

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**FELIPE AUGUSTO RÓS**

**Caracterização celular do sistema hematopoético e dos nichos hematopoéticos de modelo murino da anemia falciforme**

**Ribeirão Preto  
2021**

**FELIPE AUGUSTO RÓS**

**Caracterização celular do sistema hematopoético e dos nichos hematopoéticos de modelo murino da anemia falciforme**

**Versão Corrigida**

A versão original encontra-se disponível na biblioteca da unidade que aloja o programa e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Células Tronco e Terapia Celular

Orientadora: Dra. Simone Kashima Haddad

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Luiz Guerino Cunha

**Ribeirão Preto**

**2021**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rós, Felipe Augusto

Caracterização celular do sistema hematopoético e dos nichos hematopoéticos de modelo murino da anemia falciforme. Ribeirão Preto, 2021.

109 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Programa: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular. Área de concentração: Célula-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Kashima, Simone

Co-orientador: Cunha, Renato Luiz Guerino

1. Anemia falciforme. 2. Sistema hematopoético. 3. Nicho hematopoético. 4. Células estromais mesenquimais. 5. Modelo animal.

RÓS, FELIPE AUGUSTO. Caracterização celular do sistema hematopoético e dos nichos hematopoéticos de modelo murino da anemia falciforme. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Aprovado em: 07/07/2021

Banca examinadora

Presidente: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP)

Julgamento: APROVADO

Titular 1: Prof. Dr. Vanderson Geraldo Rocha

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

Julgamento: APROVADO

Titular 2: Profa. Dra. Ana Cristina Silva Pinto

Instituição: Hemocentro de Ribeirão Preto

Julgamento: APROVADO

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amigos e minha família, em especial, aos meus pais, meus avós e minha irmã que sempre me apoiaram, ajudaram, incentivaram e oraram para tornar este momento possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pelas oportunidades, conquistas, força e constante direcionamento.

Aos meus pais pelo amor, por minha educação, formação, moral, apoio financeiro e pela amizade que existe entre nós. Obrigado pelo intenso esforço e pelas extensas jornadas de trabalho enfrentadas com o objetivo de garantir meu estudo e conforto.

Aos meus avós pelo amor e preocupação. Agradeço por me incentivarem e por ensinarem coisas sobre a vida e sobre o mundo que a universidade não poderia ensinar.

Agradeço a minha irmã pelo companheirismo e à Nala e ao Romeu pela capacidade de tornar os momentos mais divertidos, leves e revigorantes.

A todos os professores que dividiram seus conhecimentos comigo até aqui. Todos foram parte deste trabalho e contribuíram para o ser humano que sou hoje, em minhas competências intelectuais e pessoais.

Agradeço, em especial, a Prof.<sup>a</sup> Simone Kashima Haddad que abriu as portas do Hemocentro para mim, ainda durante a graduação e desde lá me orientou durante o estágio curricular obrigatório e mestrado. Agradeço por tudo que você me ensinou sobre ciência e sobre a vida.

Ao Prof. Renato Luiz Guerino Cunha pela co-orientação.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e aos Programas de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular pela estrutura acadêmica de alto nível. Agradeço aos brasileiros que financiaram meus estudos até aqui. Espero retribuir o investimento.

Agradeço a Sílvia e a Rosana pela ajuda durante todas as etapas deste mestrado: do ingresso à defesa.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e todos os colaboradores que tornaram meus anos aqui além de produtivos, prazerosos. Agradeço à equipe do: Laboratório de Transferência Gênica, Laboratório de Terapia Celular, Laboratório de Anemias Hereditárias, Laboratório de Imunohistoquímica.

Agradeço em especial à equipe do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais, onde foram produzidos e mantidos os animais utilizados neste trabalho e à equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo, sobretudo à Camila e a Patrícia pela enorme dedicação e disponibilidade demonstradas durante este trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou este trabalho sob o número 2019/22155-2, ressaltando que: “As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do (s) autor (es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”. Ao Centro de Terapia Celular

(FAPESP 2013/08135-2). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular no Câncer (CNPq/FAPESP) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Carmem e a Dalvinha por toda a ajuda com a burocracia, conversas e conselhos. À Sandra e ao Nelson pela ajuda na edição e construção das imagens.

Aos membros da banca pela disposição em participar e contribuir com a melhora deste trabalho.

Agradeço aos amigos que o mestrado me deu: Fernanda, Péricles, Jonathan, Juliana, Rafaela, Débora, Ian e todos os outros que estavam comigo no dia-a-dia compartilhando os sucessos, os desafios, as confraternizações, os congressos, os bolos e as refeições no RU.

Por fim, agradeço todos os meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular que foram fundamentais direta ou indiretamente pelo trabalho aqui apresentado, por meu desenvolvimento científico e pessoal e pelas ótimas memórias que trago dos últimos anos.

**OBRIGADO.**

## EPÍGRAFE

“...A ciência é, portanto, uma perversão de si mesma, a menos que tenha como fim último, melhorar a humanidade...”

Nikola Tesla



## RESUMO

RÓS, FA. **Caracterização celular do sistema hematopoético e dos nichos hematopoéticos de modelo murino da anemia falciforme.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O sistema hematopoético é o responsável pela produção das células sanguíneas do organismo em homeostase ou estresse. Seu funcionamento depende da manutenção e diferenciação coordenada das células-tronco hematopoiéticas (HSC) que está intimamente associada ao nicho hematopoético. O nicho hematopoético é um microambiente altamente dinâmico, orquestrado e heterogêneo quanto à sua composição celular. Dentre os tipos celulares que o compõem estão as células endoteliais e células estromais mesenquimais multipotentes (MSC) que junto aos demais componentes suportam e regulam a autorrenovação e diferenciação das HSC. Entretanto, doenças hematológicas podem alterar o sistema hematopoético, as HSC e demais células do microambiente. Por isso, este estudo analisou a hematopoese, os nichos hematopoéticos intramedular e extramedular esplênico e as MSC da medula óssea (MO) de camundongos falciformes (Townes-SS) com diferentes idades e após o tratamento com hidroxiuréia (HU). Os resultados revelaram maior número de progenitores de eritrócitos e megacariócitos (MEP) no nicho intramedular dos Townes-SS, além do maior número de: HSC, progenitores mieloides comuns (CMP), progenitores de granulócitos e monócitos (GMP) e MEP no nicho extramedular esplênico. Esses achados demonstram que a análise combinada da hematopoese intramedular e extramedular esplênica dos Townes-SS concorda com dados já descritos para MO de humanos. O aumento dos MEP foi acompanhado de aumento na frequência de progenitores eritroides terminais totais e de alteração no perfil mitótico da diferenciação eritroide terminal murina em ambos os nichos. A análise das células não hematopoéticas revelou maior número de células-tronco endoteliais, MSC e células estromais não mesenquimais no nicho extramedular esplênico. As MSC da MO isoladas e cultivadas *in vitro* apresentaram um perfil transcricional relacionado com aumento da diferenciação das HSC em detrimento da manutenção da quiescência. Por fim, o tratamento dos Townes-SS com HU resultou em menor número de HSC, CMP, GMP e MEP nos nichos hematopoéticos intramedular e extramedular esplênico dos animais tratados frente aos animais não tratados de mesmo genótipo e idade. Este comportamento celular concorda novamente com dados já descritos em humanos que fazem uso de HU frente àqueles que não a utilizam. Portanto, os resultados obtidos demonstram que os Townes-SS podem ser utilizados como

modelo animal em estudos pré-clínicos ou de ciência básica que avaliem os impactos da AF ou o efeito de tratamentos sobre as HSC, demais células hematopoéticas e células não hematopoéticas dos nichos hematopoéticos.

**Palavras Chave:** Anemia falciforme. Sistema hematopoético. Nicho hematopoético. Célula estromal mesenquimal. Camundongo falciforme.

## ABSTRACT

RÓS, FA. **Cellular characterization of hematopoietic system and hematopoietic niches in murine model of sickle cell anemia.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The hematopoietic system is responsible for the production of blood cells in the body in homeostasis or stress. Its functioning depends on the maintenance and coordinated differentiation of hematopoietic stem cells (HSC), which are closely associated with the hematopoietic niche. The hematopoietic niche is a highly dynamic microenvironment, orchestrated and heterogeneous in terms of its cellular composition. Among the cell types that make up the niche are the endothelial cells and multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) that together with the other components support and regulate the self-renewal and differentiation of HSC. However, hematological diseases can alter the hematopoietic system, the HSC and other cells in the microenvironment. Therefore, this study analyzed the hematopoiesis, intramedullary and extramedullary splenic hematopoietic niches and bone marrow (BM) MSCs of sickle-cell mice (Townes-SS) at different ages and after treatment with Hydroxyurea (HU). The results revealed a greater number of erythrocyte-megakaryocyte progenitor megakaryocytic-erythroid progenitors (MEP) in the intramedullary niche of the Townes-SS, in addition to a greater number of: HSC, common myeloid progenitors (CMP), granulocyte-monocyte progenitors (GMP) and MEP in the extramedullary niche splenic. These findings demonstrate that the combined analysis of intra and extramedullary splenic hematopoiesis of the Townes-SS agrees with data already described for OM in humans. The increase in MEP was accompanied by an increase in the frequency of total terminal erythroid progenitors and an alteration in the mitotic profile of the murine terminal erythroid differentiation in both niches. The analysis of non-hematopoietic cells revealed a greater number of endothelial stem cells, MSC and non-mesenchymal stromal cells in the splenic extramedullary niche. The analysis of isolated and in vitro cultivated OM MSCs did not show morphofunctional differences, except for a transcriptional profile related to increased HSC differentiation at the expense of quiescence maintenance. Finally, the treatment of Townes-SS with HU resulted in a lower number of HSC, CMP, GMP and MEP in the intramedullary and extramedullary splenic hematopoietic niches of treated animals compared to untreated ones. This cellular behavior agrees again with data already described in humans who use HU compared to those who do not use it. Therefore, the results obtained demonstrate that the Townes-SS can be used as an animal model for preclinical or basic science studies that assess

the impacts of FA on HSC and other hematopoietic or non-hematopoietic cells of hematopoietic niches, as well as in tests on the effect of drugs and drugs on hematopoiesis, hematopoietic niche and specific cells in the context of FA.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Hematopoietic system. Hematopoietic niche. Mesenchymal stromal cell. Sickle cell mice.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspectos químicos e estruturais da polimerização das hemoglobinas S.....	20
<b>Figura 2.</b> Fisiopatologia da anemia falciforme: hemólise e vaso-oclusão.....	21
<b>Figura 3.</b> Diferenciação das HSC em células sanguíneas maduras. ....	25
<b>Figura 4.</b> Nicho hematopoético intramedular em homeostase. ....	27
<b>Figura 5.</b> Estratégia experimental.....	34
<b>Figura 6.</b> Peso vivo, peso esplênico e peso hepático.....	44
<b>Figura 7.</b> Registro fotográfico dos baços e fígados.....	45
<b>Figura 8.</b> Contagem de células vermelhas, quantidade de hemoglobina e hematócrito.....	46
<b>Figura 9.</b> Volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos. ....	48
<b>Figura 10.</b> Leucograma.....	50
<b>Figura 11.</b> Contagem relativa de linfócitos, monócitos e granulócitos.....	51
<b>Figura 12.</b> Análise da porcentagem de reticulócitos, e das células com HbF.....	52
<b>Figura 13.</b> Porcentagem de reticulócitos, reticulócitos com HbF e eritrócitos com HbF.....	53
<b>Figura 14.</b> Quantidade de células totais isoladas da MO e do baço.....	54
<b>Figura 15.</b> Quantidade de HSC na medula óssea e do baço.....	56
<b>Figura 16.</b> Quantidade de CMP, GMP e MEP na medula óssea.....	57
<b>Figura 17.</b> Quantidade de CMP, GMP e MEP no baço.....	59
<b>Figura 18.</b> Porcentagem total e proporção mitótica dos progenitores eritroides terminais na medula óssea.....	61
<b>Figura 19.</b> Porcentagem total e proporção mitótica dos progenitores eritroides terminais no baço.....	63
<b>Figura 20.</b> Células não hematopoéticas do nicho hematopoético intramedular.....	65
<b>Figura 21.</b> Células não hematopoéticas do nicho hematopoético extramedular esplênico.....	67
<b>Figura 22.</b> Morfologia das BM-MSC.....	68
<b>Figura 23.</b> Morfologia das BM-MSC por microscopia de fluorescência.....	69
<b>Figura 24.</b> Perfil imunofenotípico das BM-MSC.....	71
<b>Figura 25.</b> Diferenciação adipogênica das BM-MSC isoladas com 30 dias de vida.....	72
<b>Figura 26.</b> Diferenciação adipogênica das BM-MSC isoladas com 60 dias de vida.....	73
<b>Figura 27.</b> Diferenciação osteogênica das BM-MSC isoladas com 30 dias de vida.....	74
<b>Figura 28.</b> Diferenciação osteogênica das BM-MSC isoladas com 60 dias de vida.....	75

<b>Figura 29.</b> Perfil de expressão gênica das BM-MSC.....	77
<b>Figura 30.</b> Heatmap da média de citocinas plasmáticas. ....	78
<b>Figura 31.</b> Heatmap dos níveis de citocinas plasmáticas individuais.....	79
<b>Figura 32.</b> Eritrograma dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.....	80
<b>Figura 33.</b> Leucograma dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU. ....	81
<b>Figura 34.</b> Porcentagem de reticulócitos, reticulócitos com HbF e eritrócitos com HbF humana dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.....	82
<b>Figura 35.</b> Quantidade de células isoladas e quantidade de HSC da MO e do baço dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU. ....	83
<b>Figura 36.</b> Quantidade de CMP, GMP e MEP da MO e do baço dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU. ....	84
<b>Figura 37.</b> Porcentagem total e proporção mitótica dos progenitores eritroides terminais na MO e baço dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.....	86
<b>Figura 38.</b> Células não hematopoéticas do nicho hematopoético intramedular e extramedular esplênico dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU. ....	87
<b>Figura 39.</b> Sumário de resultados dos Townes-SS em comparação aos Townes-AA e C57BL/6J.....	89
<b>Figura 40.</b> Sumário de resultados dos Townes-SS tratados com HU em comparação aos Townes-SS não tratados. ....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro
<b>mL</b>	mililitro
<b>dL</b>	decilitro
<b>fL</b>	fentolitro
<b>µm</b>	micrômetro
<b>mm</b>	milímetro
<b>pg</b>	picograma
<b>g</b>	grama
<b>min</b>	minutos
<b>s</b>	segundos
<b>HSC</b>	do inglês, <i>hematopoietic stem cells</i>
<b>MSC</b>	do inglês, <i>multipotent mesenchymal stromal cell</i>
<b>BM-MSC</b>	células estromais mesenquimais da medula óssea
<b>CEnMSC</b>	células estromais não mesenquimais
<b>AF</b>	Anemia Falciforme
<b>MO</b>	medula óssea
<b>BM</b>	do inglês, <i>bone marrow</i>
<b>DNA</b>	do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>RNA</b>	do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MPP</b>	do inglês, <i>multipotent progenitor</i>
<b>CMP</b>	do inglês, <i>common myeloid progenitor</i>
<b>GMP</b>	do inglês, <i>granulocyte/monocyte progenitor</i>
<b>MEP</b>	do inglês, <i>megakaryocyte/erythroid progenitor</i>
<b>HbS</b>	hemoglobina S
<b>HbF</b>	hemoglobina fetal
<b>2,3-DPG</b>	2,3-difosfoglicerato
<b>TNF</b>	do inglês, <i>tumoral necrosis factor</i>
<b>NETs</b>	do inglês, <i>neutrophil extracellular traps</i>
<b>NO</b>	óxido nítrico

<b>ROS</b>	do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
<b>CD</b>	do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
<b>HU</b>	hidroxiuréia
<b>CxCL</b>	do inglês, <i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
<b>SCF</b>	do inglês, <i>stem cell factor</i>
<b>LSK</b>	células LIN[CD3, B220, Ter-119, GR-1 e Mac-1] -, Sca-1+ e c-Kit+
<b>ICAM</b>	do inglês, <i>intercellular adhesion molecule</i>
<b>VCAM</b>	do inglês, <i>vascular cell adhesion molecule</i>
<b>IFN</b>	interferon
<b>CAR</b>	do inglês, <i>CXCL12-abundant reticular cells</i>
<b>Nes</b>	nestina
<b>LepR</b>	receptor de leptina
<b>SNS</b>	sistema nervoso simpático
<b>NG2</b>	do inglês, <i>neuron-glia antigen 2</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	do inglês, <i>transforming growth factor beta</i>
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CIBio</b>	Comissão Interna de Biossegurança
<b>FMRP</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<b>PBS</b>	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
<b>BSA</b>	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
<b>SFB</b>	soro fetal bovino
<b>RBC</b>	do inglês, <i>red blood cells</i>
<b>HCT</b>	hematócrito
<b>HGB</b>	do inglês, <i>hemoglobin</i>
<b>MCV</b>	do inglês, <i>mean corpuscular volume</i>
<b>MCH</b>	do inglês, <i>mean corpuscular hemoglobin</i>
<b>MCHC</b>	do inglês, <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>
<b>RDW</b>	do inglês, <i>red cell distribution width</i>
<b>WBC</b>	do inglês, <i>white blood cells</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>GAPDH</b>	do inglês, <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>ACT-<math>\beta</math></b>	beta-actina



<b>Angpt</b>	angiopoietina
<b>VEGFa</b>	do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>Runx2</b>	do inglês, <i>runt-related transcription factor 2</i>
<b>Spp1</b>	do inglês, <i>secreted phosphoprotein 1</i>
<b>DLX-6</b>	do inglês,
<b>LIF</b>	do inglês, <i>leukemia inhibitory factor</i>
<b>IL</b>	interleucina
<b>Ct</b>	do inglês, <i>cycle threshold</i>
<b>Cq</b>	ciclo que quantificação
<b>MNP</b>	neoplasias mieloproliferativas

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>19</b>
1.1 Aspectos Gerais da Anemia Falciforme .....	19
1.2 Modelos animais para estudo da AF.....	23
1.3 O Sistema Hematopoético .....	24
1.4 O Nicho Hematopoético e a regulação das HSC .....	26
1.5 Células estromais mesenquimais multipotentes .....	28
<b>2. Hipótese .....</b>	<b>30</b>
<b>3. Justificativa .....</b>	<b>30</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>31</b>
4.1 Objetivo geral .....	31
4.2 Objetivos específicos .....	31
<b>5. Materiais e Métodos .....</b>	<b>32</b>
5.1 Aspectos Éticos e Biossegurança.....	32
5.2 Animais e estratégia experimental.....	32
5.3 Análise sanguínea .....	35
5.4 Análise do peso corporal e danos teciduais macroscópicos .....	36
5.5 Isolamento celular da medula óssea (MO) .....	36
5.6 Isolamento celular do Baço .....	37
5.7 Citometria de Fluxo – Painéis de descrição das populações celulares .....	37
5.8 Cultivo e caracterização das BM-MSC .....	38
5.9 Perfil de expressão gênica .....	40
5.10 Análise de citocinas .....	41
5.11 Tratamento com Hidroxiuréia.....	41
5.12 Análise estatística .....	42
<b>6. Resultados.....</b>	<b>42</b>
6.1 Impactos da AF sobre órgãos e células maduras .....	42
6.1.1 Análise do peso corporal e lesões teciduais macroscópicas. ....	42
6.1.2 Análise sanguínea - Eritrograma. ....	43
6.1.3 Análise sanguínea - Leucograma.....	49
6.1.4 Análise sanguínea - Contagem de reticulócitos e células com HbF.....	51

6.2 Impactos da AF sobre as células dos nichos hematopoéticos intramedular e extramedular esplênico .....	53
6.2.1 Celularidade da MO e do Baço.....	53
6.2.2 HSC na medula óssea e no baço .....	54
6.2.3 Progenitores mieloides.....	55
6.2.4 Progenitores eritroides terminais .....	60
6.2.5 Células não hematopoéticas.....	64
6.3 Impactos da AF sobre as BM-MSC.....	68
6.3.1 Análise morfológica.....	68
6.3.2 Perfil imunofenotípico .....	70
6.3.3 Diferenciação mesodérmica.....	71
6.4 Perfil de citocinas plasmáticas dos camundongos falciformes.....	77
6.5 Impactos da HU sobre as células dos nichos hematopoéticos.....	79
6.5.1 Análise do peso corporal, esplênico e hepático após HU.....	79
6.5.2 Análise sanguínea após HU - Eritrograma .....	80
6.5.3 Análise sanguínea após HU - Leucograma.....	81
6.5.4 Análise sanguínea após HU - Contagem de reticulócitos e células com HbF.....	81
6.5.5 Celularidade da MO e do Baço após HU.....	82
6.5.6 HSC na medula óssea e no baço após HU .....	82
6.5.7 Progenitores mieloides após HU .....	83
6.5.8 Progenitores eritroides terminais .....	85
6.5.9 Células não hematopoéticas.....	86
6.6 Principais resultados .....	88
<b>7. Discussão.....</b>	<b>91</b>
<b>8) Conclusão .....</b>	<b>100</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>102</b>
<b>Apêndice 1. Análise da eficiência das sondas TaqMan. ....</b>	<b>109</b>

# 1. Introdução

## 1.1 Aspectos Gerais da Anemia Falciforme

A AF é a forma homozigota de uma doença genética, autossômica recessiva que foi descrita pela primeira vez em 1910 pelo cardiologista Dr. James B. Herrick. A descrição inicial se deu a partir de um relato de caso que descrevia a presença de “corpúsculos sanguíneos vermelhos com peculiar alongamento e células com formato de foice”<sup>1,2</sup>.

Considerada a primeira "doença molecular" descrita<sup>3</sup>, a AF decorre da troca de um único nucleotídeo no sexto códon do gene que codifica a  $\beta$ -globina. Neste ponto, uma timina é substituída por uma adenina, resultando na troca de um ácido glutâmico por uma valina (Glu6Val) durante a tradução do RNA mensageiro (mRNA) em proteína. A troca deste aminoácido origina  $\beta$ -globinas alteradas que interagem com  $\alpha$ -globinas normais formando tetrâmeros de hemoglobina conhecidos como hemoglobina S (HbS)<sup>4,5</sup>.

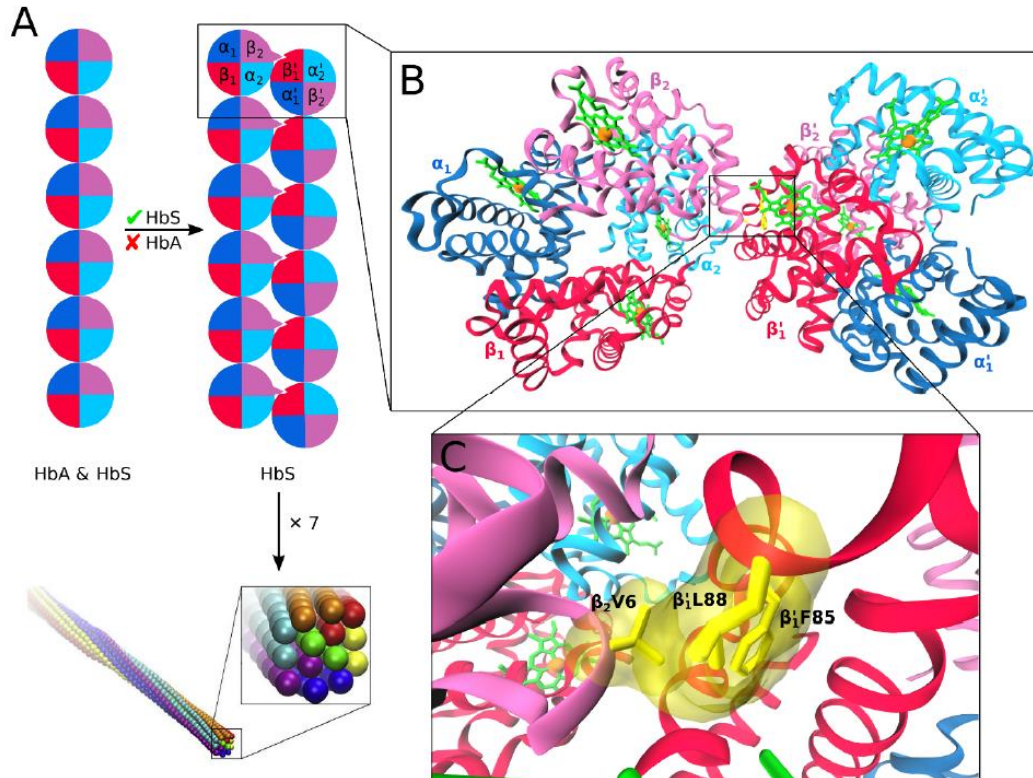
Em condições de baixas tensões de oxigênio, a alteração Glu6Val afeta principalmente a interação proteína-proteína das HbS e predispõe a formação de multipolímeros. Desta forma, quando os eritrócitos e reticulócitos, contendo HbS, passam pela microvascularização e a tensão de oxigênio diminui, um braço hidrofóbico, formado pela presença da valina, se liga a uma bolsa hidrofóbica formada por uma fenilalanina e uma leucina (Phe85 e Leu88) de outra HbS (Figura 1B e 1C). Ao contrário dos agregados de hemoglobinas normais (HbA), os agregados lineares de HbS crescem em filamentos duplos que se unem a outros 6 filamentos duplos, formando multipolímeros alongados com aproximadamente 200 Å de espessura (Figura 1A)<sup>6</sup>.

