

^c Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Recife, PE, Brasil

Objetivo: Avaliar a associação de polimorfismos de base única (SNPs) do sistema endocanabinoide (ECS) com o subfenótipo de acidente vascular encefálico (AVE) em pacientes com anemia falciforme (AF). **Materiais e métodos:** O grupo amostral foi composto por 217 pacientes com AF, provenientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Hemope, PE), subdivididos em: (1) 73 com AVE (mediana do desenvolvimento de AVE de 8 anos [1-58 anos]) e (2) 144 pacientes como grupo controle, sem AVE (mediana de 29 anos [18-65 anos]). O fenótipo da AF foi diagnosticado por HPLC e confirmado por PCR-RE, e mutação da $-\alpha^{3,7kb}$ talassemia foi detectada por GAP-PCR. Com base no impacto funcional e nas frequências alélicas mínimas (MAF) > 10%, selecionamos quatro SNPs do ECS que poderiam estar relacionados com o AVE na AF (FAAH rs324420, MAGL rs604300, CNR1 rs7766029 e CNR2 rs35761398) e a genotipagem foi realizada com ensaios TaqMan no PCR em Tempo Real, QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific). **Resultados:** Os dados de gênero, hemoglobina total (Hb), contagem de reticulócitos, bilirrubina indireta, desidrogenase láctica, quantidade de crise vaso oclusivas (VOCs)/ano e o genótipo para $-\alpha^{3,7kb}$ -talassemia não foram associados ao AVE, enquanto níveis mais baixos de Hb F (%) foram associados ao desenvolvimento de AVE (AVE, Hb F $5 \pm 3,3$ vs. grupo de controle, Hb F $9,6 \pm 5,6$, $p < 0,0001$). Em relação aos SNPs, todos encontraram-se dentro do Equilíbrio de Hardy Weinberg ($p > 0,05$), e o modelo de herança adotado foi o de dominância para o MAGL rs604300 e sobredominância para os demais. As frequências alélicas e genotípicas não diferiram estatisticamente entre os grupos, bem como a distribuição dos alelos não diferiu do MAF para a população adotada (NCBI's ALFA dataset, Latin America 1). Os modelos de regressão logística binária, ajustados para a Hb F como covariável, não demonstraram associação entre os SNPs e o desenvolvimento de AVE. **Discussão:** O AVE é um subfenótipo da AF relacionado à hemólise, à disfunção endotelial e à lesão vascular. No âmbito do ECS, estudos com modelos animais de AVE isquêmico já demonstraram a ação neuroprotetora do antagonismo de receptores CB1, codificados pelo gene CNR1, e do agonismo de receptores CB2 (CNR2), estes últimos ainda relacionados à neurogênese pós AVE. Portanto, ainda que nossos dados tenham revelado que os SNPs analisados não são bons preditores para o AVE, existem evidências crescentes para considerar estes genes como candidatos na modulação desse e de outros subfenótipos da AF. Além disso, nosso estudo fornece pela primeira vez um modelo de herança para os SNPs do ECS na AF e sua caracterização em uma coorte brasileira. O modelo de herança de um SNP pode ser vital para desvendar as características genéticas de doenças complexas, como a AF, e associar fenótipos da doença a genótipos específicos. **Conclusão:** Fornecemos aqui a primeira associação de SNPs do ECS com o subfenótipo da AVE na AF. Considerando os recentes avanços no sentido da utilização de canabinoides nessa e em diversas outras doenças, nossos resultados também abrem caminho para futuros estudos de caracterização dos polimorfismos genéticos do ECS nesta população.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.089>

INFLUÊNCIA DO RECEPTOR TREM-1 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA ANEMIA FALCIFORME: CONHECIMENTOS ATUAIS

MCB Façanha ^{a,b,c}, WCC Silva ^{c,d}, GAS Soares ^{c,d},
JM Magalhães ^{c,d}, AMA Marie ^{a,c,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências

Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (PPGH-UEA), Manaus, AM, Brasil

