mL de sangue periférico foram coletados em tubo EDTA antes do início do tratamento e após 15 e 21 dias de tratamento. A imunofenotipagem foi realizada nos 3 períodos utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados à fluorescência: CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD25, CD45, CD56, CD66b, CD68, CD80, CD163, FoxP3, HLA-DR, IFN- γ , IL-4, IL-10, Granzima e Perforina. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo CytoFLEX - Beckman Coulter e analisadas no FlowJoTM. **Resultados:** Paciente do sexo feminino, 42 anos, em seguimento por S β -talassemia zero, tendo como importante complicação da doença múltiplos microinfartos ósseos em coluna lombar levando a quadro de dor crônica incapacitante. Em uso de Hidroxiureia (20 mg/kg/dia), Gabapentina 1200 mg/dia, com necessidade de doses diárias de Dipirona e Tramal; faz seguimento com fisioterapia tendo sido avaliada por ortopedista sem indicação cirúrgica. Diante do quadro de dor crônica refratária, iniciado tratamento complementar com Cannabis Medicinal: 25 mg de canabidiol, divididos em duas doses diárias (óleo sublingual 50 mg/mL, 0,25 mL 2x ao dia), mais 5 mg de THC (óleo sublingual 50 mg/mL, 0,05 mL 2x ao dia). Após 21 dias de tratamento, além da importante melhora no quadro de dor, a avaliação das subpopulações leucocitárias por citometria de fluxo evidenciou: i) aumento da porcentagem de linfócitos T CD4+ e diminuição de T CD8+, ii) aumento da porcentagem de Tregs FoxP3+, iii) diminuição no conteúdo de granzima em linfócitos T CD8+, iv) diminuição progressiva na porcentagem de neutrófilos e v) polarização