A formação dos multipolímeros sofre influência de fatores como: temperatura, pH, menor afinidade da HbS pelo O<sub>2</sub>, níveis de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e esfingosina-1-fosfato, alterações na  $\alpha$ -globina e concentração de hemoglobina fetal (HbF)<sup>6-9</sup>. E a extensão da polimerização é determinante na gravidade da doença, uma vez que os polímeros causam desidratação celular, promovem estresse celular físico e oxidativo e alteram a arquitetura e a flexibilidade dos eritrócitos conferindo-lhes o formato de foice<sup>7</sup>.

As alterações celulares descritas acima se intensificam ao longo dos ciclos de polimerização e despolimerização da HbS até tornarem os eritrócitos irreversivelmente falciformes. A fragilidade e instabilidade do eritrócito falciforme reduzem sua vida útil em mais de 75% e a hemólise extravascular baseada na fagocitose dos eritrócitos por macrófagos é responsável por dois terços da hemólise em pacientes com AF<sup>10,11</sup>. A anemia decorrente

deste processo e a vaso-occlusão com lesões por isquemia-reperfusão são os dois principais processos fisiopatológicos da AF <sup>2,7</sup>.

**Figura 1.** Aspectos químicos e estruturais da polimerização das hemoglobinas S.



(A) Diferença dos agregados lineares de hemoglobina normal (HbA) (esquerda) e agregados em filamentos duplos decorrentes da ligação de moléculas de hemoglobinas com mutação Glu6Val (HbS) (direita) que interagem com outros sete filamentos duplos originando um multipolímero (abaixo); (B) Dímero formado pela interação de duas moléculas de HbS adjacentes; (C) Interação entre o braço hidrofóbico formado pela valina (V6) de uma HbS ( $\beta_2$ ) e a bolsa hidrofóbica formada por Phe85 e Leu88 (L88 e F85) de outra HbS ( $\beta_1$ ) responsável pela formação dos filamentos duplos de HbS. Fonte: Olujide O. Olubiyi, Maryam O. Olagunju and Birgit Strodel, 2019 <sup>6</sup>.

A vaso-occlusão é um evento complexo decorrente da interação entre: i) eritrócitos falciformes; ii) células endoteliais; iii) leucócitos; e iv) plaquetas. Os eritrócitos falciformes são naturalmente mais aderentes às células endoteliais devido a uma maior expressão principalmente de  $\alpha_4\beta_1$  integrinas (VLA4), glicoproteína plaquetária 4 (CD36) e molécula de adesão basocelular (BCAM). O contato dos eritrócitos falciformes com o endotélio somado ao aumento de grupamentos heme e hemoglobinas livres associadas a hemólise, ROS induzido por hipóxia e a redução da disponibilidade de óxido nítrico (NO) promovem a ativação das células endoteliais <sup>5,12,13</sup>. Estas, por sua vez, produzem IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) e estabelecem um estado inflamatório crônico <sup>14,15,16</sup>.

Os neutrófilos também contribuem para o fenômeno da vaso-occlusão devido a expressão aumentada de integrinas  $\alpha M\beta 2$ , interação com o endotélio ativado e interação com os

eritrócitos falciformes. Adicionalmente, o aumento de grupamentos heme livres estimula a liberação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) por meio de um mecanismo dependente da geração de ROS <sup>17,18</sup> (Figura 2). Por fim, as plaquetas possuem aumento de diversos marcadores biológicos de ativação plaquetária (trombospondina e fator plaquetário 4 (CXCL4)) e compõem os agregados heterocelulares de neutrófilos e eritrócitos/reticulócitos <sup>17,19</sup> (Figura 2).

A complexa fisiopatologia da AF causa nos pacientes uma anemia hemolítica crônica que decorre em hipóxia, colelitíase, fadiga, intolerância ao exercício, hipercoagulabilidade, e vasculopatia <sup>20,21</sup>. A vasculopatia e a síndrome vasclusiva geram hipertensão pulmonar, síndrome torácica aguda, acidentes vasculares isquêmicos, degenerações e necroses multitecduais, úlcera em membros inferiores e dor crônica <sup>22,23</sup>. Adicionalmente, o sequestro esplênico agudo, autoesplenectomia e infecções bacterianas são importantes causas de morbidade e mortalidade da AF em crianças <sup>24-27</sup>.

**Figura 2.** Fisiopatologia da anemia falciforme: hemólise e vaso-oclusão.



A hemoglobina e grupamentos heme livres, resultantes da hemólise, induzem inflamação vascular e ativação das células endoteliais, neutrófilos e plaquetas. A ativação das células endoteliais promove a superexpressão de moléculas de adesão endotelial (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectinas) e degranulação dependentes de TLR4, além da liberação de fator de *Von Willebrand*. Os neutrófilos ativados por heme e TNF liberam armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) e moléculas de adesão (integrina  $\alpha M\beta 2$ ). As plaquetas possuem aumento de moléculas de ativação plaquetária e interagem com eritrócitos e neutrófilos no processo de adesão. Juntas, as alterações endoteliais e das demais células culminam em vaso-oclusão que pode causar hipóxia e dano tecidual. Fonte: adaptado de Fabianno F. Dutra, FF.; Bozza, MT., 2014 <sup>18</sup>.

Os avanços no suporte médico geral e o aumento da expectativa de vida dos pacientes com AF são inegáveis. Entretanto, o tratamento da AF ainda é considerado um desafio,

sobretudo em países de baixa renda, sendo as principais abordagens terapêuticas: o uso da hidroxycarbamida (hidroxiuréia), a transfusão sanguínea e o transplante de HSC <sup>2,5,28-30</sup>.

A HU é um inibidor da ribonucleotídeo redutase que aumenta a expressão de HbF e reduz a leucocitose. Além disso, o uso da HU reduz as crises vaso-oclusivas, as hospitalizações e a mortalidade. A transfusão sanguínea crônica atua na redução dos eritrócitos falciformes e melhora do fluxo microvascular, diminuindo a lesão endotelial e o dano inflamatório decorrente da hemólise <sup>29</sup>. Entretanto, é necessário considerar a possibilidade de sobrecarga de ferro, aloimunização e transmissão transfusional de agentes patológicos. O transplante de HSC é o único tratamento curativo disponível, visto que há a substituição parcial das HSC com a mutação no gene  $\beta$ -globina por HSC normais que por consequência originarão eritrócitos saudáveis. Porém, mesmo com baixa probabilidade de falha na enxertia, pouca incidência da doença do enxerto contra hospedeiro e alta taxa de sobrevida, o transplante de HSC apresenta limitações como a escassez de doadores HLA compatíveis e falta de estrutura hospitalar <sup>9,31-32</sup>.

Recentemente, a terapia gênica baseada na edição genômica *in vitro* das HSC mutadas, seguida do transplante autólogo das HSC editadas tornou-se tecnicamente possível. De forma simplificada, são utilizados vetores lentivirais para inserir cópias do gene da  $\beta$ -globina sem a mutação falciforme ou sequências genéticas para aumentar a produção de HbF <sup>33-34</sup>. Outras estratégias baseadas na redução da expressão do gene da  $\alpha$ -globina e na correção do gene da  $\beta$ -globina *S in situ* usando reparo direcionado por homologia também foram desenvolvidas <sup>35-36</sup>.

Entretanto, a característica inflamatória da AF pode configurar um desafio para aplicação das técnicas de modificação celular, uma vez a inflamação atua de forma direta sobre as HSC, por meio de receptores *Toll-like* (TLRs) e de forma indireta, por meio de interferons (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) <sup>37-39</sup>.

Estudos em camundongos demonstraram que a interleucina-1 (IL-1): i) aumenta a cinética de divisão das HSC; ii) estimula a diferenciação mielóides suprimido a linfopoiese e a eritropoese; e iii) prejudica significativamente a função das HSC em casos de exposição crônica <sup>40</sup>. Adicionalmente, foi demonstrado que altos níveis de eritropoetina sistêmicos em animais: i) reprogramam o transcriptoma das HSC; ii) aumentam os progenitores comprometidos com a diferenciação eritroide; e iii) reduzem os progenitores comprometidos com a produção de megacariócitos, granulócitos e macrófagos <sup>41</sup>. Por fim, um último estudo revelou redução de células LSK (células negativas para marcadores de células sanguíneas maduras [CD3, para linfócitos T; B220, para linfócitos B; Ter-119, para eritrócitos; GR-1 e Mac-1, para células mielóides] e positivas para Sca-1 e c-Kit) e de HSC na MO murina (modelo Berkeley), além

de redução da população de células LSK na fase G0 do ciclo celular e uma diminuição do potencial de formação de colônia destas células <sup>42</sup>.

## 1.2 Modelos animais para estudo da AF

A complexa fisiopatologia da AF e a dificuldade de encontrar um tratamento curativo abrangente estimularam a criação de diversos modelos animais transgênicos para seu estudo. Tais modelos apresentam limitações, porém configuram uma importante ferramenta para a investigação dos mecanismos patológicos das doenças, estudo da ação de fármacos e testes de novas estratégias terapêuticas <sup>43</sup>.

Os primeiros modelos murinos surgiram com Greaves *et al.* (1990) e Ryan *et al.* (1990), a partir da inserção da sequência genética das  $\alpha$ -globina e  $\beta$ -globina S humanas. Entretanto, estes modelos expressavam hemoglobina murina e por isso as alterações hematológicas eram discretas e não havia repercussão multissistêmica evidente <sup>44-46</sup>.

Em seguida, foi criado um animal com os genes da  $\alpha 2$ -globina humana e da  $\beta 2$ -globina S SAD (HbSAD), conhecido como camundongo SAD. Esta HbSAD possui, além da mutação falciforme, outras duas mutações nomeadas Antilhas b23-I e D-Punjab b121-N que potencializam a polimerização da HbS em baixa tensão de oxigênio, facilitam a falcização das hemácias e provocam alterações patológicas nos animais, entretanto, este modelo ainda expressava as globinas murinas <sup>47</sup>.

Em 1997, os primeiros camundongos transgênicos para a mutação falciforme e livres de hemoglobina murina foram descritos por Paszty *et al.* (1997) e Ryan *et al.* (1997). Além do *knockout* dos genes das globinas murinas adultas, ambos os modelos possuem a inserção de transgenes contendo a  $\beta$ -globina humana mutada associada à outras globinas <sup>48-49</sup>. O modelo murino descrito por Paszty, conhecido como camundongo Berkeley, é um animal *knockout* transgênico, homocigoto nulo para as  $\alpha$  e  $\beta$ -globinas murinas e capaz de expressar as  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\gamma$  e  $\beta S$ -globinas humanas devido a inserção de três fragmentos de DNA humano contidos no transgene [Tg(HuminiLCR $\alpha 1^{\gamma} \gamma^{\delta} \beta^S$ )] <sup>48</sup>. O modelo descrito por Ryan, conhecido com Townes, também é um animal *knockout* transgênico, homocigoto nulo para as  $\alpha$  e  $\beta$ -globinas murinas e capaz de expressar as  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\beta S$ -globinas humanas devido a inserção de um fragmento contendo a região de controle do locus (LCR) da  $\beta$ -globina humana associado aos genes da  $\alpha 1$ ,  $\gamma$  e  $\beta S$ -globinas humanas <sup>49</sup>.

Os camundongos Townes foram construídos com base na troca da  $\alpha$ -globina murina por  $\alpha$ -globina humana [Hbatm1(HBA)Tow] e na troca da  $\beta$ -globina murina por genes da  $\gamma$ - e  $\beta S$ -globina humana (camundongo Townes-SS) ou  $\gamma$ - $\beta A$ -globina humana (Townes-AA) <sup>50</sup>. Os



animais Townes-AA são camundongos humanizados para a produção restrita de hemoglobinas humanas na sua fase adulta e podem ser utilizados como controle dos camundongos Townes-SS que possuem um genótipo e fenótipo que mimetizam a AF humana <sup>49-50</sup>.

Dentre as repercussões causadas pela inserção do gene da  $\beta$ S-globina humana falciforme nos animais Townes-SS pode-se destacar: falcização de hemácias, hemólise intravascular, anemia grave e reticulocitose, além de danos teciduais como: i) congestão, áreas de necrose focal e deposição de hemossiderina no fígado; ii) congestão com presença de eritrócitos falcizados que resultam em degenerações vasculares, tubulares e glomerulares nos rins; e iii) esplenomegalia por uma expansão da polpa vermelha, vaso-oclusão e alteração na estrutura folicular linfóide no baço. Por fim, a esplenomegalia também está associada a uma hematopoese extramedular esplênica característica dos modelos murinos para estudo da anemia falciforme e que deve ser considerada, sobretudo, em estudos que envolvam o sistema hematopoético <sup>49-50</sup>.

### 1.3 O Sistema Hematopoético

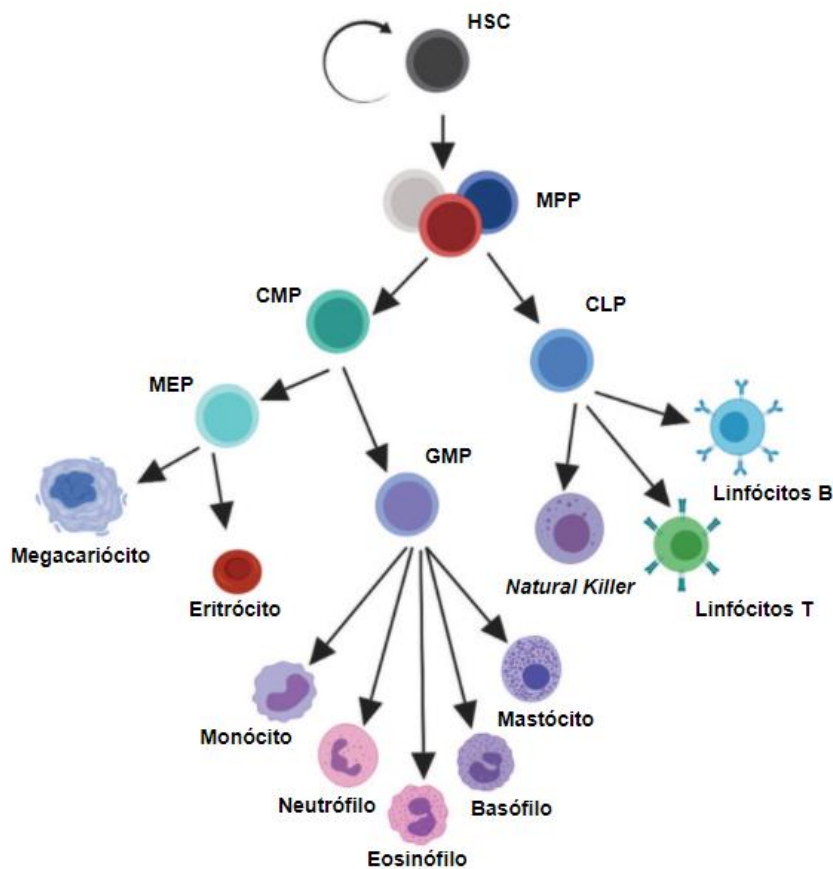
O sistema hematopoético é o responsável pela produção de todas as células sanguíneas da vida de um indivíduo em condições de homeostase ou estresse, seja ele traumático, infeccioso, metabólico ou tóxico. Sua atividade está baseada na autorrenovação e na diferenciação da HSC em progenitores que originarão: i) células linfóides, componente do sistema imune inato e adaptativo; ii) eritrócitos, transportadores de oxigênio; e iii) megacariócitos e plaquetas, que interrompem o sangramento e organizam o reparo tecidual <sup>51</sup>. As HSC são células-tronco multipotentes residentes, normalmente, na MO dos mamíferos adultos e são as únicas células capazes de produzir todas as linhagens de células sanguíneas <sup>52</sup>. Seu perfil fenotípico consensual é baseado no seguinte painel de conjunto de moléculas de superfície celular: Lin-/CD34+/CD38-/CD90+/CD45RA- para HSC do sangue de cordão umbilical e da MO de humanos <sup>53</sup>. Para HSC da MO murina o painel é Lin-/Sca-1+/c-Kit+/Flk2-/CD48-/CD150+/CD34- <sup>54</sup>.

Em homeostase, grande parte das HSC permanecem em um estado de dormência, conhecido como quiescência. A quiescência é um mecanismo protetivo que limita a replicação e o estresse que pode causar o declínio funcional e envelhecimento celular <sup>55-56</sup>.

Quando estimuladas à diferenciação, as HSC se comprometem em progenitores multipotentes (MPP). Os MPP ainda são capazes de produzir todas as células sanguíneas, mas não possuem uma eficiente capacidade de autorrenovação. Em seguida, os MPP originam

células mais comprometidas que são os progenitores mieloides comuns (CMP) e os progenitores linfoides comuns (CLP). Os CLP se comprometem em linfócitos T, linfócitos B e células *Natural Killer* (Figura 3). Os CMP seguem o processo de diferenciação e se comprometem em progenitores de granulócitos-macrófagos (GMP) e progenitores de megacariócitos-eritróides (MEP). Os GMP originarão macrófagos e granulócitos. Já os MEP, os eritrócitos e megacariócitos (Figura 3) <sup>51</sup>.

**Figura 3.** Diferenciação das HSC em células sanguíneas maduras.



Representação do comprometimento das HSC em células maduras. Inicialmente, as HSC se diferenciam em progenitores multipotentes (MPP). Os MPP originam os progenitores mieloides comuns (CMP) e os progenitores linfoides comuns (CLP). Os CLP se comprometem em linfócitos T, linfócitos B e células *Natural Killer*. Os CMP se comprometem em progenitores de granulócito-macrófagos (GMP) e progenitores de megacariócitos-eritrócitos (MEP). Os GMP dão origem aos granulócitos e macrófagos e os MEP dão origem aos eritrócitos e megacariócitos e os últimos, às plaquetas. Fonte: adaptado de Oakley C. Olson, Yoon-A Kang, Emmanuelle Passegué, 2020 <sup>34</sup>.

Entretanto, algumas das vias de comprometimento celular podem envolver outros tipos de células intermediárias com diferenças morfológicas e imunofenotípicas já conhecidas. Exemplo disso é a diferenciação dos MEP em eritrócitos. Neste caso, os MEP originarão primeiramente a proeritroblastos, que se dividem e diferenciam em eritroblastos basofílicos. Os eritroblastos basofílicos sofrem nova divisão e originam eritroblastos policromáticos e os

últimos fazem uma última divisão e se comprometem em eritroblastos ortocromáticos. Os eritroblastos ortocromáticos iniciam o processo de condensação e lateralização do núcleo que será eliminado originando os reticulócitos e, por fim, os eritrócitos <sup>57</sup>.

Em condições homeostáticas, este orquestrado sistema produz aproximadamente um trilhão de células diárias na MO de um humano adulto <sup>58-59</sup>. Porém, o resultado da diferenciação das HSC pode ser alterado em situações de estresse ou desafio biológico, como traumas ou infecções. Tais eventos enviam o comprometimento da HSC por meio de sinais extrínsecos, a fim de atender a demanda celular criada. O fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ 1), por exemplo, estimula a diferenciação das HSC em linhagem mieloide enquanto a presença de interleucina 7 (IL-7) reduz este estímulo <sup>60-61</sup>. Porém, a capacidade adaptativa do sistema hematopoético de ajustar-se às necessidades de produção de células sanguíneas depende da proteção das HSC. Uma população estável de HSC saudáveis geneticamente é requerida para a função vitalícia do sistema hematopoético e o microambiente intramedular, conhecido como nicho hematopoético, é fundamental para a manutenção desta população <sup>51</sup>.

#### **1.4 O Nicho Hematopoético e a regulação das HSC**

O nicho hematopoético é um microambiente altamente controlado, responsável pela manutenção de quiescência, proliferação e diferenciação das HSC <sup>62-63</sup>. Este nicho promove, no interior da MO, uma interação entre as HSC, diversos outros tipos celulares e a matriz extracelular por meio de fatores solúveis, estímulos físicos e mecânicos que juntos regulam o sistema hematopoético <sup>64-66</sup>.

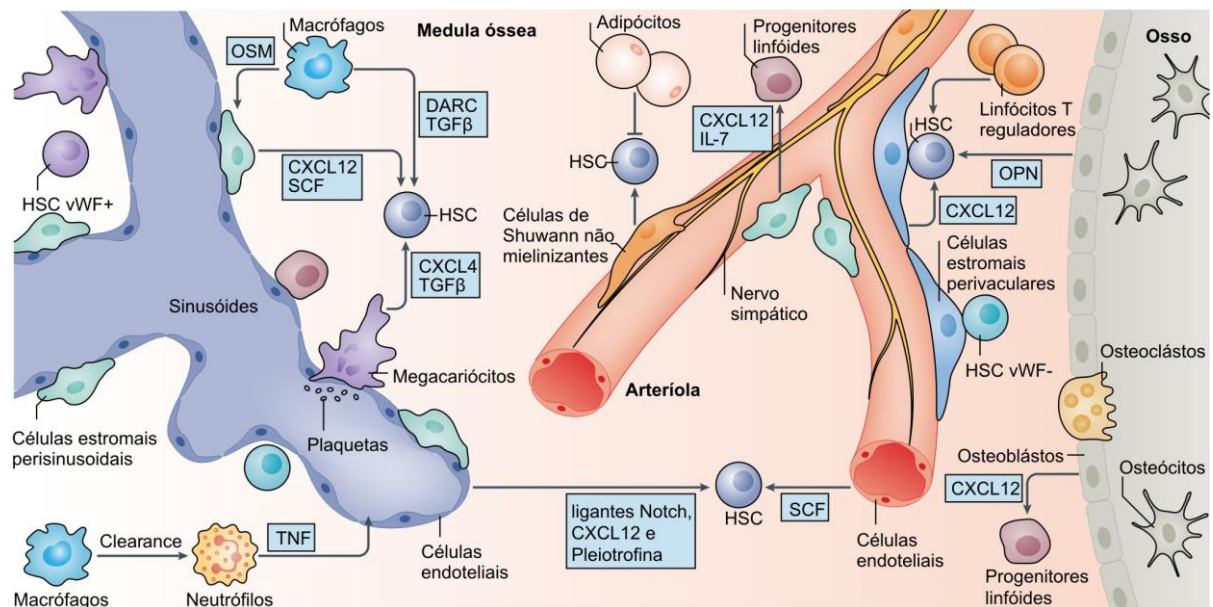
A população celular formadora do nicho é heterogênea e ainda não está totalmente definida. Entretanto, alguns tipos celulares já tiveram sua atividade e presença claramente associada ao nicho e às HSC. Dentre eles, estão: i) células estromais mesenquimais associadas às arteríolas e aos sinusóides que atuam na retenção, endereçamento e manutenção das HSC; ii) as células de linhagem osteogênica, adipócitos e células endoteliais que estão relacionadas à regulação das HSC; iii) as células de Schwann não mielinizante que auxiliam na quiescência das HSC com base na sinalização com TGF- $\beta$ ; e iv) os próprios nervos adrenérgicos do sistema nervoso simpático, que controlam a mobilização das HSC <sup>63,66-68</sup> (Figura 4).

A população de células estromais que compõem o microambiente da MO é heterogênea. Ainda que todas atuem de forma semelhante e conjunta na regulação das HSC, podemos dividir as células estromais em: i) células reticulares abundantes em CXCL12 (CAR, do inglês,

*abundant reticular cells*), ii) células estromais com baixa expressão de nestina ( $NES^{low}$ ); iii) células estromais com alta expressão de nestina ( $NES^{high}$ ); iv) células positivas para o receptor de leptina ( $LepR^+$ ), v) células estromais positivas para o antígeno neural-gliial 2 ( $NG2^+$ ); e vi) células positivas para a cadeia pesada 11 da miosina ( $MYH11^+$ ) (Figura 4).

Além dos tipos celulares já mencionados, algumas células oriundas da diferenciação das HSC podem regular de forma direta ou indireta este nicho, auxiliando na manutenção de suas progenitoras. Neste processo, destacam-se: os macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, que podem atuar diretamente sobre HSC ou estimulando células estromais; e os megacariócitos, capazes de induzir o estado de quiescência das HSC por meio da expressão de CXCL4 e  $TGF\beta$  <sup>63, 69-71</sup> (Figura 4).

**Figura 4.** Nicho hematopoético intramedular em homeostase.



Representação do nicho hematopoético intramedular composto por diversos tipos de células e fatores que atuam direta ou indiretamente na manutenção e comprometimento da HSC. É possível observar a presença de diversos fenótipos de células estromais mesenquimais periarteríolares como as: células com alta expressão de nestina ( $NES^{high}$ ), células estromais positivas para o antígeno neural-gliial 2 ( $NG2^+$ ) e células positivas para a cadeia pesada 11 da miosina ( $MYH11^+$ ), além de outros fenótipos de células estromais mesenquimais perisinusoidais como as: células com baixa expressão de nestina ( $Nes^{low}$ ), células reticulares abundantes em expressão de CXC- ligante de quimiocina 12 (CXCL12) (CAR) e as células positivas para receptor de leptina ( $LEPR^+$ ), todas atuando na manutenção de HSC com a expressão, sobretudo, de CXCL12 e SCF. Os nervos do sistema nervoso simpático (SNS) atuam na mobilização de HSC e as células de Schwann não mielinizantes atuam na manutenção de quiescência das HSC. Os osteoblastos são potencialmente associados à regulação das HSC e dos progenitores linfóides. Os adipócitos podem afetar negativamente a manutenção de HSC. Os macrófagos, neutrófilos, células T reguladoras (Treg) e megacariócitos atuam na manutenção ou mobilização do HSC. AS HSC podem ser positivas ou negativas para o fator de Von Willebrand ( $vWF-GFP^+$ ) ou ( $vWF-GFP^-$ ) de acordo com sua localização no nicho. DARC, receptor de antígeno duffy para quimiocinas; IL-7, interleucina-7; OPN, osteopontina; OSM, oncostatina M; SCF, fator de células-tronco;  $TGF\beta$ , crescimento transformador fator-  $\beta$ ; TNF, fator de necrose tumoral. Fonte: adaptado de Pinho, S., Frenette, P.S., 2019 <sup>78-79</sup>.