^b Universidade do Estado do Amazonas (UEA),
Manaus, AM, Brasil

^c Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

^d Universidade Federal do Amazonas (UFAM),
Manaus, AM, Brasil

Introdução: A Anemia Falciforme (AF) é uma condição genética complexa que leva a estados crônicos de estresse oxidativo, inflamação sistêmica e lesão por isquemia-reperfusão, resultando em danos aos tecidos e órgãos. Durante crises de dor aguda na AF, as células danificadas liberam passivamente a proteína HMGB1 (High Mobility Group Box 1), que atua como um padrão molecular associado ao dano (DAMP), ativando receptores da imunidade inata, como o Receptor Descendeador Expresso em Células Mieloides-1 (TREM-1). Neste contexto, TREM-1 atua como amplificador da resposta imune inata, agindo sinergicamente com receptores TLRs e NLRs, enquanto sua forma solúvel (sTREM-1) tem sido apontada como um potencial biomarcador inflamatório. Estudos mostraram que níveis circulantes de sTREM-1 estão elevados em condições inflamatórias, como obesidade, doenças reumáticas e durante isquemia-reperfusão. No entanto, poucos trabalhos avaliaram a participação de TREM-1 na resposta imune na AF, justificando a necessidade de investigações futuras. Hipotetizamos que a ativação de TREM-1 por HMGB1 leva à ativação do fator de transcrição NF- κ B, resultando na produção de mediadores inflamatórios e contribuindo para episódios vaso-oclusivos na AF. **Objetivos:** Analisar estudos sobre o papel do receptor TREM-1 e sua importância na modulação da resposta imune inata na anemia falciforme. **Metodologia:** Esta revisão narrativa utilizou as principais bases de dados eletrônicas, como “PubMed”, “Google Acadêmico” e “Lilacs”, no período de 2015 a 2023 para garantir a inclusão dos estudos mais recentes e relevantes sobre o tema. Foram utilizados termos de busca como “TREM-1”, “Anemia Falciforme”, “HMGB1” e “Inflamação Crônica” e apenas análises originais em inglês foram incluídas. **Resultados:** Dos 30 artigos científicos revisados, 12 destacaram a ativação de TREM-1 por HMGB1, sendo este um dos principais ligantes e ativadores da via TREM-1 em doenças inflamatórias crônicas. Esses achados ressaltam a necessidade de mais estudos sobre TREM-1 na AF para a compreensão de sua influência na doença. **Discussão:** Os estudos evidenciaram que HMGB1 pode atuar como um ligante de TREM-1 ativando a sinalização da via em diversos tipos celulares, resultando na ativação do NF- κ B regulando genes que codificam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1 β . Na inflamação estéril, os níveis aumentados de HMGB1 por necrose e dano

celular desencadeiam respostas inflamatórias mediadas por TLR4 e amplificadas por TREM-1. Isso resulta em aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de neutrófilos e células mononucleares, e prejuízo na vasodilatação, promovendo morte celular por apoptose. Além disso, HMGB1 contribui significativamente para a inflamação e trombose na anemia falciforme, ativando inflamassoma NLRP3 em plaquetas. **Conclusão:** TREM-1 desempenha um papel crucial como um possível modulador da resposta imunológica em condições de inflamação crônica, sendo ativado por HMGB1. Tanto TREM-1 quanto HMGB1 estão significativamente elevados em estados inflamatórios crônicos e podem piorar clinicamente a AF, especialmente durante crises vaso-oclusivas. Como perspectivas futuras, estudos e ensaios clínicos que visem inibir/bloquear a via TREM-1, são necessários para confirmar esses achados e desenvolver novas estratégias terapêuticas promissoras na redução da inflamação e danos teciduais na AF.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.090>

DEVELOPMENT OF AN AUTOMATED FLUORESCENCE MICROSCOPY ASSAY FOR QUANTIFYING FACTORS AFFECTING RED BLOOD CELL (RBC) SICKLING IN SICKLE CELL DISEASE (SCD)