Estudos a respeito da localização, composição e funcionalidade do nicho intramedular indicam a existência de pelo menos dois nichos distintos na MO. O primeiro, nomeado “Nicho Endosteal”, se localiza próximo ao osso e abriga uma pequena porção das HSC presentes na MO. Estas HSC permanecem quiescentes devido aos fatores liberados por uma população de MSC e osteoblastos, além de outras moléculas de adesão potenciais promotoras de quiescência quando superexpressas. O segundo, conhecido como “Nicho Perivascular”, se localiza na região mais central da MO e tem sido tradicionalmente associado à proliferação e diferenciação de HSC, com posterior saída das células sanguíneas para a circulação. Porém, apesar das diferenças citadas, os componentes celulares e não celulares de ambos os nichos trabalham juntos na manutenção do equilíbrio do nicho e homeostase hematopoética <sup>63,66,45,72</sup>.

Ainda que a MO seja o sítio primário da hematopoese em mamíferos adultos, o estresse hematopoético severo causado por: anemias, mielofibrose, gestação, infecções, mieloablação e infarto do miocárdio, podem estimular a hematopoese extramedular.

Nestas circunstâncias, as HSC são mobilizadas para regiões extramedulares e o baço destaca-se como importante sítio de migração das HSC em camundongos e humanos adultos <sup>64, 73-76</sup>. Tal proposta foi reforçada em um estudo feito em camundongos com hematopoese extramedular induzida por mieloablação, perda de sangue ou gravidez que demonstrou a presença de HSC principalmente ao redor dos sinusóides da polpa vermelha. Adicionalmente, foi observada a presença de células estromais esplênicas e células endoteliais produtoras de SCF e CXCL12 nos locais para onde as HSC migraram. Com isso, a eficiente hematopoese esplênica e presença das células estromais e endoteliais sugeriu a existência de um nicho perisinusoidal esplênico <sup>63,76-78</sup>.

### **1.5 Células estromais mesenquimais multipotentes**

No início da década de 70, Friedenstein *et al.* (1974) descreveram o isolamento de uma população celular da MO e do baço de porquinhos-da-Índia. Embora isoladas de locais distintos, as populações se mostraram semelhantes em aspectos como aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide e crescimento em colônias quando plaqueadas em baixa densidade. A diferença entre elas se deu em relação ao potencial de diferenciação osteogênica <sup>80</sup>.

Em 1991, estas células receberam o nome de células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*) devido a sua habilidade de originar linhagens celulares mesodérmicas <sup>81</sup>. Porém, em 2016, a Sociedade Internacional de Terapia Celular determinou os critérios básicos para definir as MSC humanas e indicou o uso do termo “Células Estromais

Mesenquimais Multipotentes” (com manutenção da sigla MSC) para as células isoladas e caracterizadas *in vitro* <sup>82</sup>.

Definidas como uma população celular clonogênica, multipotente, com potencial de diferenciação em tipos celulares de origem mesodérmica, tais como: adipócitos, osteócitos e condrócitos, as MSC têm sido utilizadas para diversas aplicações clínicas e estudos pré-clínicos. O uso destas células na terapia baseia-se, sobretudo, em sua capacidade de diferenciação em tecidos ósseos e cartilagosos e sua atividade parácrina <sup>82-83</sup>.

Adicionalmente, as MSC são consideradas cada vez mais importantes na composição do microambiente da MO e regulação do sistema hematopoético. A relação entre as MSC e as HSC foi sugerida inicialmente por Friedenstein e cols. (1974) depois que seus estudos demonstraram a capacidade das progenitoras estromais, isoladas da MO e do baço, de organizar um microambiente hematopoético heterotópico. Atualmente, sabe-se que a população de células estromais na MO é heterogênia e a interação entre os diversos fenótipos de MSC e as HSC ocorre, sobretudo, por meio de fatores solúveis, com destaque para o CXCL12, SCF e a interleucina 7 (IL-7), que atuam na retenção, manutenção e proliferação das HSC <sup>79,84-85</sup>.

O papel regulatório das MSC sobre a HSC não se restringe à MO. Em 2015, Inra e col. caracterizaram o nicho extramedular perisinusoidal esplênico e encontraram uma população de MSC (PDGFR- $\beta^+$  e TCF21<sup>+</sup>) produtoras de CXCL12 e SCF nos sinusóides da polpa vermelha. Os resultados demonstraram grande proximidade espacial entre as MSC e as HSC, além de um aumento da frequência e número de ambas nos momentos em que a hematopoese extramedular foi estimulada, comprovando a ligação destas MSC com a regulação das HSC também fora da MO <sup>76</sup>.

Como um componente do nicho hematopoético, as MSC podem ter seu comportamento alterado em condições patológicas. Exemplo disso, é a queda da capacidade proliferativa, clonogênica e de suporte da hematopoese descrita em MSC de pacientes com anemia aplástica <sup>86</sup>; a redução na expressão de moléculas de superfície celular envolvidas na interação das MSC com as HSC e progenitores hematopoéticos na síndrome mieloproliferativa <sup>87-89</sup>; e a deficiência de proliferação das MSC, adesão do enxerto de HSC e a formação de osteócitos alterados em camundongos modelo da anemia de Fanconi <sup>90-91</sup>. Além disso, outros estudos sugerem que as MSC do nicho intramedular podem agir ativamente na fisiopatologia de algumas enfermidades, como na mielofibrose primária, que apresenta fortes indícios do envolvimento das MSC na modelagem do fenótipo da doença <sup>72</sup>.

Baseado neste contexto, este trabalho relacionou o impacto do estado inflamatório crônico e os danos sistêmicos causados pela AF com as alterações na manutenção e no perfil de diferenciação das HSC e das demais células que compõem o nicho hematopoético, com foco nas MSC. Adicionalmente, foi observado o comportamento da AF ao longo da vida do modelo animal e os impactos do tratamento com HU sobre o fenótipo da doença e sobre as células dos nichos.

Para tanto, foi utilizado o modelo murino para AF (Townes) em diferentes estágios de desenvolvimento: jovem (30 dias), após a maturidade sexual (60 dias) e após o quinto mês de vida (150 dias) em análises que abrangeram: as repercussões sanguíneas (celulares e inflamatórias) decorrentes da doença, descrição da celularidade de HSC, progenitores mieloides (CMP, GMP e MEP), células envolvidas da diferenciação eritroide terminal e das populações de células não hematopoéticas da MO e da baço. Foram caracterizadas as MSC isoladas da MO dos Townes com base em seu perfil imunofenotípico, capacidade de diferenciação e perfil de expressão gênica. Por fim, após a descrição do modelo em seu estado natural, os animais foram tratados com HU para analisar as alterações promovidas pelo fármaco no sangue e nos nichos hematopoéticos dos animais, exceto as análises das BM-MS*C in vitro*.

## 2. Hipótese

A anemia falciforme altera o perfil de diferenciação das HSC e a composição celular dos nichos hematopoéticos, bem como promove alterações morfofuncionais nas MSC da MO de camundongos falcêmicos ao longo do tempo.

## 3. Justificativa

Ainda que a gênese da AF seja uma mutação pontual do gene da  $\beta$ -globina, as repercussões da doença vão além das alterações morfológicas e funcionais dos eritrócitos. A inflamação sistêmica, característica da doença, age sobre o sistema hematopoético e sobre as HSC sinalizando uma situação de estresse. Adicionalmente, as MSC e demais células do nicho hematopoético podem sofrer ou provocar alterações importantes para o curso da doença e para o sucesso das novas abordagens terapêuticas.

Com isso, a pergunta central deste estudo foi: *quais os impactos da AF sobre as populações celulares hematopoéticas e não hematopoéticas do nicho hematopoético dos camundongos falcêmicos?* Esta pergunta ganha força com a compreensão de que as alterações

causadas pela AF sobre o nicho hematopoético e seus componentes podem configurar um desafio para o sucesso de novas abordagens terapêuticas como por exemplo a terapia gênica.

Entretanto, a investigação destas alterações celulares em humanos é dificultada pela necessidade de coleta de MO. O procedimento de coleta é invasivo e clinicamente desnecessário para diagnóstico ou tratamento da AF, sendo viabilizado apenas nos indivíduos que são submetidos ao transplante, geralmente crianças. A análise da MO e do nicho hematopoético de crianças é um bom começo para o estudo das alterações relacionadas à AF, porém uma análise dos danos causados ao longo da adolescência e vida adulta seria fundamental para o aprimoramento das terapias curativas e de suporte. Neste sentido, o uso de modelos murinos em diferentes fases da vida para a caracterização celular dos nichos hematopoéticos e das MSC de modelo murino pode ser uma importante ferramenta para o estudo da MO e para o desenvolvimento e aprimoramento das terapias atuais e futuras.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo geral**

Caracterizar as populações de células hematopoiéticas e não hematopoiéticas dos nichos hematopoéticos intramedular e extramedular esplênico, bem como isolar e caracterizar as BM- MSC de camundongos falcêmicos em diferentes estágios de vida.

### **4.2 Objetivos específicos**

- 1) Analisar os parâmetros sanguíneos celulares e moleculares: i) hemograma; ii) porcentagem de reticulócitos; iii) eletroforese de hemoglobinas; iv) porcentagem de células com HbF;
- 2) Analisar as populações de HSC, progenitores mielóides, progenitores eritroides terminais, células-tronco endoteliais, células estromais mesenquimais (MSC) e células estromais não mesenquimais (CEnMSC) da MO e do baço;
- 3) Isolar BM- MSC;
- 4) Caracterizar as BM- MSC: i) morfologia; ii) imunofenotipagem; iii) diferenciação osteogênica e adipogênica; iv) perfil transcricional, no que se refere genes envolvidos na sustentação das HSC, comprometimento osteogênico e perfil inflamatório;
- 5) Analisar o perfil de citocinas plasmáticas, potencialmente associadas à inflamação e ao estresse hematopoético;
- 6) Analisar os parâmetros sanguíneos e as populações celulares após tratamento com HU.



## 5. Materiais e Métodos

### 5.1 Aspectos Éticos e Biossegurança

Este projeto foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Hemocentro de Ribeirão Preto (297/2018.017-01) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP) (001/2019-1).

### 5.2 Animais e estratégia experimental

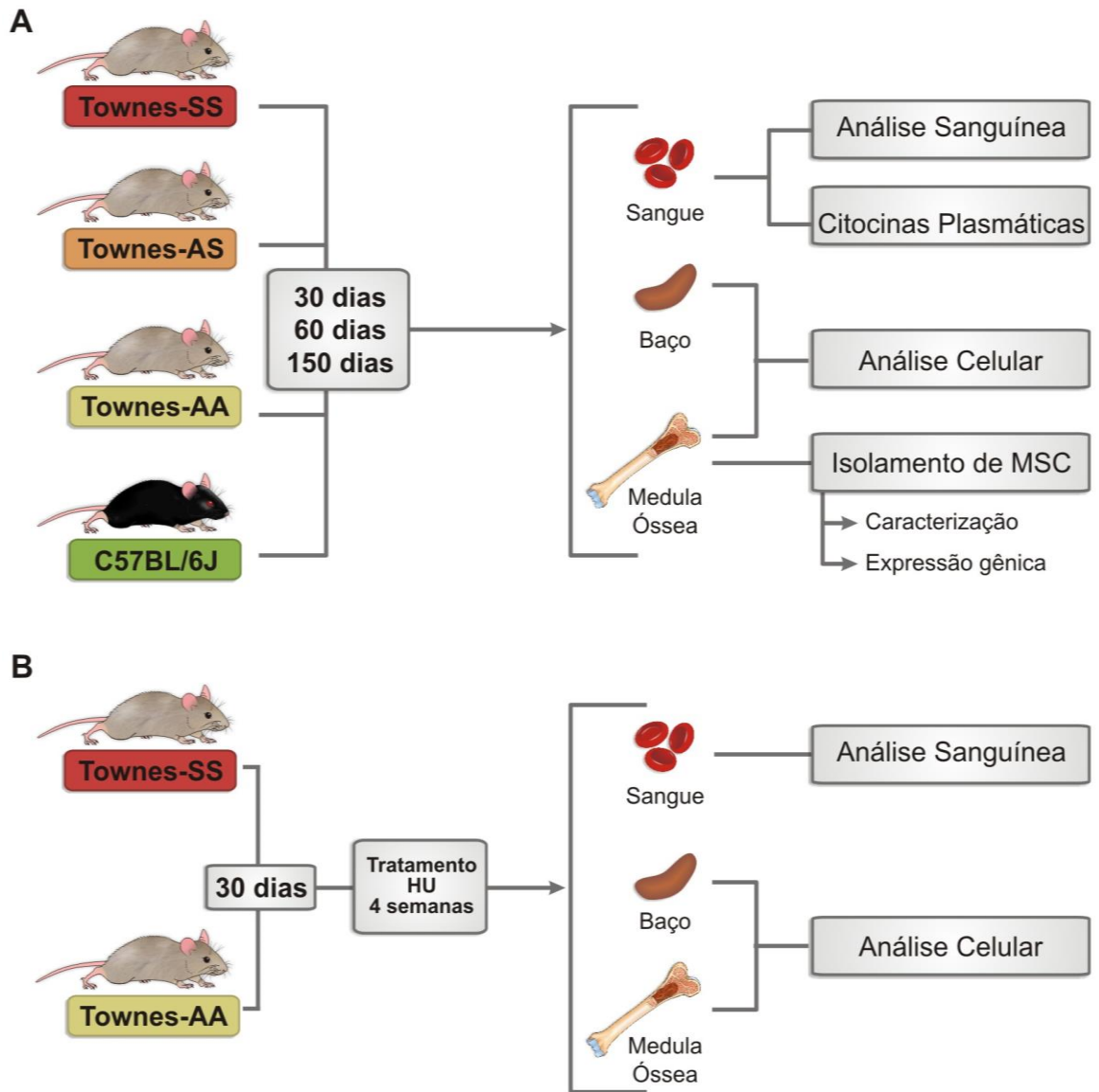
Os animais foram produzidos, mantidos e manipulados no Laboratório para Estudos em Experimentação em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto. As linhagens de camundongos utilizadas foram:

- A. Linhagem Townes-SS: referência 013071, STOCK Hbbtm2(HBG1,HBB\*) Tow/Hbbtm3(HBG1,HBB) (The Jackson Laboratory). Trata-se de um modelo animal (background misto 129/C57BL/6J) *knockout* transgênico, homocigoto nulo para a hemoglobina murina. Adicionalmente, o modelo possui a inserção do transgene Hbatm1(HBA)Tow que possibilita a expressão da  $\alpha$ -globina humana e do transgene Hbbtm2(HBG1,HBB\*)Tow que possibilita a expressão da A $\gamma$  e  $\beta$ S globinas humanas ( $\beta$  falciforme).
- B. Linhagem Townes-AA: referência 013071, STOCK Hbbtm2(HBG1,HBB\*)Tow/Hbbtm3(HBG1,HBB) (The Jackson Laboratory). Trata-se de um modelo animal (background misto 129/C57BL/6J) *knockout* transgênico, homocigoto nulo para a hemoglobina murina. Adicionalmente, possui a inserção do transgene Hbatm1(HBA)Tow que possibilita a expressão da  $\alpha$ -globina humana e do transgene Hbbtm3(HBG1,HBB)Tow que possibilita a expressão da A $\gamma$  e  $\beta$  globinas humanas normais. Com isso, este animal é utilizado como controle do Townes-SS.
- C. Linhagem Townes-AS: São animais *knockout* transgênicos, homocigoto nulo para a hemoglobina murina. Possuem a expressão de  $\alpha$ -globina humana e são heterocigotos para os transgenes Hbbtm2(HBG1,HBB\*)Tow e Hbbtm3(HBG1,HBB)Tow que possibilitam a expressão da  $\beta$ -globina humana falciforme e da  $\beta$ -globina humana normal.
- D. C57BL/6J: Trata-se de uma linhagem de camundongos isogênicos (*inbred*) amplamente utilizada como *background* para camundongos transgênicos e mutantes<sup>50</sup>.

Foram utilizados de 5 a 6 camundongos Townes-AS, Townes-SS com 30, 60 e 150 dias de vida para analisar as alterações hematológicas e celulares causadas pela AF e sua progressão. Para compor os grupos controles foram utilizados de 5 a 6 camundongos Townes-AA e C57BL/6 para cada condição experimental (30, 60 e 150 dias). Por fim, para compor os grupos de tratamento com HU foram utilizados 9 camundongos Townes-SS e 10 Townes-AA com 30 dias de vida.

Após atingirem as idades pré-estabelecidas ou o fim do protocolo de tratamento, os camundongos foram pesados e anestesiados com isoflurano (Cristália) (2,5% para indução e 1,5% para manutenção). Em seguida, foi feita a coleta sanguínea por punção cardíaca e eutanásia por deslocamento cervical (ainda sob efeito da anestésico). Após eutanásia, foram coletados os fêmures, as tíbias e o baço para isolamento celular. O sangue foi utilizado para o hemograma, eletroforese de globinas, contagem de reticulócitos, contagem de células com HbF e separação do plasma. O plasma foi reservado para quantificação de citocinas. Uma porção das células isoladas da MO e do baço, antes da lise, foram utilizadas para analisar as células envolvidas na diferenciação eritroide terminal. Outra porção das células da MO e do baço, após lise de eritrócitos, foram utilizadas para analisar as HSC, progenitores mieloides e células não hematopoéticas. Por fim, o restante das células isoladas da MO foi utilizado para o isolamento das BM-MSC (exceto nos animais tratados). As BM-MSC foram analisadas quanto a: i) morfologia; ii) perfil imunofenotípico; iii) capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos; e iv) perfil de expressão gênica (Figura 5).

**Figura 5.** Estratégia experimental.



Representação esquemática da estratégia experimental. Foram analisados o sangue, o baço e a medula óssea de camundongos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias de vida (A). O sangue foi utilizado para o hemograma, contagem de reticulócitos, contagem de células com HbF e separação do plasma. O plasma foi reservado para quantificação de citocinas. As células isoladas do baço e da medula óssea foram utilizadas para análise das células envolvidas na diferenciação eritroide terminal, HSC, progenitores mielóides e células não hematopoéticas. Por fim, as células isoladas da medula óssea foram utilizadas para o isolamento das MSC (BM-MS). As BM-MS foram analisadas quanto a: i) morfologia; ii) perfil imunofenotípico; iii) capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos; e iv) perfil de expressão gênica. Posteriormente, camundongos Townes-SS e Townes-AA com 30 dias de vida foram tratados com hidroxiuréia por 4 semanas (B) e submetidos à análise sanguínea e análise células dos nichos hematopoéticos. Fonte: próprio autor.

### 5.3 Análise sanguínea

Os animais foram primeiramente anestesiados. Em seguida, o sangue foi coletado por punção cardíaca e transferido para microtubos de 1,5 mL com 25 µL de heparina sódica 5.000 UI/mL (HEMofol®) e utilizado para:

- A. Eritrograma. O eritrograma foi feito utilizando um analisador hematológico veterinário Hemavet 950F (Erba Diagnostics) e determinou: a contagem de eritrócitos (RBC, do inglês *red blood cells*), o hematócrito (HCT), a quantidade de hemoglobina (HGB, do inglês *hemoglobin*), o volume corpuscular médio (MCV, do inglês *mean corpuscular volume*), a hemoglobina corpuscular média (MCH, do inglês *mean corpuscular hemoglobin*), a concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC, do inglês *mean corpuscular hemoglobin concentration*) e a amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW, do inglês *red cell distribution width*).
- B. Leucograma. O leucograma foi feito utilizando um analisador hematológico veterinário Hemavet 950F (Erba Diagnostics) e determinou a contagem de leucócitos (WBC, do inglês *white blood cell*) e a contagem diferencial de linfócitos, monócitos e granulócitos em número relativo (%) e absoluto ( $10^3/\mu\text{L}$ ).
- C. Contagem de reticulócitos e células com HbF. Para determinar os reticulócitos, reticulócitos positivos para HbF (reticulócitos HbF+) e eritrócitos positivos para HbF (eritrócitos HbF+), a papa de hemácias resultante da separação do plasma foi lavada 3 vezes em ID-CellStab (Bio-Rad). Em seguida, 3 µL de hemácias lavadas foram fixadas em solução de 1% Formaldeído 37% (Merk-Millipore) e 0.025% Glutaraldeído (Sigma-Aldrich) em PBS 1x. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes em PBS 1x e permeabilizadas com 10 mg de Octylβ-D-Glucopyranoside (Sigma-Aldrich) (diluídos em 1mL PBS 1x) por 15 minutos TA (temperatura ambiente). As células permeabilizadas foram então lavadas 3 vezes com PBS 1x e na última lavagem foi adicionado ao *pellet* 1 mL de solução de saturação (PBS 1x com 1% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) e 2% de soro de cavalo (Gibco)) por 20 min TA. Após a incubação, as células foram centrifugadas a  $2000 \times g$  por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas com anticorpos anti-HbF humana (PE) (Becton Dickinson - BD Biosciences) por 20 minutos no escuro TA. Por fim, as células foram lavadas, ressuspendidas em laranja de tiazol (BD Retic-Count™), incubadas por 30 minutos e em seguida adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD). Os dados foram analisados no *software* FlowJO™ v10.6.

#### **5.4 Análise do peso corporal e danos teciduais macroscópicos**

Imediatamente antes da eutanásia, os animais foram pesados em balança eletrônica de precisão (Micronal B6000). Após a eutanásia, foram coletados os tecidos de interesse e foi feita uma observação macroscópica geral dos órgãos da cavidade abdominal e torácica de todos os animais, com foco no fígado e no baço. Nesta análise, foram observados: aspecto, coloração e peso.

#### **5.5 Isolamento celular da medula óssea (MO)**

As células da MO foram isoladas dos fêmures e tíbias bilaterais. Para tanto, os membros foram coletados, a pele e o tecido muscular associado foi removido e os ossos obtidos foram mantidos em tampão de coleta (PBS 1x, 2% de soro fetal bovino (SFB) EDTA 1 mM (Merk-Millipore)). Inicialmente, os ossos foram cortados na epífise e diáfise e foi feita a coleta das células com *flushing* utilizando o tampão de coleta injetado sob pressão com uso de seringa de 1 mL (BD) e agulha 0,45 x 13 mm (26G x ½") (BD). A solução resultante do *flushing* foi contada. Parte das células ( $1 \times 10^6$ ) foi separada para a marcação do painel de progenitores eritroides terminais e o restante da suspensão foi reservada. Em seguida, os fragmentos ósseos remanescentes foram macerados (*crushing*) em tampão de coleta com pistilo e cadinho. O macerado ósseo foi centrifugado e o sobrenadante foi descartado. O conteúdo do tubo foi incubado durante 1 hora com tampão de digestão (10 mL de RPMI (Gibco) com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 0,25% de collagenase tipo IA (Merk-Millipore)). Logo após, foi adicionado meio  $\alpha$ -MEM (Gibco) 15% SFB (Gibco) e a solução foi peneirada em separador celular *cell strainer* de 40  $\mu$ m (Falcon). O conteúdo do *crushing* foi misturado com a solução resultante do *flushing* e a suspensão celular total foi centrifugada. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de tampão ACK para lise de eritrócitos (0,15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3 mM  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e 1 mM EDTA, pH 7,2) durante 5 minutos no gelo. Em seguida, foi acrescentado 20 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 5% de SFB (Gibco) e foi realizada uma nova centrifugação. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão de coleta para contagem. Parte das células foi utilizada para os painéis de caracterização celular da MO e o restante foi utilizado para cultura de células.

## 5.6 Isolamento celular do Baço

As células foram isoladas com o *crushing* (esmagamento) do baço em tampão de coleta utilizando duas pinças (anatômica e dente de rato) de 15 cm. Em seguida, a suspensão celular foi filtrada em separador celular (*cell strainer*) de 70 µm e posteriormente contada, sendo que  $1 \times 10^6$  células foram separadas para a marcação do painel de progenitores eritroides terminais. O restante da suspensão celular foi centrifugada a  $300 \times g$  por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado em 20 mL de tampão ACK para lise de eritrócitos durante 5 minutos no gelo. Em seguida, foi acrescentado 20 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 5% de SFB (Gibco) e foi realizada uma nova centrifugação. A suspensão celular final foi novamente quantificada e utilizada para os demais painéis de descrição celular do baço.

## 5.7 Citometria de Fluxo – Painéis de descrição das populações celulares

A análise das populações celulares dos nichos hematopoéticos baseou-se na identificação imunofenotípica das HSC, dos progenitores mieloides (CMP, GMP e MEP), dos progenitores eritroides terminais (proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos), das células-tronco endoteliais e das células estromais (MSC e células estromais não mesenquimais). Para tal, foram utilizados os seguintes painéis de anticorpos:

- A. HSC: LIN [anti-Gr1, anti-CD8, anti-CD11b, anti-B220, anti-CD3, anti-TER119] biotinilados (biolegend), estreptavidina PerCP (Biolegend), anti-c-Kit PE (Biolegend), anti-Sca-1 APC (Biolegend), anti-CD48 FITC (Biolegend) e anti-CD150 PE-Cy7 (Biolegend);
- B. Progenitores mieloides: LIN [anti-Gr1, anti-CD8, anti-CD11b, anti-B220, anti-CD3, anti-TER119] biotinilados (biolegend), Estreptavidina PerCP (Biolegend), anti-c-Kit PE (Biolegend), anti-Sca-1 APC (Biolegend), anti-CD16/32 APC-Cy7 (Biolegend), anti-CD34 FITC (BD);
- C. Progenitores eritroides terminais: anti-Gr1 biotinilado (Biolegend), anti-CD11b biotinilado (Biolegend), estreptavidina FITC (Biolegend), anti-CD45 FITC (BD), anti-Ter119 APC (BD) e anti-CD44 PE (BD);
- D. Células não hematopoéticas: anti-Ter119 FITC (BD), anti-CD71 FITC (BD), anti-CD45 FITC (BD), anti-CD31 PE-Cy7 (Biolegend), anti-Sca-1 APC (Biolegend), anti-CD51 PE (Biolegend) <sup>111</sup>.

As suspensões celulares utilizadas foram as isoladas da MO e do baço, conforme descrito nos tópicos 5.5 e 5.6. Os painéis de identificação das HSC e dos progenitores mieloides utilizaram  $3 \times 10^6$  células, o painel para identificação de células não hematopoéticas utilizou  $5 \times 10^6$  células e para a identificação dos progenitores eritroides terminais foram utilizados  $1 \times 10^6$  células (separadas antes da lise de eritrócitos). Para a marcação, as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de PBS e marcadas inicialmente com os anticorpos biotinilados por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as suspensões foram lavadas com 2 mL de PBS 1x e incubadas com estreptavidina e demais anticorpos conjugados por mais 30 minutos a 4°C. Logo após, foi feita uma última lavagem e as células marcadas foram ressuspensas em 200 - 300  $\mu$ L de PBS para aquisição. Para análise da viabilidade, os painéis de HSC e progenitores mieloides foram ressuspensos em PBS 1x com 1,15  $\mu$ g/mL de DAPI (Invitrogen) para a aquisição. Para analisar a viabilidade dos painéis de progenitores eritroides terminais e células não hematopoéticas a viabilidade foi utilizado 2  $\mu$ L de 7AAD (BD). As células foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) e os dados foram analisados no *software* FlowJO™ v10.6.

## 5.8 Cultivo e caracterização das BM-MSK

- A. Cultivo: As BM-MSK foram isoladas de acordo com o descrito no tópico 5.5 e plaqueadas inicialmente em frascos T de 75 cm<sup>2</sup> (Greiner) em densidade de  $1,3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em meio  $\alpha$ -MEM com 15% SFB (HyClone™) e 1% de associação antibiótica (penicilina e estreptomicina (Gibco)) sob condições normais de cultura (5% CO<sub>2</sub> e 95% de atmosfera úmida a 37°C). Depois de 4 dias foi feita a primeira troca total de meio. O meio de cultura foi trocado em intervalos de 3-4 dias até o décimo quarto dia. No décimo quarto dia, as células foram separadas com uso de tripsina 1x (Gibco) e plaqueadas em novos frascos T (25 ou 75 cm<sup>2</sup>) com densidade de plaqueamento de  $6,7 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> em meio  $\alpha$ -MEM 15% SFB (HyClone™) e 1% de penicilina e estreptomicina. O meio seguiu sendo trocado a cada 3-4 dias e quando as células atingiram 80 a 90% de confluência foi feita nova passagem.
- B. Morfologia: A caracterização morfológica inicial das BM-MSK baseou-se na aderência ao plástico e crescimento em colônias de células fibroblastóide. A análise seguiu com a imunofluorescência, que utilizou  $2 \times 10^4$  células cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Knittel Glase) em placas de 24 poços com meio  $\alpha$ -MEM 15% SFB (HyClone™) e 1% penicilina e estreptomicina por 48 horas. Após este período, as

células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e fixadas com solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) 4% por 15 minutos TA. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) em PBS 1X por 15 minutos TA. Para marcar o citoesqueleto, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x e incubadas por 50 minutos em solução 5:200 de Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen). Para marcar o núcleo, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e incubadas em solução de 1,15 µg/mL DAPI em PBS 1x por mais 15 minutos TA. Por fim, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando Fluoromount G (EM Sciences). As imagens de campo claro e de fluorescência foram adquiridas em fotomicroscópio Axioskop 2 plus (ZEISS) e microscópio confocal Laser scanning microscope 710 (Zeiss), respectivamente. A análise e edição das imagens foi feita no software Image J.

- C. Imunofenotipagem: As BM-MSC foram caracterizadas entre a terceira e quarta passagem (P3-P4). Foram definidas as porcentagens de células positivas para os marcadores CD29, Sca-1, CD44 e CD90.2 que são característicos de MSC de camundongos e para marcadores CD45, CD117 e CD31 que são característicos de células hematopoéticas. Para tal, frações de  $1 \times 10^5$  células em volume de 100 µL foram incubadas separadamente por 15 minutos TA ao abrigo da luz com: i) anti-Sca-1 (PE) (BD Pharmingen) e anti-CD31 (APC) (BD Pharmingen), ii) anti-CD90.2 (PE) (BD Pharmingen) e anti-CD117 (APC) (BD Pharmingen), iii) anti-CD29 (PE) (BD Pharmingen) e anti-CD45 (APC) (BD Pharmingen); e iv) anti-CD44 (PE) (BD Pharmingen). Em seguida, as células foram lavadas em PBS 1x e ressuspendidas em PBS 1xX com 1,15 µg/mL de DAPI para a aquisição. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ (BD) e os dados foram analisados no software FlowJO™ v10.6.
- D. Diferenciação em adipócitos: Foram plaqueados 6 poços de uma placa de 24 poços com  $4 \times 10^4$  células cada. As células foram cultivadas durante 15 dias em meio indutor de adipogênese ( $\alpha$ -MEM, 15% SFB (HyClone™), 1 µM de dexametasona (Sigma-Aldrich), 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e 100 µM de indometacina (Sigma-Aldrich)), com troca de meio a cada 3-4 dias. Para controle da diferenciação, outros 6 poços foram plaqueados com  $1 \times 10^3$  células cada sob as mesmas condições de cultura, porém em meio  $\alpha$ -MEM com 15% SFB (Hyclone). Após esse período, as células foram



submetidas à coloração com Oil red-O (Sigma-Aldrich) para marcação das vesículas lipídicas resultantes da diferenciação.

- E. Diferenciação em osteócitos: Foram plaqueados 6 poços de uma placa de 24 poços com  $1 \times 10^4$  células cada. Estas células foram cultivadas durante 30 dias em meio indutor de osteogênese ( $\alpha$ -MEM, 15% SFB (HyClone™), 0,1  $\mu$ M de dexametasona (Sigma-Aldrich), 10 mM de beta-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich) e 200  $\mu$ M de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich)), com a troca do meio a cada 3-4 dias. Para condição controle da diferenciação, outros 6 poços foram plaqueados com  $1 \times 10^3$  células cada sob as mesmas condições de cultura, porém em meio  $\alpha$ -MEM com 15% SFB (Hyclone). Após o período de 30 dias, as células foram coradas com Vermelho de Alizarina (Fluka Analytical), a fim de corar os depósitos de oxalato de cálcio depositados pelas células diferenciadas.

## 5.9 Perfil de expressão gênica

Para análise do perfil de expressão gênica, foram utilizadas BM-MSK P3-P4. O RNA foi coletado diretamente dos frascos de cultura (previamente lavados com PBS 1X) utilizando 350  $\mu$ L de tampão de lise (RLT) (Qiagen) adicionado de 1% de 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich) e foi extraído com *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, o RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e armazenado a  $-80$  °C.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), 1  $\mu$ g do RNA total foi submetido a transcrição reversa em cadeia de DNA complementar (cDNA) utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific) seguindo as orientações do fabricante. Uma porção do cDNA obtido foi utilizado para fazer as curvas de eficiência das sondas Taqman utilizadas e o restante foi submetido a análise da expressão gênica.

A curva de eficiência baseou-se na amplificação duplicada de cada uma das sondas de interesse acrescidas de diferentes massas (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 ng) de um *pool* de cDNA das amostras. Em seguida, o ciclo de amplificação (Cq) médio de cada concentração foi utilizado para determinar a linha de tendência. A inclinação da linha resultante da regressão linear (*slope*) foi utilizado para determinar a eficiência de cada sonda baseado na fórmula  $(2^{(-1/Slope)-1}) * 100$  (Apêndice 1).

Após a determinação da eficiência das sondas, os cDNA foram diluídos oito vezes e submetido a reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR) utilizando sondas TaqMan™

(Applied Biosystems) para os genes endógenos: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) (Mm99999915\_g1) e  $\beta$ -actina (*Actb*) (Mm00607939\_s1) e para os genes alvo: C-X-C quimiocina 12 (*Cxcl12*) (Mm00445553\_m1), angiopoietina (*Angpt1*) (Mm00456498\_m1), fator de crescimento endotelial vascular  $\alpha$  (*Vegfa*) (Mm00437306\_m1), Runt 2 (*Runx2*) (Mm00501584\_m1), osteopontina (*Spp1*) (Mm00436767\_m1), proteína homeobox DLX-6 (*Dlx6*) (Mm01166201\_m1), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (*Tnfa*) (Mm99999068\_m1), interleucina-6 (*Il6*) (Mm99999064\_m1), interleucina-10 (*Il10*) (Mm01288386\_m1). As reações foram colocadas no termociclador em tempo real QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems) e submetidas ao protocolo de ciclagem: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min e 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Após o término das reações, foram ajustados os *thresholds* de todos os genes para 0,1 e os Cq de amplificação foram utilizados para calcular os níveis relativos de expressão gênica entre as diferentes BM-MS. A análise foi baseada no cálculo de  $\Delta\Delta Ct$  ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )<sup>92</sup>, onde o Cq médio de cada gene foi subtraído do Cq médio dos dois genes endógenos para encontrar o  $\Delta Ct$ . Em seguida, o  $\Delta Ct$  de cada gene foi subtraído da média dos  $\Delta Ct$  dos três animais C57BL/6J para o gene em questão a fim de obter o  $\Delta\Delta Ct$ . Por fim foi calculado o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Desta forma, a expressão dos C57BL/6J foi ajustada a 1 e os níveis de expressão dos Townes-SS e Townes-AA serão relativos ao nível dos C57BL/6J.

### 5.10 Análise de citocinas

O plasma obtido da centrifugação do sangue a 1400 x g por 10 min foi utilizado para a quantificação de: IFN- $\gamma$ , IL-1b, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$ , VEGF- $\alpha$ , LIF e eotaxina utilizando Kit Milliplex MCYTOMAG-70K-11 (Merck-Millipore) de acordo com as indicações do fabricante. A quantificação foi feita em duplicata e o valor médio foi expresso em pg/mL.

### 5.11 Tratamento com Hidroxiuréia

Camundongos Townes-SS e Townes-AA com 30 dias foram tratados com hidroxiuréia - 50 mg/kg de HU (Sigma-Aldrich) diluída em 100  $\mu$ L de solução fisiológica 0,9% NaCl - por via intraperitoneal durante cinco dias por semana (segunda a sexta) durante quatro semanas. Após este período, os animais foram eutanasiados e submetidos à análise sanguínea, análise do peso corporal, avaliação dos danos teciduais macroscópicos e descrição das populações celulares da MO e do baço por citometria de fluxo. A dose da HU tem como base um

experimento de dose máxima tolerada e mostrou-se eficiente para redução da neutrofilia, simulando o que ocorre em humanos que normalmente recebem até 30 mg/kg/dia <sup>121</sup>.

### **5.12 Análise estatística**

A análise da diferença de médias entre grupos foi estabelecida pelo teste ANOVA de uma via com pós teste de Tukey's com nível de significância  $p < 0,05$  em todos experimentos que envolveram comparação entre mais de dois grupos. Os dados de expressão gênica e do tratamento com HU, que compararam dois grupos, foram analisados com Teste T não pareado. Os gráficos e análises estatísticas foram gerados no *software* GraphPad Prism versão 8.0.2.

## **6. Resultados**

Os resultados obtidos foram divididos em cinco seções, sendo elas: 6.1 Impactos da AF sobre órgãos e células maduras; 6.2 Impactos da AF sobre as células dos nichos hematopoéticos intramedular e extramedular esplênico; 6.3 Impactos da AF sobre as BM-MSK; 6.4 Perfil de citocinas plasmáticas dos camundongos falciformes; e 6.5 Impactos da HU sobre as células dos nichos hematopoéticos. As seções foram organizadas com a finalidade de mostrar, inicialmente, os impactos gerais e já conhecidos da AF nos animais e seguir com as análises mais aprofundadas do sangue, baço e MO.

### **6.1 Impactos da AF sobre órgãos e células maduras**

#### **6.1.1 Análise do peso corporal e lesões teciduais macroscópicas.**

A análise dos animais utilizados neste estudo começou pelo peso vivo. Aos 30 dias de vida, os animais saudáveis da linhagem Townes (Townes-AA) apresentaram maior peso vivo ( $17,21 \pm 0,12$  g) que os Townes-AS ( $14,59 \pm 1,87$  g) e Townes-SS ( $14,15 \pm 1,14$  g) (Figura 6A). Aos 60 e 150 dias de vida, não houve diferença de peso vivo entre os diferentes genótipos da linhagem Townes. Entretanto, os Townes demonstraram possuir maior peso vivo que os C57BL/6J quando adultos (Figura 6A).

A análise macroscópica visual *post mortem* dos órgãos abdominais indicou acentuada esplenomegalia nos Townes-SS quando comparado aos Townes-AS e Townes-AA (Figura 7A). Aos 30 dias, o peso médio do baço dos Townes-SS ( $0,59 \pm 0,07$  g) foi duas vezes maior que dos Townes-AS ( $0,24 \pm 0,04$  g) e dos Townes-AA ( $0,23 \pm 0,03$  g) e sete vezes maior que dos C57BL/6J ( $0,07 \pm 0,02$  g) (Figura 6B). Aos 60 dias, o peso esplênico dos Townes-SS ( $1,63 \pm 0,36$  g) tornou-se quase quatro vezes maior do que dos Townes-AS ( $0,34 \pm 0,04$  g), sete vezes

maior que dos Townes-AA ( $0,23 \pm 0,04$  g) e 20 vezes maior em relação ao C57BL/6J ( $0,08 \pm 0,01$  g) (Figura 6B). Por fim, aos 150 dias o baço dos Townes-SS ( $1,77 \pm 0,14$  g) foi seis vezes maior que dos Townes-AS ( $0,24 \pm 0,04$  g) e dos Townes-AA ( $0,27 \pm 0,07$  g) e quase 20 vezes maior que dos C57BL/6J ( $0,09 \pm 0,01$  g) (Figura 6B). Adicionalmente, foram observados pequenos focos circulares e bem delimitados de coloração acinzentada no baço dos Townes-SS com 60 e 150 dias de vida (Figura 7C).

A análise dos órgãos seguiu para o fígado que não revelou diferença visual ou no peso hepático médio entre os animais aos 30 dias. Aos 60 dias, foi observado um discreto aumento no tamanho e na intensidade da coloração do fígado dos Townes-SS (Figura 7B e 7D). Com relação ao peso, o fígado dos Townes-SS ( $2,09 \pm 0,16$  g) apresentou maior peso médio que dos Townes-AS ( $1,53 \pm 0,19$  g), Townes-AA ( $1,46 \pm 0,27$  g) e C57BL/6J ( $1,19 \pm 0,26$  g) (Figura 6C). Por fim, aos 150 dias, o peso hepático médio dos Townes-SS ( $2,31 \pm 0,53$  g) foi maior frente aos Townes-AS ( $1,67 \pm 0,27$  g), Townes-AA ( $1,57 \pm 0,28$  g) e C57BL/6J ( $1,15 \pm 0,07$  g) e a diferença na coloração tornou-se mais evidente (Figura 6C).

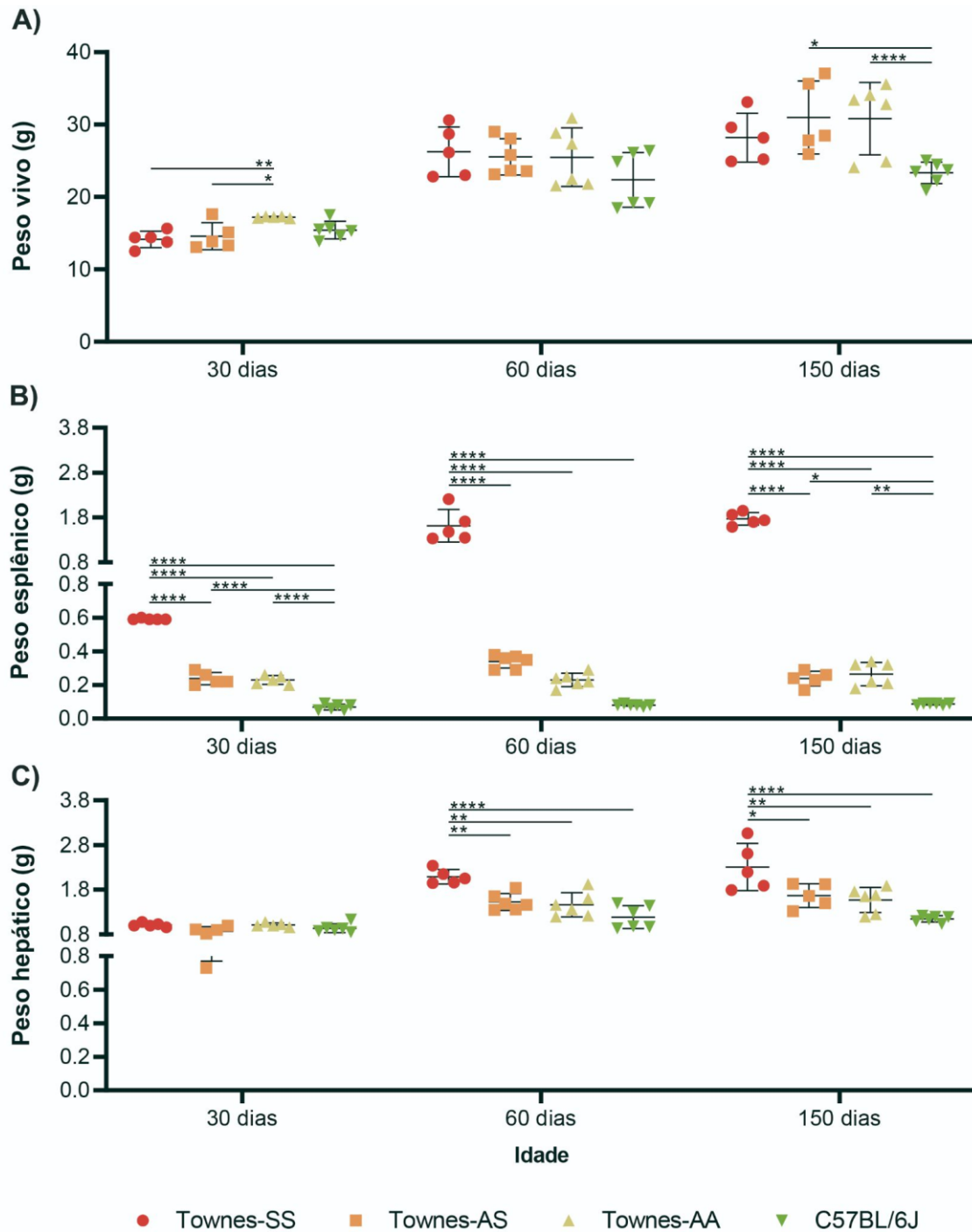
### **6.1.2 Análise sanguínea - Eritrograma.**

Em seguida, a análise sanguínea revelou que os Townes-SS ( $5,93 \pm 0,52 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) tinham menor número de células vermelhas aos 30 dias quando comparado aos Townes-AS ( $8,27 \pm 0,81 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), Townes-AA ( $9,44 \pm 0,44 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) e C57BL/6J 60 ( $7,85 \pm 0,46 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) (Figura 8A). Aos 60 dias, a redução no RBC dos Townes-SS ( $5,79 \pm 1,17 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) tornou-se maior em comparação aos Townes-AS ( $8,23 \pm 1,53 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), Townes-AA ( $10,49 \pm 0,36 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) e C57BL/6J 60 ( $8,75 \pm 0,63 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) (Figura 8A). Aos 150 dias, o RBC médio dos Townes-SS ( $4,99 \pm 1,75 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) continuou menor que o encontrado nos Townes-AS ( $9,68 \pm 1,82 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), Townes-AA ( $9,99 \pm 0,65 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) e C57BL/6J 60 ( $8,75 \pm 0,36 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) e semelhante ao dos 60 dias de vida (Figura 8A). Além disso, os Townes-AS possuíram menor RBC que os Townes-AA com 30 e 60 dias e estes por sua vez possuíram maior RBC que os animais C57BL/6J (Figura 8A).

Com relação a HGB, os Townes-SS ( $7,45 \pm 0,59$  g/dL) demonstraram menor média que os Townes-AS ( $9,37 \pm 0,78$  g/dL), Townes-AA ( $10,38 \pm 0,42$  g/dL) e C57BL/6J ( $14,05 \pm 2,12$  g/dL) aos 30 dias (Figura 8B). Essa redução na HGB dos Townes-SS ( $8,44 \pm 1,48$  g/dL) comparado aos Townes-AS ( $11,27 \pm 0,45$  g/dL), Townes-AA ( $11,37 \pm 0,46$  g/dL) e C57BL/6J ( $13,17 \pm 1,10$  g/dL) foi mantida aos 60 dias (Figura 8B). Aos 150 dias, todos os animais apresentaram leve redução na média da HGB em relação ao observado aos 60 dias, porém a

diferença entre os Townes-SS ( $6,35 \pm 2,04$  g/dL) e os Townes-AS ( $10,50 \pm 2,15$  g/dL), Townes-AA ( $10,28 \pm 0,90$  g/dL) e C57BL/6J ( $12,55 \pm 0,31$  g/dL) foi mantida (Figura 8B). Adicionalmente, observou-se maior HGB nos animais C57BL/6J em comparação aos Townes em todas as idades analisadas (Figura 8B).

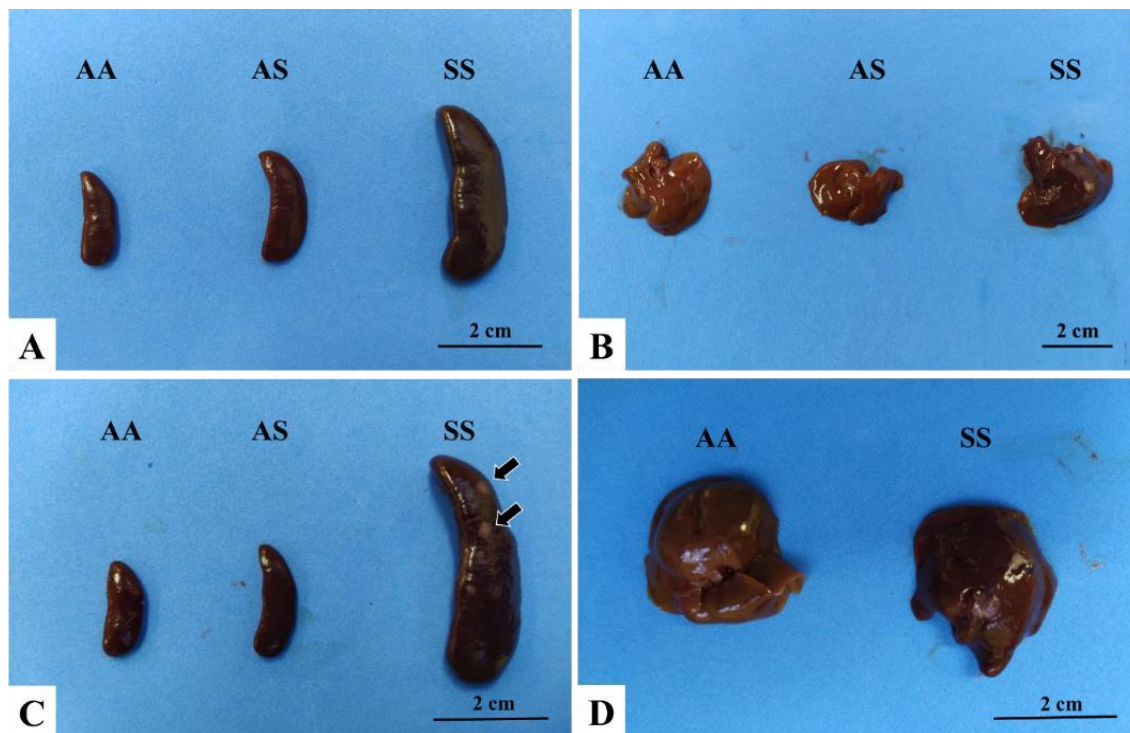
**Figura 6.** Peso vivo, peso esplênico e peso hepático.



Distribuição do peso vivo médio (A), peso esplênico médio (B) e peso hepático médio (C) dos camundongos Townes-SS (n=5), Townes-AS (n=6), Townes-AA (n=5) e C57BL/6J (n=6) com 30, 60 e 150 dias de vida. Os

dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Fonte: próprio autor.