ML Arrojo^a, ACS Pinto^b, SK Haddad^{b,c}, RA Panepucci^{a,b,c}

^a Laboratory of Functional Biology (LFBio), Ribeirão Preto, Brazil

^b Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

^c Center for Cell-Based Therapy (CTC, CEPID-FAPESP), National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy in Cancer (INCTC, CNPq), Ribeirão Preto, Brazil

Sickle cell disease is the most common monogenetic disease in the world, characterized by a point mutation in the sixth codon of the beta-globin gene, which generates mutant hemoglobin S (HbS). Under conditions of deoxygenation, HbS polymerizes, distorting the discoid morphology of an erythrocyte into a sickle-like shape, responsible for causing vaso-occlusive episodes associated with pain attacks, hemolytic anemia and early mortality. Although the main inhibitor of HbS polymerization is fetal hemoglobin (HbF), many additional factors can contribute to cell sickling, including extrinsic factors from the surrounding interacting cells in the microvasculature environment. However, the lack of straightforward functional assays to quantitate how these factor affect cell sickling, hamper a more profound understanding of SCD physiopathology. Therefore, our objective was to develop an automated fluorescence microscopy assay for quantifying factors affecting RBC Sickling in SCD, without the need of special incubators or microfluidic devices. In order to establish a self-generated hypoxic environment, we cultured

HS-5 stromal cells in 96-well plates at a low-density, and placed a small round (5 mm diameter) glass coverslip above the cell monolayer, thus limiting oxygen diffusion underneath the coverslip. Before placing the coverslips, erythrocytes from patients with different types of SCD (HbSS, HbSC and S-Beta Thalassemia) were fluorescently-labeled with DiD'Oil (red) and seeded along with HS-5 cells. A nuclear dye (Hoechst 33342, blue) and a hypoxia-activated fluorescent marker (Image-iT hypoxia, green) were added, thus allowing the identification of HS-5 cell nuclei and hypoxic regions. Immediately after coverslip placement (0h), and after 1h and 24h, a total of 25 sites from each well were acquired with a 20x objective, using transmitted-light and the three fluorescence channels, using an ImageXpress^{Micro} XLS High-Content-Screening-HCS system (Molecular Devices). Images were exported and analyzed using the open-source software CellProfiler, in order to delineate and segment RBCs. Shape-related morphometric features were extracted for each RBC (including, cell area, perimeter, form-factor, roundness and eccentricity), and used to classify and quantify different sub-populations of erythrocytes. Two form-factor thresholds (of 0.60 and 0.85) were used to classify RBCs into sickled (form-factor < 0.60), abnormally-shaped, and round cells (form-factor > 0.85). An eccentricity threshold of 0.60 was also used to separate round cells from elliptical/sickled cells (eccentricity > 0.60). Data analysis was carried using the open-source software Knime. In the three SCDs evaluated, the percentage of cells with eccentricity > 0.60 increased as a function of time, indicating that sickling occurred. In agreement, the percentage of cells with lower form-factors decreased with time. Importantly, the standard deviation of the percentages of RBCs in each morphological class, as calculated from three replica wells, were around 2.2%, for all three SCD patients and time-points evaluated. The use of advanced imaging tools and analysis software allowed a detailed and quantitative assessment of morphological changes in different hypoxic conditions. The 2D microscopy assay presented here is highly-reproducible and allows a quantitative analysis of the influence of different factors in the kinetics of RBC sickling, thus constituting an important tool to explore the pathophysiology of sickle cell disease ex vivo. **Support:** Grant #2022/12856-6, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.091>

IN VITRO EFFECTS OF HEME ON THE ACTIVATION OF MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS, HMEC-1

VF Alberto, PL Brito, FC Leonardo, EMF Gotardo, LFS Gushiken, FF Costa, N Conran

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

Introduction: Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary condition characterized by morphological changes in erythrocytes, which increase their fragility and susceptibility to rupture, releasing intracellular components, including the heme