**Figura 7.** Registro fotográfico dos baços e fígados.



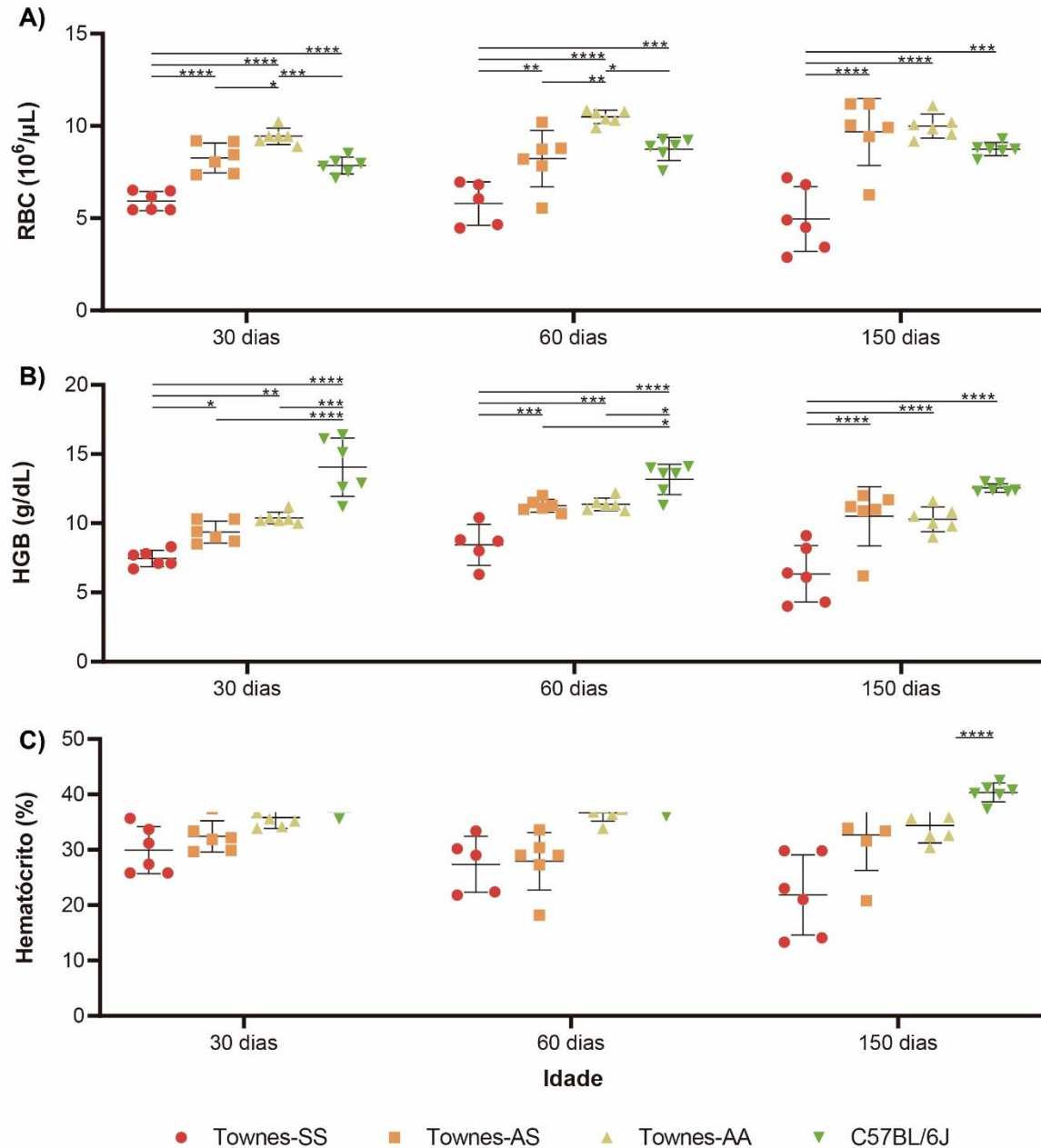
Registro fotográfico comparativo do baço e do fígado dos camundongos Townes-AA, Townes-AS e Townes-SS. (A) Baços dos camundongos Townes-AA, Townes-AS e Townes-SS com 60 dias de vida; (B) os fígados de camundongos Townes-AA, Townes-AS e Townes-SS com 60 dias de vida; (C) Baços dos camundongos Townes-AA, Townes-AS e Townes-SS com 150 dias de vida. As setas apontam regiões de degeneração; (D) Fígados de camundongos Townes-AA e Townes-SS com 60 dias apresentam diferença de coloração, indicativa de congestão. Fonte: próprio autor.

O mesmo perfil foi observado na análise do hematócrito. Como esperado, os Townes-SS ( $29,93 \pm 4,23$  %) possuíram menor porcentagem de células vermelhas em relação ao volume de sangue quando comparado aos Townes-AA ( $35,80 \pm 1,95$  %) e C57BL/6J 60 ( $39,23 \pm 2,34$  %) com 30 dias (Figura 8C). A redução do hematócrito dos Townes-SS ( $27,26 \pm 5,07$  %) tornou-se mais expressiva aos 60 dias. Nesta idade os Townes-AS ( $27,92 \pm 5,2$  %) também apresentaram valores abaixo do encontrado nos Townes-AA ( $36,70 \pm 1,50$  %) e C57BL/6J ( $41,95 \pm 3,17$  %) (Figura 8C). Por fim, aos 150 dias, os Townes-SS ( $21,83 \pm 7,23$  %) apresentaram novamente hematócrito menor do que os Townes-AS ( $32,67 \pm 6,39$  %), Townes-AA ( $34,38 \pm 3,16$  %) e C57BL/6J ( $40,35 \pm 1,70$  %) (Figura 8C).

O MCV dos Townes-SS ( $50,98 \pm 2,87$  fL) e C57BL/6J ( $50,28 \pm 0,61$  fL) foi maior que o encontrado nos Townes-AS ( $39,86 \pm 1,17$  fL) e Townes-AA ( $37,78 \pm 0,53$  fL) com 30 dias (Figura 9A). Aos 60 dias, o MCV dos Townes-SS ( $47,16 \pm 1,77$  fL) e C57BL/6J ( $48,03 \pm 0,57$

fL) continuaram maior que dos Townes-AS ( $34,02 \pm 1,13$  fL) e Townes-AA ( $35,03 \pm 0,49$  fL) (Figura 9A). O mesmo foi observado aos 150 dias (Figura 9A).

**Figura 8.** Contagem de células vermelhas, quantidade de hemoglobina e hematócrito.



Distribuição da contagem de células vermelhas (do inglês, *red blood cells*, RBC) (A), quantidade de hemoglobina (do inglês, *hemoglobin*, HGB). (B) e valor do hematócrito (C) dos camundongos Townes-SS (n=6), Townes-AS (n=6), Townes-AA (n=6) e C57BL/6J (n=6) com 30, 60 e 150 dias de vida. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

A média da MCH aos 30 dias foi semelhante entre Townes-SS ( $12,55 \pm 0,45$  pg), Townes-AS ( $11,30 \pm 0,27$  pg) e Townes-AA ( $10,97 \pm 0,23$  pg) e maior nos C57BL/6J ( $17,85 \pm 2,63$  pg) (Figura 9B). Essa menor MCH dos Townes-SS, Townes-AS e Townes-AA ( $10,97$

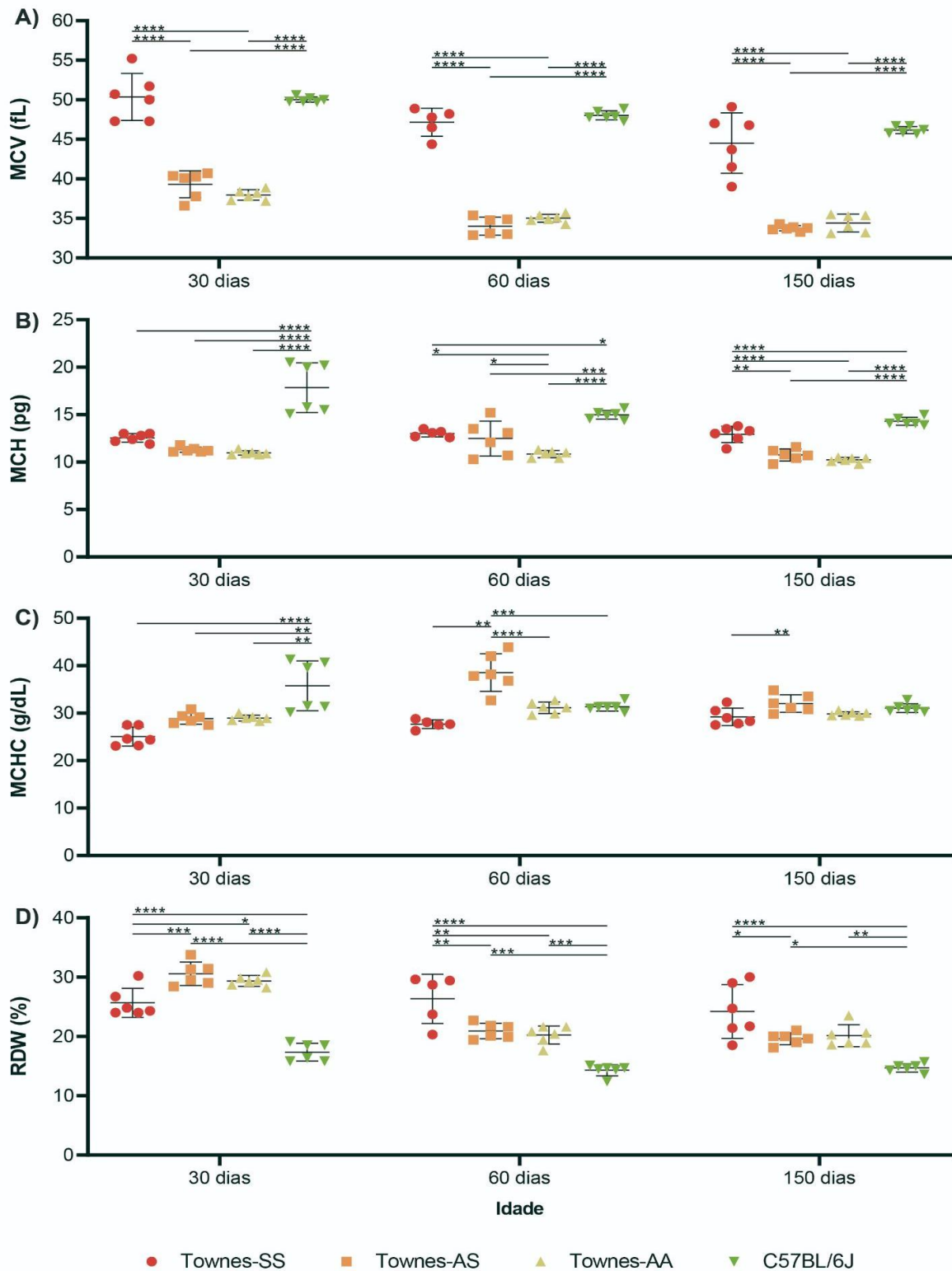
$\pm 0,23$  pg) frente aos C57BL/6J ( $14,98 \pm 0,46$  pg) foi mantida até aos 60 dias, porém nesta idade a MCH dos Townes-AA foi menor que dos Townes-SS e Townes-AS (Figura 9B). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $12,92 \pm 0,87$  pg) apresentaram menor MCH que os C57BL/6J ( $14,30 \pm 0,41$  pg), porém seu MCH foi maior do que o encontrado nos Townes-AS ( $10,75 \pm 0,63$  pg) e Townes-AA ( $10,23 \pm 0,26$  pg) (Figura 9B).

As MCHC dos Townes-SS ( $25,05 \pm 1,99$  pg), Townes-AS ( $30,57 \pm 1,20$  g/dL) e Townes-AA ( $28,97 \pm 0,60$  g/dL) foram menores que dos C57BL/6J ( $35,78 \pm 5,25$  g/dL) aos 30 dias (Figura 9C). Aos 60 dias, os Townes-AS ( $38,57 \pm 3,96$  g/dL) apresentaram maior CHCM frente aos Townes-SS ( $27,68 \pm 0,92$  g/dL), Townes-AA ( $31,13 \pm 1,21$  g/dL) e C57BL/6J ( $31,35 \pm 0,91$  g/dL) (Figura 9C). Aos 150 dias, as CHCM médias foram semelhantes entre os grupos com exceção dos Townes-SS ( $29,23 \pm 1,84$  g/dL) que apresentaram menor CHCM comparado aos Townes-AS ( $32,03 \pm 1,84$  g/dL) (Figura 9C).

A análise das células vermelhas também mostrou que os Townes-AS ( $30,57 \pm 2,00$  %) e Townes-AA ( $29,37 \pm 0,90$  %) possuíram maior RDW que os Townes-SS ( $25,67 \pm 2,44$  %) e todos apresentaram RDW elevado em relação aos C57BL/6J ( $17,35 \pm 1,51$  %) com 30 dias (Figura 9D). Aos 60 dias, o RDW dos Townes-SS ( $26,34 \pm 4,15$  %) se manteve alto, enquanto os Townes-AS ( $20,92 \pm 1,30$  %) e Townes-AA ( $20,23 \pm 1,53$  %) mostraram uma redução (Figura 9D). Novamente, o RDW dos Townes foi maior do que dos C57BL/6J ( $14,30 \pm 0,96$  %). Um perfil de RDW semelhante aos 60 dias foi observado aos 150 dias (Figura 9D).



**Figura 9.** Volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos.



Distribuição da contagem da volume corpuscular médio (do inglês, *mean corpuscular volume*, MCV) (A); hemoglobina corpuscular média (do inglês, *mean corpuscular hemoglobin*, MCH) (B); concentração de hemoglobina corpuscular média (do inglês, *mean corpuscular hemoglobin concentration*, MCHC) (C); e amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (do inglês, *red cell distribution width*, RDW) em camundongos Townes-SS (n=6), Townes-AS (n=6), Townes-AA (n=6) e C57BL/6J (n=6) com 30, 60 e 150

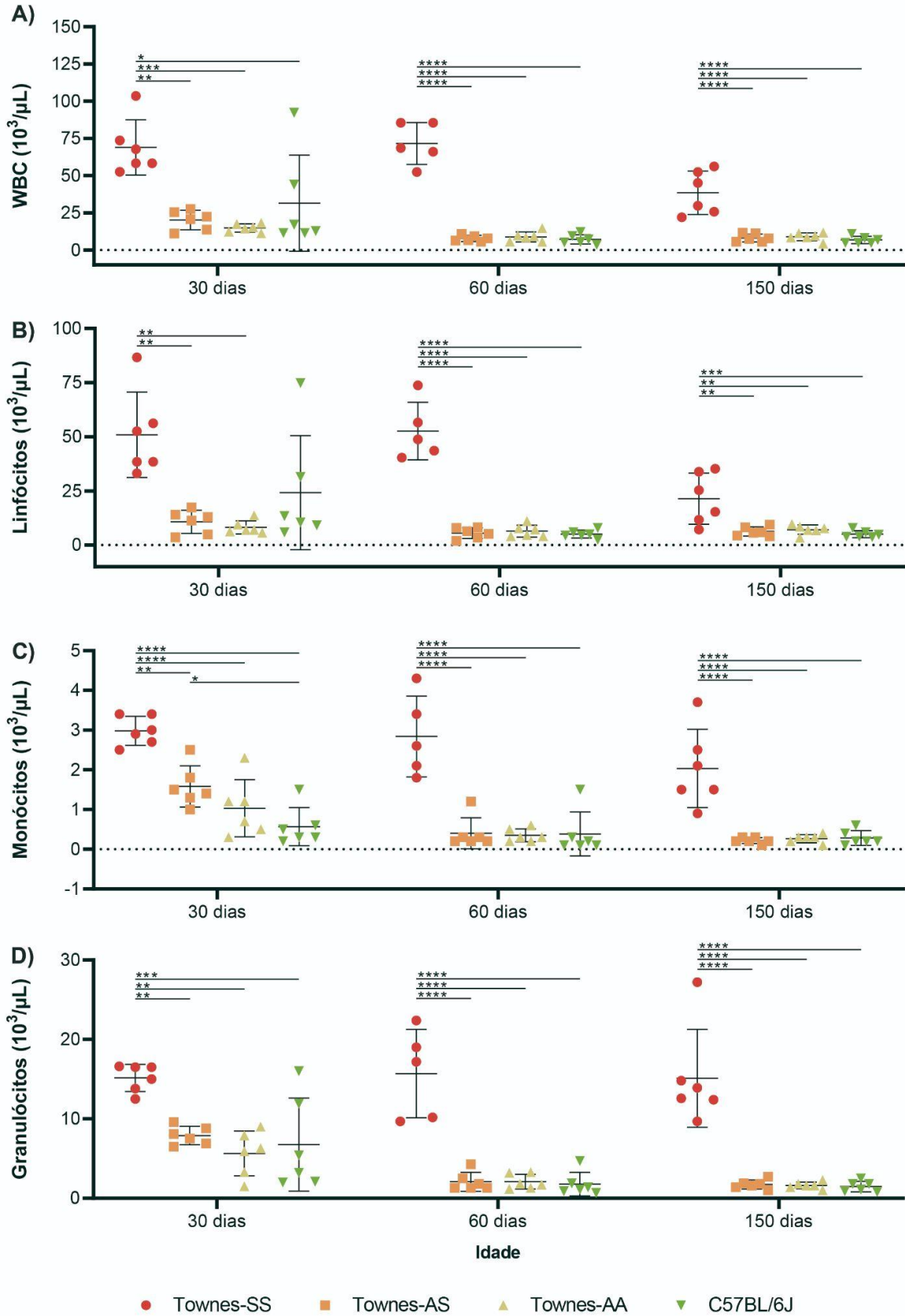
dias de vida. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Fonte: próprio autor.

### 6.1.3 Análise sanguínea - Leucograma.

Os Townes-SS ( $69,03 \pm 18,50 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) apresentaram maior número de leucócitos que os Townes-AS ( $20,20 \pm 6,53 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), Townes-AA ( $14,87 \pm 2,75 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e C57BL/6J ( $17,58 \pm 13,24 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) aos 30 dias (Figura 10A). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $71,60 \pm 14,10 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) continuaram com alta quantidade de leucócitos enquanto os Townes-AS ( $7,85 \pm 2,03 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), Townes-AA ( $8,88 \pm 3,38 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e C57BL/6J ( $7,23 \pm 3,14 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) demonstraram uma redução comparado aos 30 dias (Figura 10A). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $38,57 \pm 14,57 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) apresentaram redução da leucocitose e os Townes-AS ( $8,22 \pm 2,65 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), Townes-AA ( $9,02 \pm 2,63 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e C57BL/6J ( $6,82 \pm 2,44 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) mantiveram valores semelhantes ao observado no período anterior (Figura 10A).

O maior número de leucócitos totais dos Townes-SS foi associado ao aumento dos linfócitos, monócitos e granulócitos em todas as idades analisadas (Figura 10B, 10C e 10D). Entretanto, aos 30 dias, os Townes-SS ( $72,00 \pm 8,36 \%$ ) possuíam maior porcentagem de linfócitos que os Townes-AS ( $49,68 \pm 12,59 \%$ ) e Townes-AA ( $55,97 \pm 19,96 \%$ ) e uma porcentagem semelhante ao encontrado nos C57BL/6J ( $73,60 \pm 11,44 \%$ ) (Figura 11). Aos 60 dias, o perfil de distribuição dos leucócitos foi semelhante entre os animais (Figura 11). Aos 150 dias, os Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J apresentaram perfil de distribuição leucocitária semelhante. Enquanto que os Townes-SS ( $5,30 \pm 1,41 \%$  e  $41,93 \pm 15,69 \%$ ) tinham maior porcentagem de monócitos e granulócitos quando comparado aos Townes-AS ( $2,88 \pm 0,25 \%$  e  $21,30 \pm 2,99 \%$ ), Townes-AA ( $3,07 \pm 0,34 \%$  e  $18,17 \pm 2,67 \%$ ) e C57BL/6J ( $4,13 \pm 0,98 \%$  e  $21,20 \pm 3,20 \%$ ) (Figura 11).

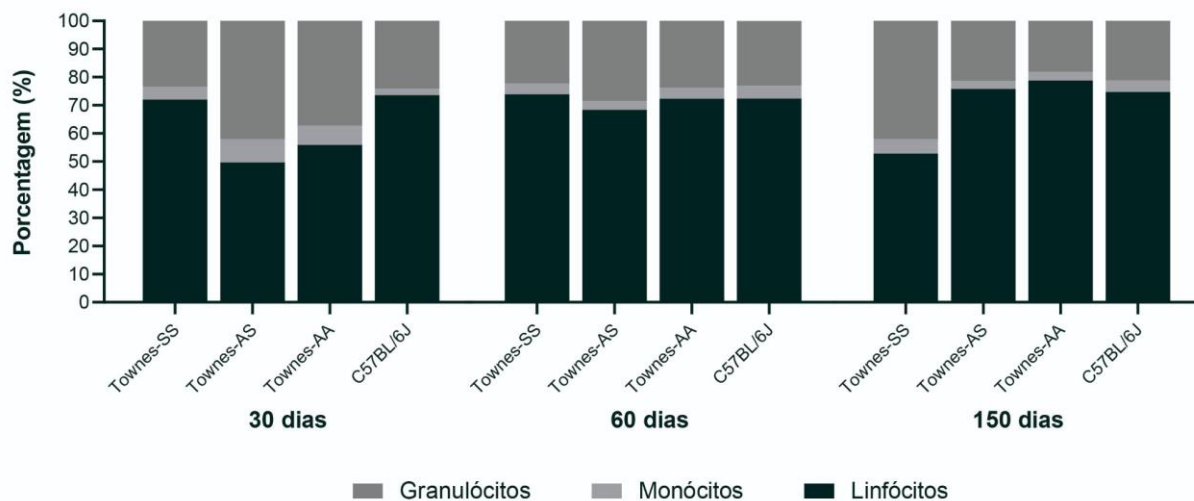
Figura 10. Leucograma.



Distribuição da contagem absoluta de leucócitos (do inglês, *white blood cell*, WBC) (A); linfócitos (B); granulócitos (C) e monócitos (D) dos camundongos Townes-SS (n=6), Townes-AS (n=6), Townes-AA (n=6) e

C57BL/6J (n=6) com 30, 60 e 150 dias de vida. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

**Figura 11.** Contagem relativa de linfócitos, monócitos e granulócitos.



Distribuição relativa dos leucócitos em linfócitos, granulócitos e monócitos dos camundongos Townes-SS (n=6), Townes-AS (n=6), Townes-AA (n=6) e C57BL/6J (n=6) com 30, 60 e 150 dias de vida. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

#### 6.1.4 Análise sanguínea - Contagem de reticulócitos e células com HbF.

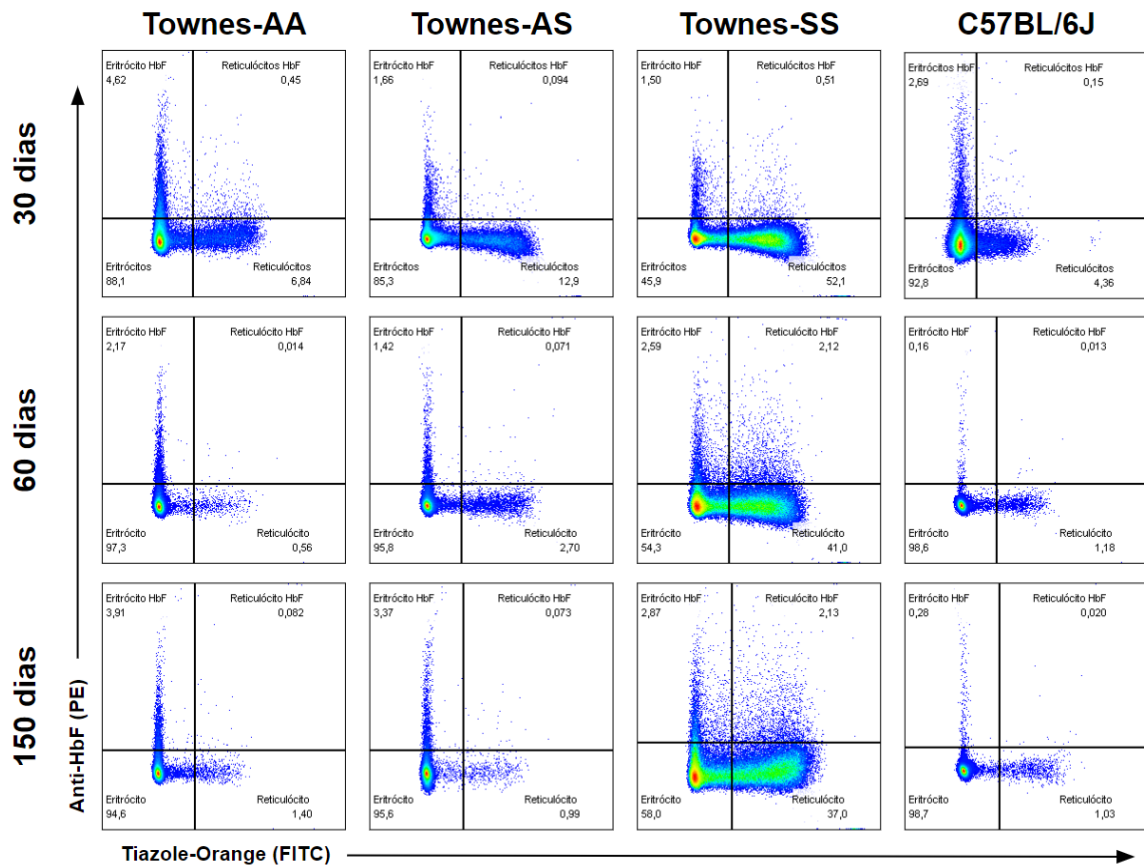
A contagem de reticulócitos aos 30 dias revelou maior porcentagem destas células nos Townes-SS ( $57,07 \pm 2,15$  %) quando comparado aos Townes-AS ( $17,51 \pm 3,94$  %) e Townes-AA ( $11,04 \pm 1,91$  %), além da maior porcentagem nos Townes-AS e Townes-AA frente aos C57BL/6J ( $4,54 \pm 0,90$  %) (Figura 12A). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $47,84 \pm 6,72$  %) mantiveram maior porcentagem de reticulócitos que os Townes-AS ( $3,49 \pm 0,82$  %) e Townes-AA ( $1,35 \pm 0,53$  %), porém não houve mais diferença dos últimos com os C57BL/6J ( $2,12 \pm 0,49$  %) (Figura 12A). Aos 150 dias, foi observado o mesmo perfil encontrado aos 60 dias (Figura 12A).

A estratégia de análise das células com HbF por citometria de fluxo revelou uma pequena porcentagem de marcação em células dos C57BL/6J com o anticorpo anti-HbF humano (Figura 13). Por isso, a porcentagem de reticulócitos HbF+ dos camundongos Townes foi ajustada com a subtração do percentual obtido de cada animal Townes pela média dos C57BL/6J da idade correspondente, a fim de compensar a marcação inespecífica. Após o ajuste, foi possível observar que os Townes-SS ( $1,47 \pm 0,44$  %) e Townes-AA ( $1,35 \pm 0,46$  %) apresentaram maior porcentagem média de reticulócitos HbF+ que os Townes-AS ( $0,24 \pm 0,19$  %) aos 30 dias (Figura 12B). Aos 60 dias, a porcentagem de reticulócitos HbF+ dos Townes-SS ( $3,45 \pm 0,96$  %) foi maior do que o encontrado nos Townes-AS ( $0,15 \pm 0,10$  %) e Townes-

AA ( $0,6 \pm 0,6$  %) (Figura 12B). A maior porcentagem de reticulócitos HbF+ nos Townes-SS ( $3,59 \pm 1,43$  %) frente aos Townes-AS ( $0,15 \pm 0,09$  %) e Townes-AA ( $0,15 \pm 0,04$  %) se manteve aos 150 dias de vida (Figura 12B).

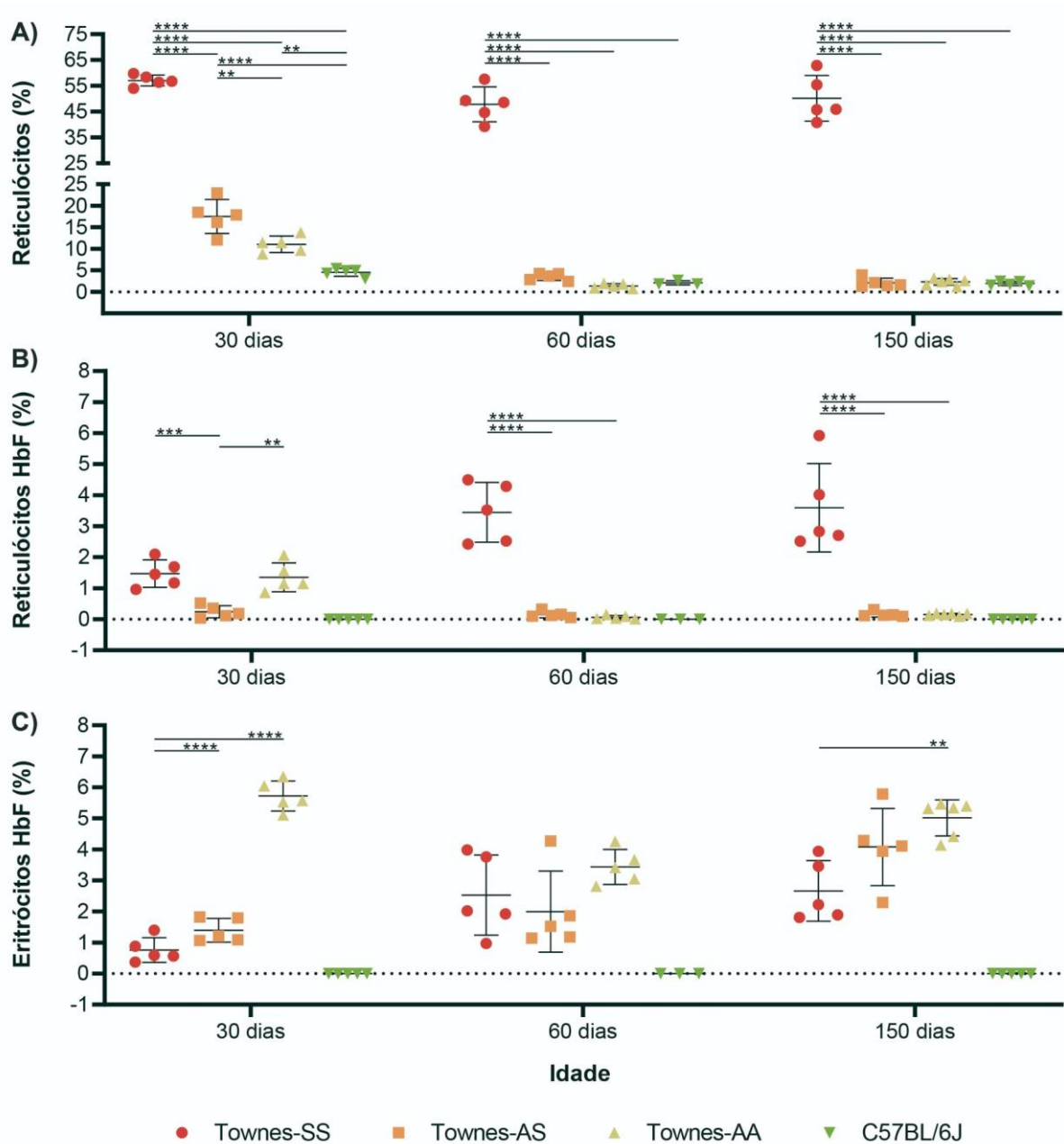
Por fim, a análise dos eritrócitos HbF+ dos Townes também foi ajustada com a média dos C57BL/6J e revelou que os Townes-AA ( $5,72 \pm 0,48$  %) tinham mais reticulócitos HbF+ que os Townes-SS ( $0,76 \pm 0,40$  %) e Townes-AS ( $1,40 \pm 0,38$  %) aos 30 dias (Figura 12C). Aos 60 dias, não foi encontrada diferença significativa entre as porcentagens de eritrócitos HbF+ dos Townes-SS ( $2,53 \pm 1,29$  %), Townes-AS ( $1,99 \pm 1,31$  %) e Townes-AA ( $3,44 \pm 0,56$  %) (Figura 12C). Em 150 dias, os Townes-AA ( $5,01 \pm 0,58$  %) voltaram a apresentar maior porcentagem de eritrócitos HbF+ quando comparados aos Townes-SS ( $2,66 \pm 0,97$  %) e Townes-AS ( $4,08 \pm 1,24$  %) (Figura 12C).

**Figura 12.** Análise da porcentagem de reticulócitos, e das células com HbF.



Os gráficos representam a análise do percentual de reticulócitos, reticulócitos com HbF humana e eritrócitos com HbF humana no sangue dos camundongos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias de vida. HbF, hemoglobina fetal. Fonte: próprio autor

**Figura 13.** Porcentagem de reticulócitos, reticulócitos com HbF e eritrócitos com HbF.



Distribuição da porcentagem de reticulócitos (A), reticulócitos com hemoglobina fetal (HbF) humana (B) e eritrócitos com HbF humana (C) no sangue dos camundongos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J (n=3, 5 ou 6) com 30, 60 e 150 dias. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

## 6.2 Impactos da AF sobre as células dos nichos hematopoéticos intramedular e extramedular esplênico

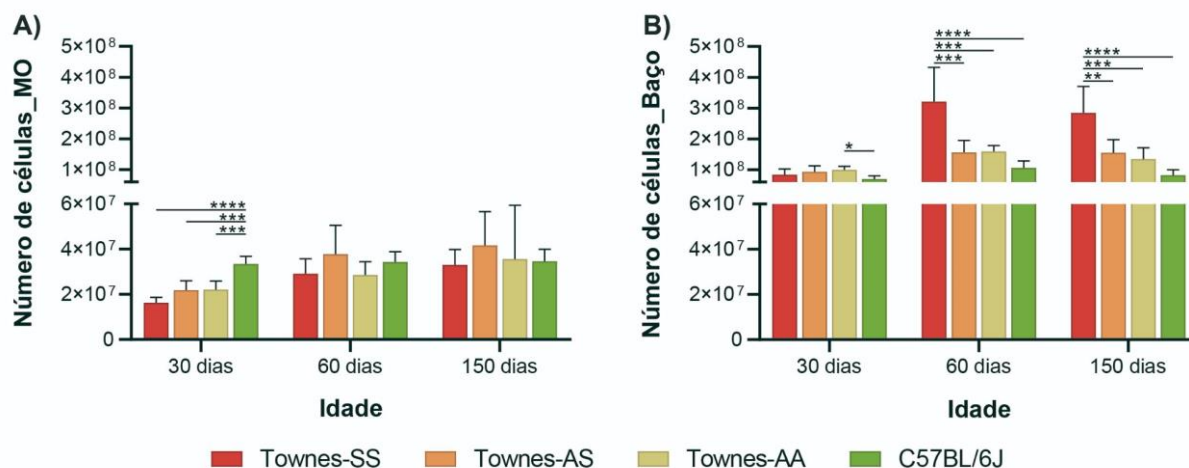
### 6.2.1 Celularidade da MO e do Baço

A análise comparativa do número de células isoladas dos fêmures e tíbias após a lise de eritrócitos revelou uma maior quantidade de células na MO dos C57BL/6J ( $3,34 \pm 0,34 \times 10^7$  células) quando comparado aos Townes-SS ( $1,63 \pm 0,23 \times 10^7$  células), Townes-AS ( $2,19$

$\pm 0,41 \times 10^7$  células) e Townes-AA ( $2,21 \pm 0,38 \times 10^7$  células) com 30 dias (Figura 14A). Aos 60 e 150 dias, os Townes-SS ( $2,92 \pm 0,66 \times 10^7$  e  $3,30 \pm 0,66 \times 10^7$  células) apresentaram mais uma vez números absolutos menores que os Townes-AS ( $3,78 \pm 1,27 \times 10^7$  e  $4,17 \pm 1,49 \times 10^7$  células), Townes-AA ( $2,86 \pm 0,58 \times 10^7$  e  $3,56 \pm 2,38 \times 10^7$  células) e C57BL/6J ( $3,43 \pm 0,45 \times 10^7$  e  $3,46 \pm 0,53 \times 10^7$  células), porém não houve diferença entre a média de células isoladas dos diferentes genótipos e linhagens (Figura 14A).

A análise das células isoladas do baço, após a lise de eritrócitos, mostrou um menor número de células nos C57BL/6J ( $6,95 \pm 0,11 \times 10^7$  células) quando comparado aos Townes-SS ( $8,40 \pm 0,18 \times 10^7$  células), Townes-AS ( $9,41 \pm 0,19 \times 10^7$  células) e Townes-AA ( $9,97 \pm 0,12 \times 10^7$  células) com 30 dias (Figura 14B). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $32,12 \pm 1,11 \times 10^7$  células) apresentaram maior número de células frente aos Townes-AS ( $15,62 \pm 0,39 \times 10^7$  células), Townes-AA ( $15,92 \pm 1,94 \times 10^7$  células) e C57BL/6J ( $10,61 \pm 2,26 \times 10^7$  células) (Figura 14B). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $28,50 \pm 8,55 \times 10^7$  células) demonstraram novamente ter mais células que os Townes-AS ( $15,54 \pm 4,21 \times 10^7$  células), Townes-AA ( $13,50 \pm 3,66 \times 10^7$  células) e C57BL/6J ( $8,28 \pm 1,69 \times 10^7$  células) (Figura 14B).

**Figura 14.** Quantidade de células totais isoladas da MO e do baço.



Quantidade de células totais isoladas da medula óssea (MO) dos fêmures e tíbias (A) e do baço (B) dos camundongos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA (n=5) e C57BL/6J (n=6) com 30, 60 e 150 dias de vida. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

## 6.2.2 HSC na medula óssea e no baço

A análise da MO revelou que os Townes-SS ( $5,37 \pm 0,97 \times 10^5$  células) apresentaram menor número de HSC (Lin-/cKit+/Sca1+/CD48-/CD150+) que os Townes-AA ( $7,80 \pm 2,21 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $8,24 \pm 1,48 \times 10^5$  células) aos 30 dias (Figura 15A). Aos 60 dias, os

Townes-AS ( $21,75 \pm 8,39 \times 10^5$  células) apresentaram mais HSC que os Townes-SS ( $11,75 \pm 3,83 \times 10^5$  células), Townes-AA ( $12,87 \pm 2,93 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $11,87 \pm 2,63 \times 10^5$  células), porém só houve diferença entre a média dos Townes-AS e Townes-SS (Figura 15A). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $25,50 \pm 6,84 \times 10^5$  células), Townes-AS ( $36,89 \pm 15,51 \times 10^5$  células) e Townes-AA ( $43,01 \pm 24,70 \times 10^5$  células) apresentaram maior número de HSC que os C57BL/6J ( $13,28 \pm 2,44 \times 10^5$  células). Por fim, os dados também demonstraram que a média de HSC na MO dos Townes-SS foi inferior aos Townes-AS e Townes-AA em todas idades, porém sem significância estatística (Figura 15A).

A análise do baço aos 30 dias não revelou diferenças entre o número de HSC dos grupos, exceto por um menor número de HSC nos C57BL/6J ( $3,19 \pm 0,88 \times 10^5$  células) frente aos Townes-AS ( $5,98 \pm 1,45 \times 10^5$  células) (Figura 15B). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $38,82 \pm 13,42 \times 10^5$  células) apresentaram maior número de HSC que os Townes-AS ( $10,46 \pm 5,56 \times 10^5$  células), Townes-AA ( $10,62 \pm 2,22 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $0,49 \pm 0,18 \times 10^5$  células) (Figura 15B). O maior número de HSC dos Townes-SS ( $34,01 \pm 12,58 \times 10^5$  células) foi mantido aos 150 dias, porém os Townes-AA ( $22,35 \pm 15,99 \times 10^5$  células) e Townes-AS ( $23,22 \pm 17,08 \times 10^5$  células) também apresentaram um maior número de HSC que os C57BL/6J ( $0,69 \pm 0,44 \times 10^5$  células) nesta idade (Figura 15B).

### 6.2.3 Progenitores mieloides

A análise dos CMP (Lin-/cKit+/Sca1-/CD16/32-/CD34low) da MO aos 30 dias não revelou diferença entre os Townes-SS ( $6,33 \pm 0,99 \times 10^6$  células), Townes-AS ( $7,31 \pm 1,99 \times 10^6$  células) e C57BL/6J, porém os Townes-AA ( $5,78 \pm 1,48 \times 10^6$  células) apresentaram menor número de CMP quando comparado aos C57BL/6J ( $8,14 \pm 0,82 \times 10^6$  células) (Figura 16A). Aos 60 dias, foi observado um maior número de CMP nos Townes-SS ( $13,29 \pm 4,26 \times 10^6$  células) frente aos C57BL/6J ( $8,17 \pm 0,82 \times 10^6$  células) (Figura 16A). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $21,02 \pm 7,85 \times 10^6$  células), Townes-AS ( $24,62 \pm 7,55 \times 10^6$  células) e Townes-AA ( $31,33 \pm 19,95 \times 10^6$  células) apresentaram médias maiores que o C57BL/6J ( $10,57 \pm 2,01 \times 10^6$  células), porém só houve diferença entre os Townes-AA e os C57BL/6J (Figura 16A).

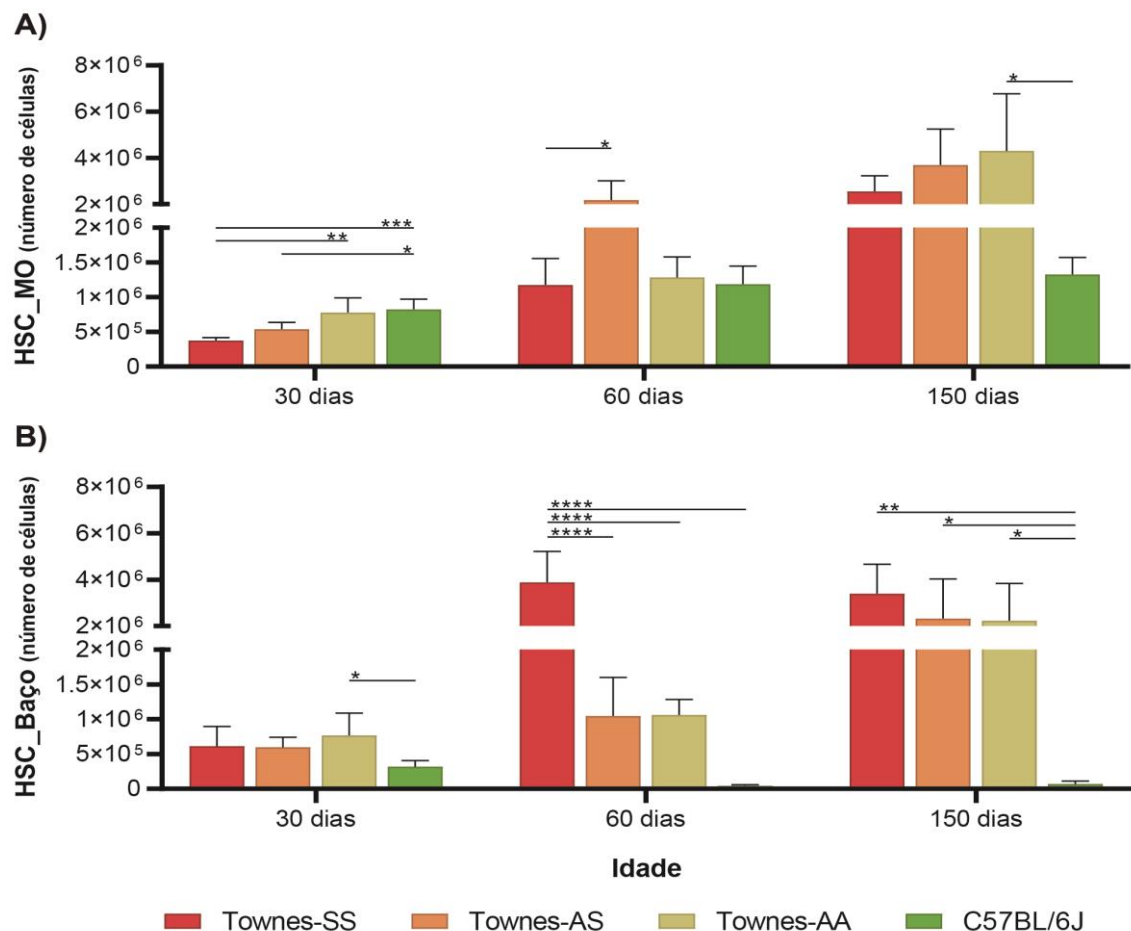
A análise da MO aos 30 dias revelou um menor número de GMP (Lin-/cKit+/Sca1-/CD16/32+/CD34+) nos Townes-AA ( $1,29 \pm 0,23 \times 10^6$  células) frente aos Townes-SS ( $3,32 \pm 0,45 \times 10^6$  células), Townes-AS ( $3,65 \pm 1,20 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $4,12 \pm 0,78 \times 10^6$  células) (Figura 16B). Aos 60 dias, os C57BL/6J ( $2,87 \pm 0,65 \times 10^6$  células) apresentaram menor número de GMP que os Townes-AS ( $5,98 \pm 1,15 \times 10^6$  células) e os Townes-AA ( $4,13$



$\pm 1,12 \times 10^6$  células) apresentaram valores semelhantes aos demais genótipos da linhagem Townes (Figura 16B). Aos 150 dias, não houve diferença entre o número de GMP dos animais analisados, mesmo com os C57BL/6J ( $3,50 \pm 0,46 \times 10^6$  células) demonstrando média inferior a dos Townes-SS ( $7,65 \pm 2,76 \times 10^6$  células), Townes-AS ( $6,14 \pm 1,89 \times 10^6$  células) e Townes-AA ( $7,51 \pm 3,81 \times 10^6$  células) (Figura 16B).

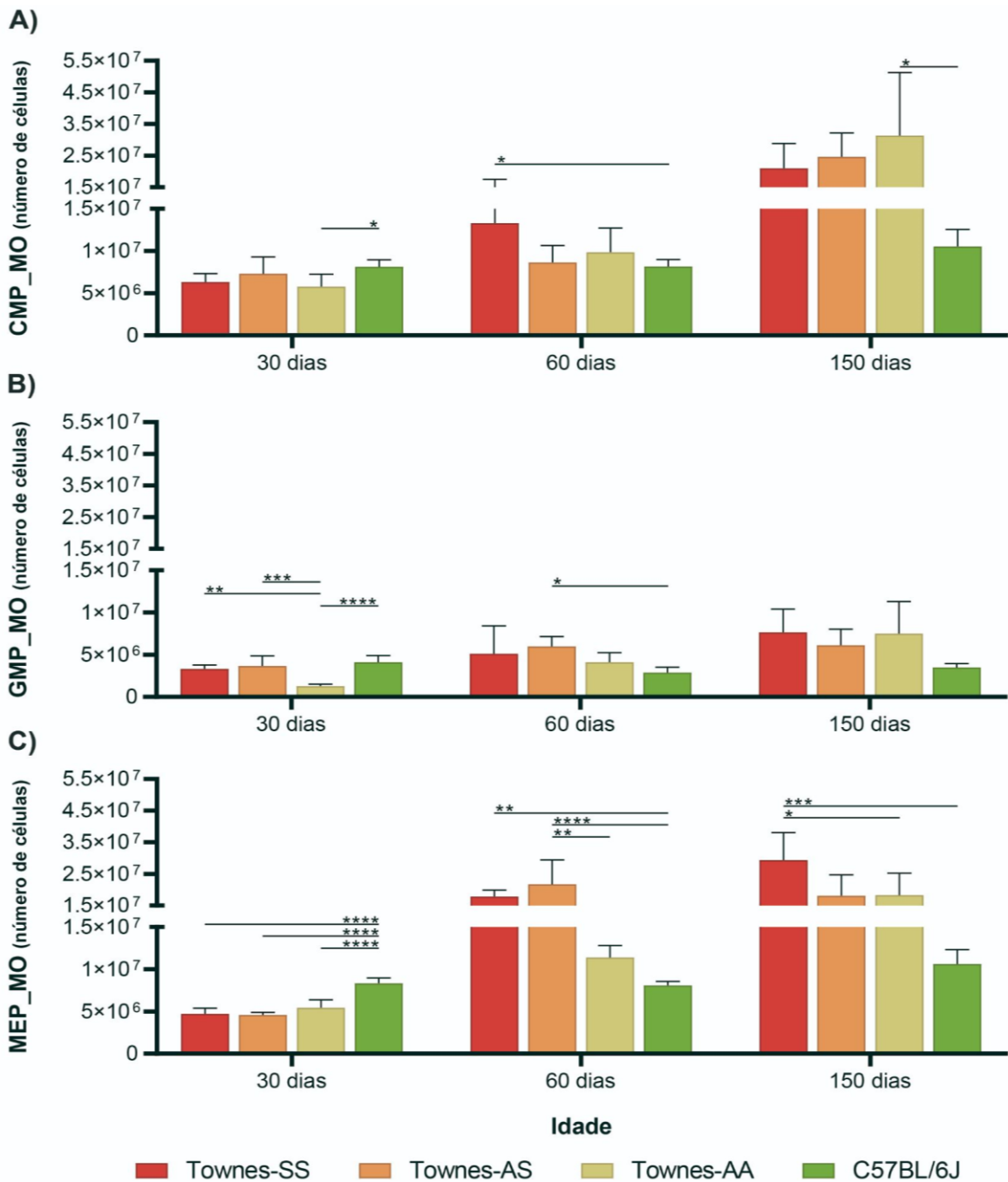
Por fim, a análise dos MEP (Lin-/cKit+/Sca1-/CD16/32-/CD34-) aos 30 dias revelou maior número médio na MO dos C57BL/6J ( $8,33 \pm 0,63 \times 10^6$  células) quando comparado aos Townes-SS ( $4,72 \pm 0,67 \times 10^6$  células), Townes-AS ( $4,59 \pm 0,29 \times 10^6$  células) e Townes-AA ( $5,45 \pm 0,92 \times 10^6$  células) (Figura 16C). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $17,87 \pm 2,05 \times 10^6$  células) e Townes-AS ( $21,71 \pm 7,69 \times 10^6$  células) apresentaram maior número de MEP na MO que os Townes-AA ( $11,40 \pm 1,41 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $8,07 \pm 0,50 \times 10^6$  células) (Figura 16C). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $29,37 \pm 8,66 \times 10^6$  células) demonstraram novamente maior número de MEP que os Townes-AA ( $18,30 \pm 6,94 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $10,63 \pm 1,69 \times 10^6$  células) (Figura 16C).

**Figura 15.** Quantidade de HSC na medula óssea e do baço.



Quantidade de células-tronco hematopoéticas (do inglês, *Hematopoietic Stem Cell*, HSC) isoladas da MO (A) e do baço (B) dos camundongos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA (n=5) e C57BL/6J (n=6) com 30 dias de vida; camundongos Townes-SS (n=5), Townes-AS, Townes-AA (n=3) e C57BL/6J (n=6) com 60 dias de vida; e camundongos Townes-SS, Townes-AS (n=5), Townes-AA e C57BL/6J (n=6) com 150 dias de vida. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

**Figura 16.** Quantidade de CMP, GMP e MEP na medula óssea.



(A) Quantidade de progenitores mieloides comuns (CMP); (B) quantidade de progenitores de granulócitos e monócitos (GMP); (C) quantidade de progenitores de eritrócitos e megacariócitos (MEP) da medula óssea (dos fêmures e das tíbias) dos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias de vida (n=5-6). CMP\_MO, progenitores mieloides comuns da medula óssea; GMP\_MO, progenitores de granulócitos e monócitos da medula óssea; MEP\_MO, progenitores de eritrócitos e megacariócitos da medula óssea. Os dados

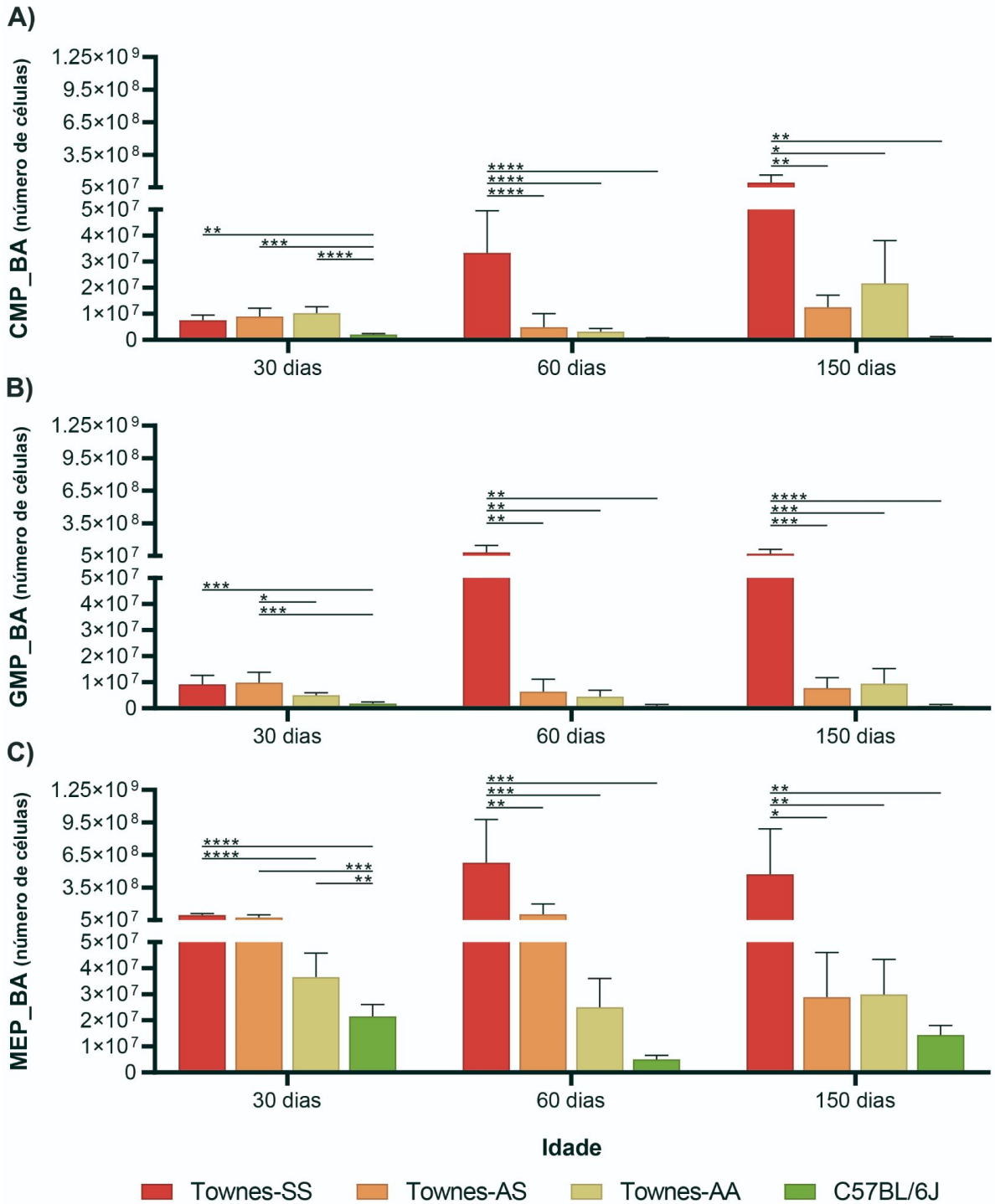
estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Fonte: próprio autor.

A análise do baço mostrou que os C57BL/6J ( $2,06 \pm 0,33 \times 10^6$  células) possuem menos CMP que os Townes-SS ( $7,49 \pm 1,98 \times 10^6$  células), Townes-AS ( $9,05 \pm 3,08 \times 10^6$  células) e Townes-AA ( $10,19 \pm 2,47 \times 10^6$  células) com 30 dias (Figura 17A). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $33,37 \pm 16,24 \times 10^6$  células) apresentaram um número de CMP superior aos Townes-AS ( $4,89 \pm 5,13 \times 10^6$  células), Townes-AA ( $3,18 \pm 1,16 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $0,51 \pm 0,28 \times 10^6$  células) (Figura 17A). Aos 150 dias, novamente os Townes-SS ( $93,48 \pm 71,97 \times 10^6$  células) apresentaram mais CMP que os Townes-AS ( $12,50 \pm 4,60 \times 10^6$  células), Townes-AA ( $21,64 \pm 16,41 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $0,92 \pm 0,39 \times 10^6$  células) (Figura 17A).

Com relação aos GMP, a análise do baço revelou um menor número destas células no C57BL/6J ( $1,84 \pm 0,55 \times 10^6$  células) quando comparado aos Townes-SS ( $9,20 \pm 3,39 \times 10^6$  células), Townes-AS ( $72,64 \pm 38,29 \times 10^6$  células) com 30 dias (Figura 17B). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $81,96 \pm 63,78 \times 10^6$  células) apresentaram um número de GMP superior aos Townes-AS ( $9,90 \pm 3,89 \times 10^6$  células), Townes-AA ( $4,51 \pm 2,44 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $0,91 \pm 0,54 \times 10^6$  células) (Figura 17B). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $72,64 \pm 38,29 \times 10^6$  células) apresentaram mais uma vez um número de GMP maior que os Townes-AS ( $7,78 \pm 3,94 \times 10^6$  células), Townes-AA ( $9,43 \pm 5,82 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $1,02 \pm 0,45 \times 10^6$  células) (Figura 17B).

Por fim, foi encontrado um menor número de MEP no baço dos C57BL/6J ( $21,60 \pm 4,47 \times 10^6$  células) quando comparado aos Townes-SS ( $96,59 \pm 13,54 \times 10^6$  células), Townes-AS ( $72,79 \pm 24,97 \times 10^6$  células) e Townes-AA ( $36,59 \pm 9,13 \times 10^6$  células), além de um menor número de MEP nos Townes-AA frente aos Townes-SS aos 30 dias (Figura 17C). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $579,21 \pm 397,62 \times 10^6$  células) apresentaram um número de MEP superior aos Townes-AS ( $103,82 \pm 95,03 \times 10^6$  células), Townes-AA ( $25,06 \pm 11,05 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $5,06 \pm 1,51 \times 10^6$  células) (Figura 17C). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $473,59 \pm 419,04 \times 10^6$  células) apresentaram mais CMP que os Townes-AS ( $28,87 \pm 17,19 \times 10^6$  células), Townes-AA ( $29,95 \pm 13,53 \times 10^6$  células) e C57BL/6J ( $14,42 \pm 3,58 \times 10^6$  células) (Figura 17C).

Figura 17. Quantidade de CMP, GMP e MEP no baço.



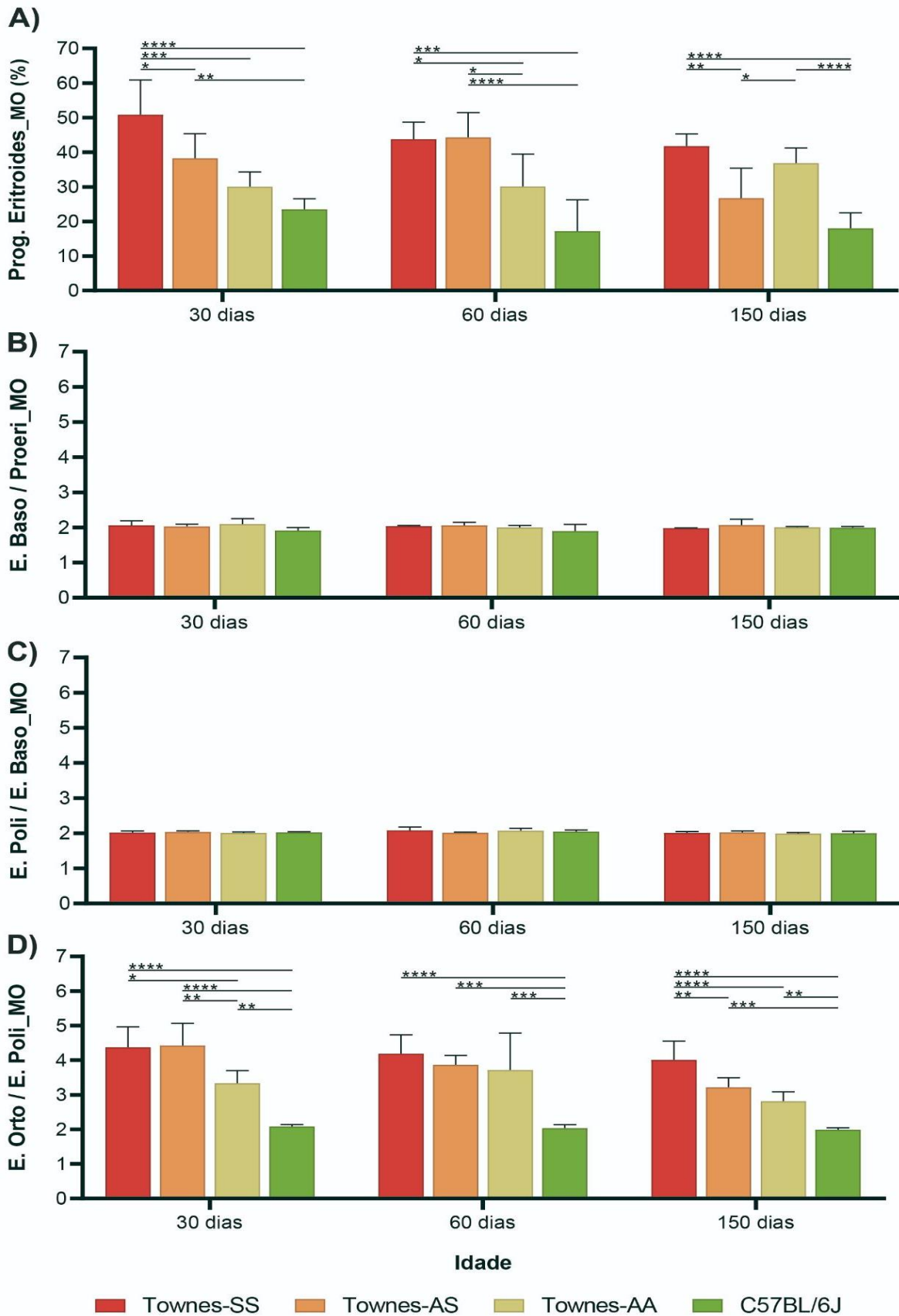
(A) Quantidade de progenitores mieloides comuns (CMP); (B) quantidade de progenitores de granulócitos e monócitos (GMP); © quantidade de progenitores de eritrócitos e megacariócitos (MEP) do baço dos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias de vida (n= 5-6). CMP\_BA, progenitores mieloides comuns do baço; GMP\_BA, progenitores de granulócitos e monócitos do baço; MEP\_BA, progenitores de eritrócitos e megacariócitos do baço. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

#### 6.2.4 Progenitores eritroides terminais

A análise dos progenitores eritroides terminais da MO mostrou que os Townes-SS ( $50,88 \pm 10,02$  %) mostraram maior porcentagem de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos somados quando comparado aos Townes-AS ( $38,23 \pm 7,11$  %), Townes-AA ( $30,06 \pm 4,25$  %) e C57BL/6J ( $23,5 \pm 3,07$  %) aos 30 dias (Figura 18A). Aos 60 dias, a porcentagem de progenitores eritroides terminais dos Townes-SS ( $43,83 \pm 4,92$  %) e dos Townes-AS ( $44,26 \pm 7,20$  %) foi maior que dos Townes-AA ( $30,11 \pm 9,38$  %) e dos C57BL/6J ( $17,19 \pm 9,06$  %) (Figura 18A). Aos 150 dias, mais uma vez os Townes-SS ( $41,80 \pm 3,52$  %) tiveram maior porcentagem que os Townes-AS ( $26,76 \pm 8,60$  %) e os C57BL/6J ( $18,05 \pm 4,41$  %). Nesta idade os Townes-AA ( $36,87 \pm 4,37$  %) também demonstraram maior porcentagem de progenitores eritroides terminais que os Townes-AS e C57BL/6J (Figura 18A).

A análise da eritropoese terminal seguiu com a avaliação da proporção mitótica de 1:2:4:8 característica da diferenciação dos proeritroblastos até eritroblastos ortocromáticos nos camundongos. Foi observado que a proporção entre proeritroblastos e eritroblastos basofílicos foi aproximadamente 1:2 na MO dos Townes e C57BL/6J em todas as idades avaliadas (Figura 18B). A proporção entre eritroblastos basofílicos e eritroblastos policromáticos também foi aproximadamente 1:2 na MO dos Townes e C57BL/6J em todas as idades avaliadas (Figura 18C). A proporção de eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos foi 1:2 apenas na MO dos C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias (Figura 18D). Os Townes-SS, Townes-AS e Townes-AA apresentaram proporção de eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos maior que os C57BL/6J aos 30, 60 e 150 dias (Figura 18D).

Figura 18. Porcentagem total e proporção mitótica dos progenitores eritroides terminais na medula óssea.



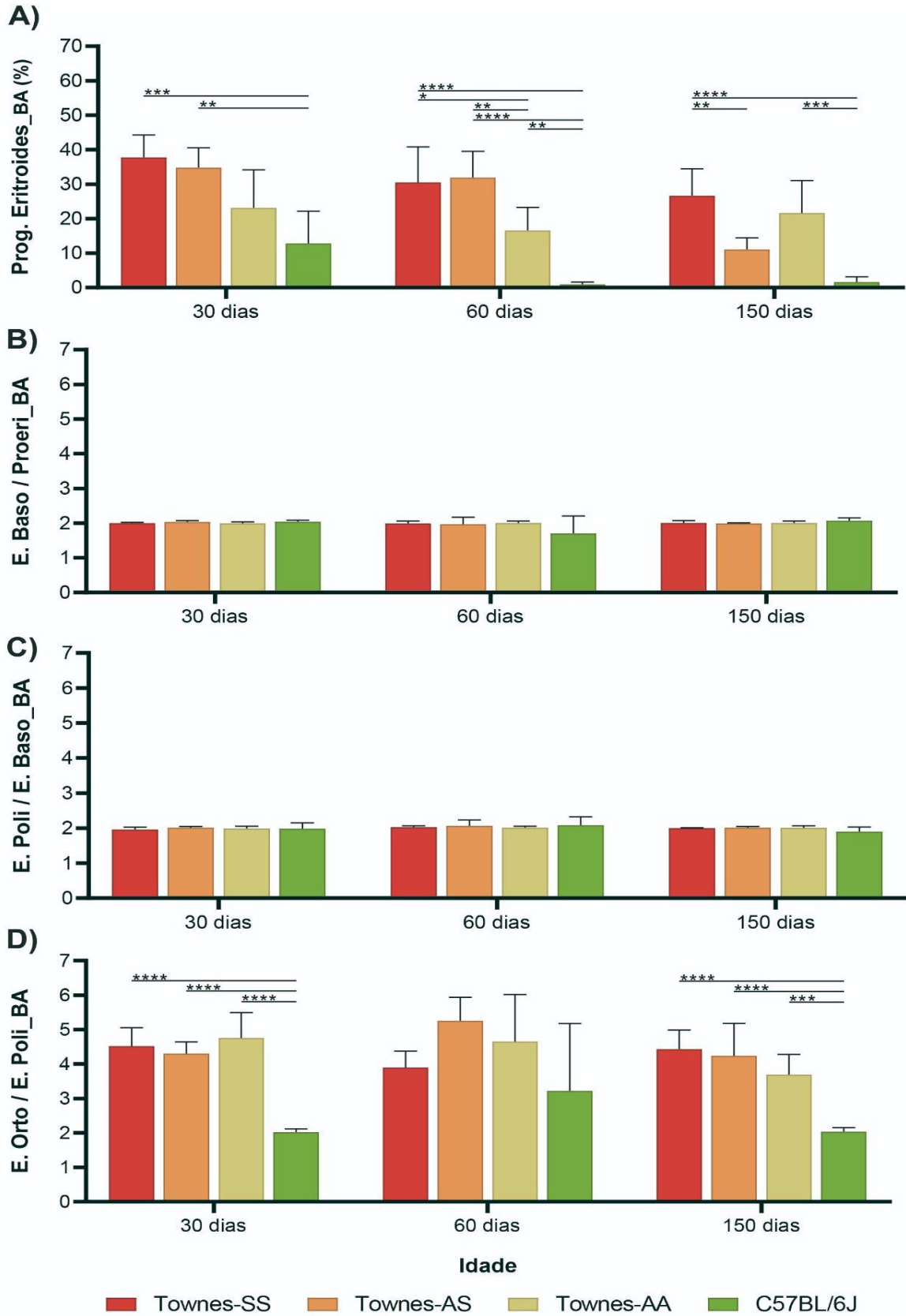
(A) Soma das porcentagens de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos da MO (dos fêmures e tíbias); (B) proporção de eritroblastos basofílicos para cada

proeritroblasto da MO; (C) proporção de eritroblastos policromáticos para cada eritroblasto basófilo da MO; (D) proporção de eritroblastos ortocromáticos para cada eritroblasto policromático da MO dos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias de vida (n= 5-6). Prog. Eritroides\_MO, progenitores eritroides terminais na medula óssea; E. Baso/E. Proeri\_MO, proporção de eritroblastos basofílicos por proeritroblasto na medula óssea; E. Poli/E. Baso\_MO, proporção de eritroblastos policromáticos por eritroblasto basófilo na medula óssea; E. Orto/E. Poli\_MO, proporção de eritroblastos ortocromáticos por eritroblasto policromático na medula óssea. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

A porcentagem de progenitores eritroides terminais do baço dos Townes-SS ( $37,75 \pm 6,56$  %) foi semelhante aos Townes-AS ( $34,81 \pm 5,79$  %) e maior que dos Townes-AA ( $23,17 \pm 11,03$  %) e C57BL/6J ( $12,81 \pm 9,37$  %) aos 30 dias (Figura 19A). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $30,54 \pm 10,27$  %) e os Townes-AS ( $31,95 \pm 7,58$  %) mostraram novamente maior porcentagem de progenitores eritroides terminais que os Townes-AA ( $16,61 \pm 6,69$  %) e C57BL/6J ( $0,87 \pm 0,67$  %) (Figura 20A). Nesta idade, assim como aos 150 dias, a presença de progenitores eritroides terminais no baço dos C57BL/6J foi pequena (Figura 19A). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $26,61 \pm 7,85$  %) tiveram maior porcentagem de progenitores que os Townes-AS ( $11,05 \pm 3,38$  %) e os C57BL/6J ( $1,63 \pm 1,52$  %) (Figura 19A).

A avaliação da proporção mitótica no baço revelou que a proporção entre proeritroblastos e eritroblastos basofílicos foi aproximadamente 1:2 na MO dos Townes e C57BL/6J em todas as idades avaliadas (Figura 19B). O mesmo foi encontrado entre eritroblastos basofílicos e eritroblastos policromáticos na MO dos Townes e C57BL/6J em todas as idades avaliadas (Figura 19C). Já a proporção de eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos foi aproximadamente 1:2 apenas na MO dos C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias. Entretanto, ressalta-se que a baixa quantidade desses progenitores no baço dos C57BL/6J limita a qualidade das proporções (Figura 19A). Por fim, os Townes-SS, Townes-AS e Townes-AA apresentaram proporção de eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos acima de 1:2 (Figura 19D).

**Figura 19.** Porcentagem total e proporção mitótica dos progenitores eritroides terminais no baço.



(A) Soma das porcentagens de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos do baço; (B) proporção de eritroblastos basofílicos para cada proeritroblasto do baço; (C) proporção de eritroblastos policromáticos para cada eritroblasto basófilo do baço; (D) proporção de



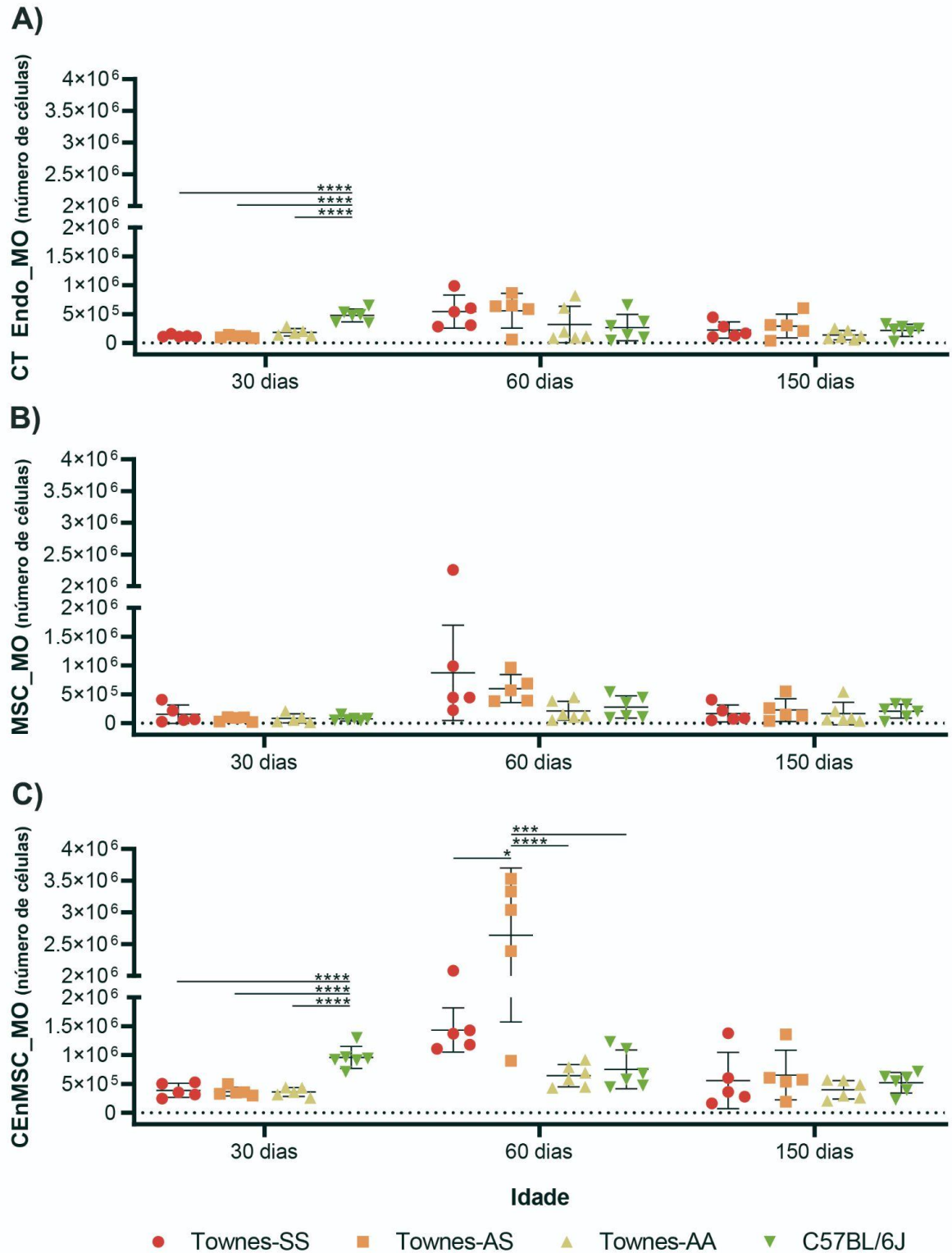
eritroblastos ortocromáticos para cada eritroblasto policromático do baço (D) dos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias de vida (n= 5-6). Prog. Eritroides\_BA, progenitores eritroides terminais no baço; E. Baso/E. Proeri\_BA, proporção de eritroblastos basofílicos por proeritroblasto no baço; E. Poli/E. Baso\_BA, proporção de eritroblastos policromáticos por eritroblasto basófilo no baço; E. Orto/E. Poli\_BA, proporção de eritroblastos ortocromáticos por eritroblasto policromático no baço. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

### 6.2.5 Células não hematopoéticas

A análise celular dos nichos hematopoéticos seguiu com as células não hematopoéticas da MO. Em relação às células-tronco endoteliais (Lin-/CD45-/CD31+/Sca-1+), foi observado maior quantidade nos C57BL/6J ( $4,77 \pm 1,12 \times 10^5$  células) quando comparado aos Townes-SS ( $1,21 \pm 0,21 \times 10^5$  células), Townes-AS ( $1,86 \pm 0,64 \times 10^5$  células) e Townes-AA ( $1,11 \pm 0,23 \times 10^5$  células) aos 30 dias (Figura 20A). Aos 60 e 150 dias, porém, não foi identificada diferença na quantidade de células-tronco endoteliais dos animais (Figura 20A).

As MSC (Lin-/CD45-/CD31-/CD51+/Sca1+) da MO não demonstraram diferença entre os Townes e os C57BL/6J independentemente do genótipo ou idade (Figura 20B). As CEnMSC (Lin-/CD45-/CD31-/CD51+/Sca1-) foram encontradas em maior quantidade nos C57BL/6J ( $9,61 \pm 1,91 \times 10^5$  células) em comparação aos Townes-SS ( $3,89 \pm 1,22 \times 10^5$  células), Townes-AS ( $3,67 \pm 0,77 \times 10^5$  células) e Townes-AA ( $3,60 \pm 0,77 \times 10^5$  células) com 30 dias (Figura 20C). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $14,33 \pm 3,84 \times 10^5$  células) e os Townes-AS ( $28,24 \pm 10,56 \times 10^5$  células) apresentaram maior média de CEnMSC que os Townes-AA ( $6,44 \pm 1,93 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $7,53 \pm 3,35 \times 10^5$  células), porém apenas a diferença entre com os Townes-AS possui diferença estatística (Figura 20C). Por fim, aos 150 dias não foi encontrada diferença entre os animais (Figura 20C).

Figura 20. Células não hematopoéticas do nicho hematopoético intramedular.



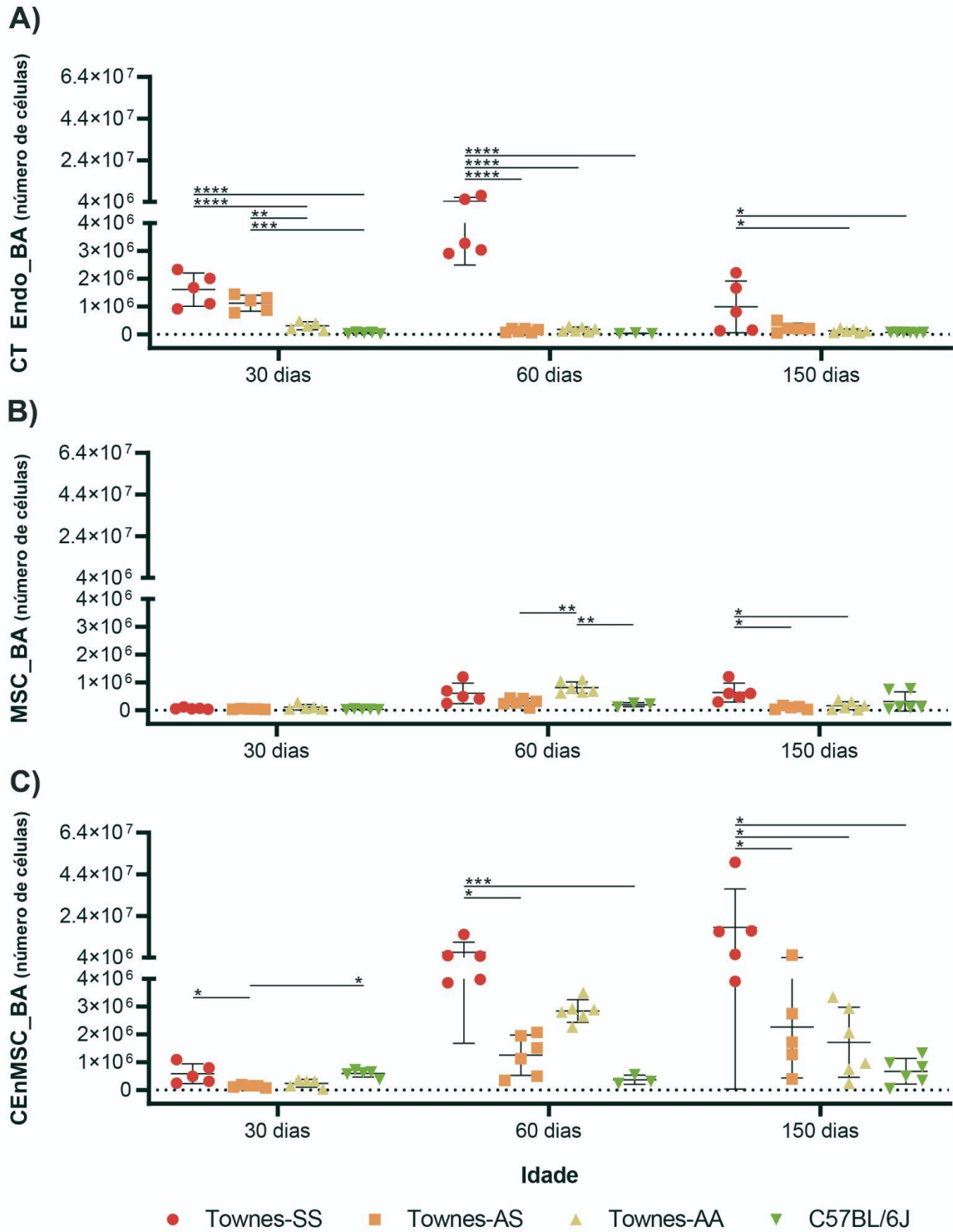
(A) Número de células-tronco endoteliais da MO; (B) número de células estromais mesenquimais da MO; (C) número de células estromais não mesenquimais da MO dos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias de vida (n= 5-6). CT Endo\_MO, células-tronco endoteliais da medula óssea; MSC\_MO, células estromais mesenquimais da medula óssea; CEnMSC\_MO, células estromais não mesenquimais da medula óssea. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

A análise das células-tronco endoteliais do baço revelou maior número de células nos Townes-SS ( $16,07 \pm 5,97 \times 10^5$  células) e Townes-AS ( $11,18 \pm 2,87 \times 10^5$  células) quando comparado aos Townes-AA ( $3,02 \pm 1,42 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $0,44 \pm 0,25 \times 10^5$  células) com 30 dias (Figura 21A). Aos 60 dias a quantidade de células dos Townes-SS ( $43,28 \pm 18,35 \times 10^5$  células) continuou maior que dos Townes-AS ( $1,30 \pm 0,65 \times 10^5$  células), Townes-AA ( $1,78 \pm 0,84 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $0,31 \pm 0,11 \times 10^5$  células) (Figura 21A). Aos 150 dias, os Townes-SS ( $9,87 \pm 9,27 \times 10^5$  células) apresentaram novamente maior número de células que os Townes-AA ( $1,22 \pm 0,67 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $0,61 \pm 0,12 \times 10^5$  células) (Figura 21A).

A análise das MSC do baço não revelou diferença entre os animais aos 30 dias (Figura 21B). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $6,04 \pm 3,66 \times 10^5$  células) e Townes-AA ( $8,14 \pm 2,05 \times 10^5$  células) revelaram maior quantidade média de MSC que os Townes-AS ( $2,87 \pm 1,32 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $1,94 \pm 0,74 \times 10^5$  células), porém apenas a diferença dos Townes-AA foi significativa (Figura 21B). Aos 150 dias, foi possível observar maior número de MSC nos Townes-SS ( $6,32 \pm 3,41 \times 10^5$  células) frente aos Townes-AS ( $0,88 \pm 0,63 \times 10^5$  células), Townes-AA ( $1,58 \pm 1,46 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $3,10 \pm 3,48 \times 10^5$  células) (Figura 21B).

As CEnMSC foram encontradas em maior quantidade nos C58BL/6J ( $5,91 \pm 1,30 \times 10^5$  células) e Townes-SS ( $5,85 \pm 3,57 \times 10^5$  células) em comparação aos Townes-AS ( $1,36 \pm 4,34 \times 10^5$  células) e Townes-AA ( $2,35 \pm 1,41 \times 10^5$  células) aos 30 dias (Figura 21C). Aos 60 dias, os Townes-SS ( $65,43 \pm 48,83 \times 10^5$  células) e os Townes-AA ( $28,40 \pm 4,04 \times 10^5$  células) apresentaram maior número de células que os Townes-AS ( $12,52 \pm 7,25 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $3,65 \pm 1,65 \times 10^5$  células), porém apenas a diferença entre com os Townes-SS possui diferença estatística (Figura 21C). Por fim, aos 150 dias os Townes-SS ( $185,24 \pm 184,88 \times 10^5$  células) revelaram maior número de CEnMSC que os Townes-AS ( $22,66 \pm 18,37 \times 10^5$  células), Townes-AA ( $17,15 \pm 12,63 \times 10^5$  células) e C57BL/6J ( $6,70 \pm 4,63 \times 10^5$  células) (Figura 21C).

**Figura 21.** Células não hematopoéticas do nicho hematopoético extramedular esplênico.



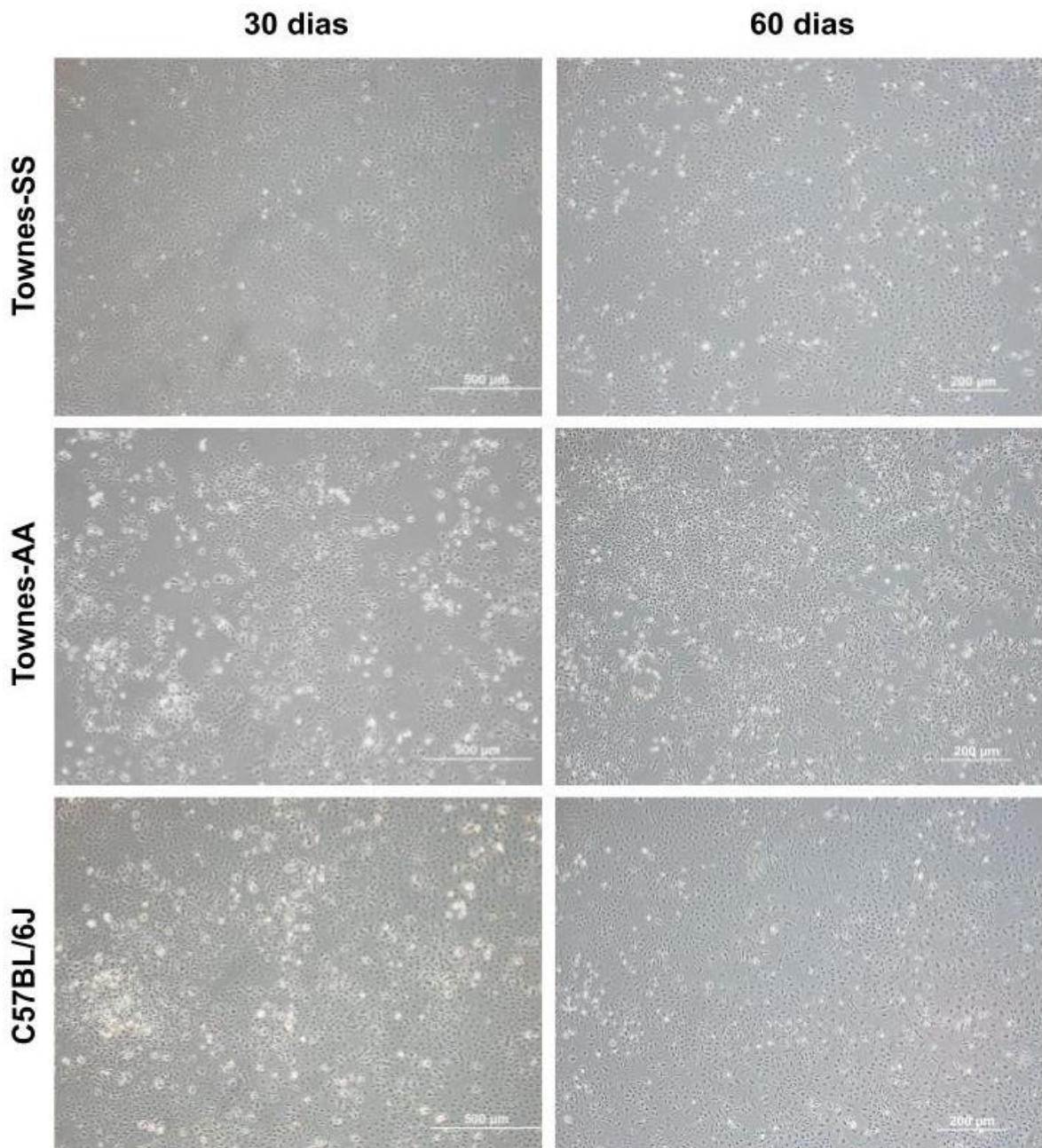
(A) Número de células-tronco endoteliais do baço; (B) Número de células estromais mesenquimais do baço; (C) Número de células estromais não mesenquimais do baço dos Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J com 30, 60 e 150 dias de vida (n= 5-6). CT Endo\_BA, células-tronco endoteliais do baço; MSC\_BA, células estromais mesenquimais do baço; CEnMSC\_BA, células estromais não mesenquimais do baço. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

## 6.3 Impactos da AF sobre as BM-MSC

### 6.3.1 Análise morfológica

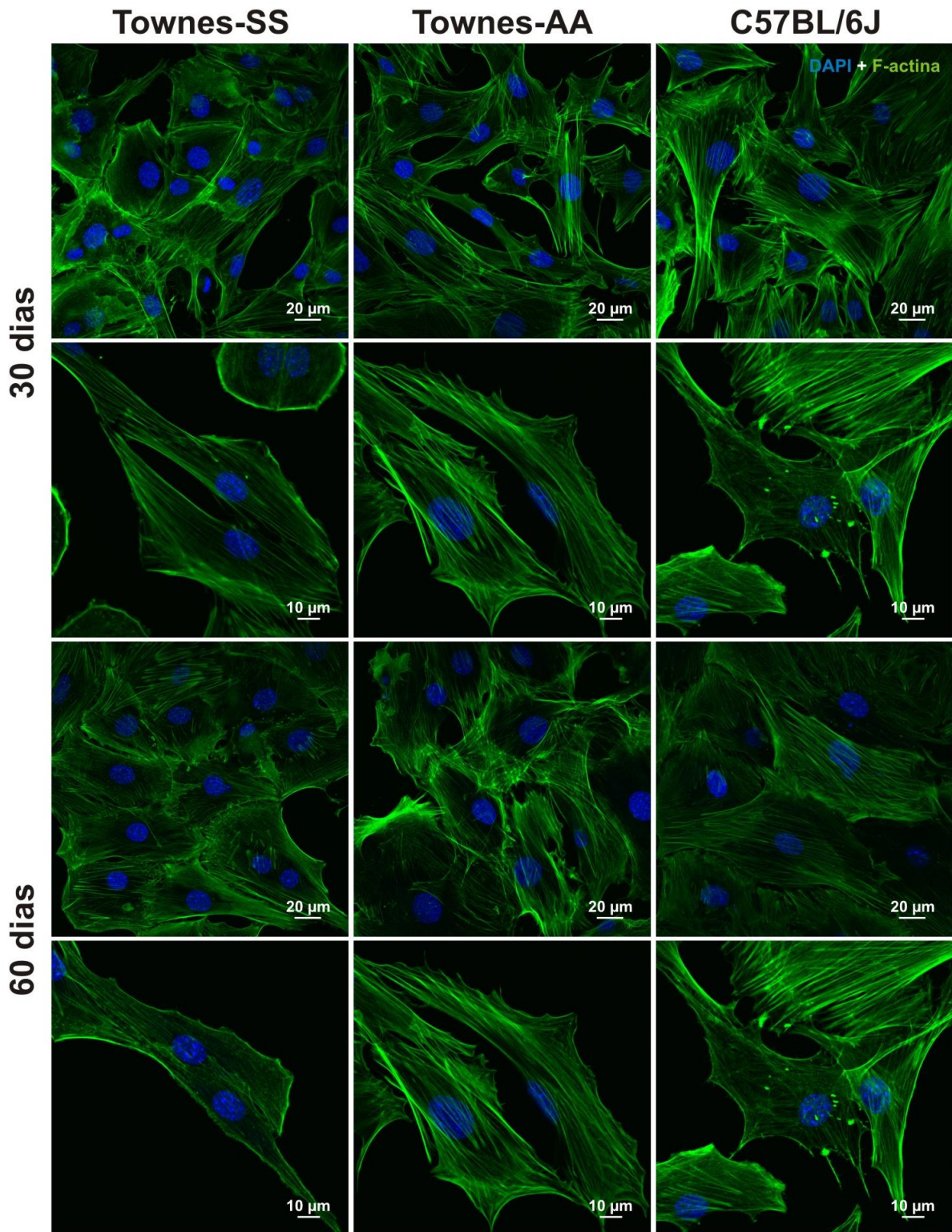
As BM-MSC isoladas dos Townes-SS, Townes-AA e C57BL/6J com 30 e 60 dias de vida foram caracterizadas inicialmente pela morfologia em condições padrão de cultura. As análises por microscopia de campo claro revelaram que ambas foram uma população de células aderentes ao plástico e com morfologia fibroblastóide (Figura 22). Adicionalmente, a análise individualizada das células por microscopia de fluorescência enfatizou o citoplasma amplo e núcleo central tanto nas BM-MSC isoladas com 30 dias quanto com 60 dias (Figura 23).

Figura 22. Morfologia das BM-MSC.



Análise morfológica das BM-MSC isoladas dos Townes-SS, Townes-AA e C57BL/7J com 30 e 60 dias por microscopia de campo claro. As células foram aderentes ao plástico e apresentaram morfologia fibroblastóide. Fonte: próprio autor.

**Figura 23.** Morfologia das BM-MSC por microscopia de fluorescência.



Análise morfológica das BM-MSC isoladas dos Townes-SS, Townes-AA e C57BL/7J com 30 e 60 dias por microscopia de fluorescência. As células apresentam morfologia fibroblastóide com núcleos centrais e

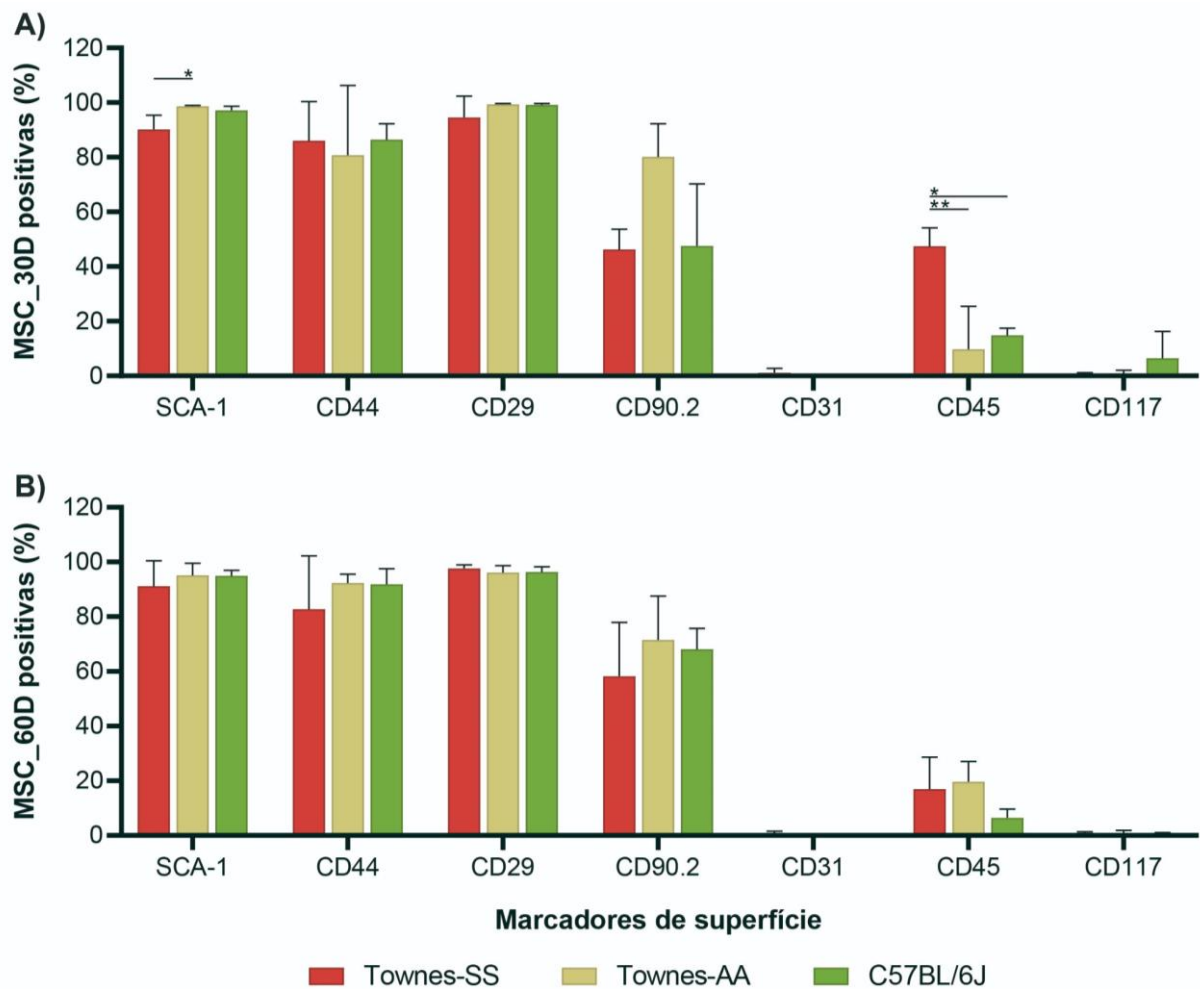
crescimento em monocamada aderente ao plástico. Imagens de sobreposição de DAPI (azul) + F-actina (verde).  
Fonte: próprio autor.

### 6.3.2 Perfil imunofenotípico

A segunda etapa de caracterização das BM-MSC foi a imunofenotipagem que revelou alta porcentagem de células positivas para Sca-1 dentre as BM-MSC isoladas dos Townes-SS ( $90,18 \pm 5,14$  %), Townes-AA ( $98,68 \pm 0,30$  %) e C57BL/6J ( $97,18 \pm 1,48$  %) com 30 dias (Figura 24A). Foi observada também alta porcentagem de células positivas para CD44 e CD29 nas BM-MSC dos Townes-SS ( $86,01 \pm 14,38$  e  $94,51 \pm 7,82$  %), Townes-AA ( $80,75 \pm 25,47$  e  $99,38 \pm 0,26$  %) e C57BL/6J ( $86,41 \pm 5,84$  e  $99,15 \pm 0,46$  %) (Figura 24A). A análise do CD90.2 em comparação aos marcadores anteriores apresentou menor porcentagem de células positivas nos Townes-SS ( $46,22 \pm 7,40$  %), Townes-AA ( $80,15 \pm 12,05$  %) e C57BL/6J ( $47,51 \pm 22,70$  %) (Figura 24A). A análise de CD31, característico de células endoteliais, revelou uma pequena porcentagem de células positivas nas BM-MSC dos Townes-SS ( $1,17 \pm 1,56$  %), Townes-AA ( $0,00 \pm 0,00$  %) e C57BL/6J ( $0,10 \pm 0,12$  %) com 30 dias (Figura 24A). A porcentagem de células positivas para CD117 (c-Kit) também foi baixa nas BM-MSC dos Townes-SS ( $0,54 \pm 0,59$  %), Townes-AA ( $0,87 \pm 1,20$  %) e C57BL/6J ( $6,45 \pm 9,82$  %) (Figura 24A). Por fim, foi observado maior porcentagem de células positivas para CD45 nas BM-MSC isoladas dos Townes-SS ( $47,45 \pm 6,72$  %) quando comparado aos Townes-AA ( $9,77 \pm 15,63$  %) e C57BL/6J ( $14,84 \pm 2,58$  %) com 30 dias (Figura 24A).

A imunofenotipagem das BM-MSC isoladas aos 60 dias de vida revelou alta porcentagem de células positivas para Sca-1, CD44 e CD29 nas BM-MSC isoladas dos Townes-SS ( $91,17 \pm 9,30$ ;  $82,72 \pm 19,55$  e  $97,62 \pm 1,31$  %), Townes-AA ( $95,11 \pm 4,41$ ;  $92,31 \pm 3,20$  e  $96,11 \pm 2,56$  %) e C57BL/6J ( $94,91 \pm 2,00$ ;  $91,85 \pm 5,66$  e  $96,38 \pm 1,86$  %) (Figura 24B). Assim como aos 30 dias, a porcentagem de células positivas para CD90.2 foi mediana, porém sem diferença entre os Townes-SS ( $58,25 \pm 19,67$  %), Townes-AA ( $71,51 \pm 16,05$  %) e C57BL/6J ( $68,18 \pm 7,55$  %) (Figura 24B). A análise de CD31 e de CD117 revelou baixa quantidade de células positivas nas BM-MSC dos Townes-SS ( $0,79 \pm 0,80$  e  $0,81 \pm 0,50$  %), Townes-AA ( $0,32 \pm 0,17$  e  $0,98 \pm 0,86$  %) e C57BL/6J ( $0,08 \pm 0,13$  e  $0,56 \pm 0,49$  %) (Figura 24B). Por fim, a porcentagem de células positivas para CD45 nas BM-MSC isoladas dos Townes-SS ( $16,98 \pm 11,71$  %), Townes-AA ( $19,62 \pm 7,42$  %) e C57BL/6J ( $6,43 \pm 3,25$  %) com 60 dias foi maior do que dos demais marcadores negativos, mas não houve diferença entre os animais (Figura 24B).

**Figura 24.** Perfil imunofenotípico das BM-MSC.



Perfil imunofenotípico das BM-MSC isoladas dos camundongos Townes-SS, Townes-AA e C57BL/6J (n=3) com 30 dias de vida; e camundongos Townes-SS, Townes-AA (n=4) e C57BL/6J (n=3) com 60 dias de vida. (A) Porcentagem de células positivas para marcadores característicos de MSC murina dentro as BM-MSC isoladas dos Townes-SS, Townes-AA e C57BL/6J com 30 dias de vida; (B) Porcentagem de células positivas para marcadores característicos de MSC murina dentro as BM-MSC isoladas dos Townes-SS, Townes-AA e C57BL/6J com 60 dias de vida. MSC\_30D, células estromais mesenquimais isoladas da medula óssea aos 30 dias de vida; MSC\_60D, células estromais mesenquimais isoladas da medula óssea aos 60 dias de vida. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA e Teste Tukey's: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

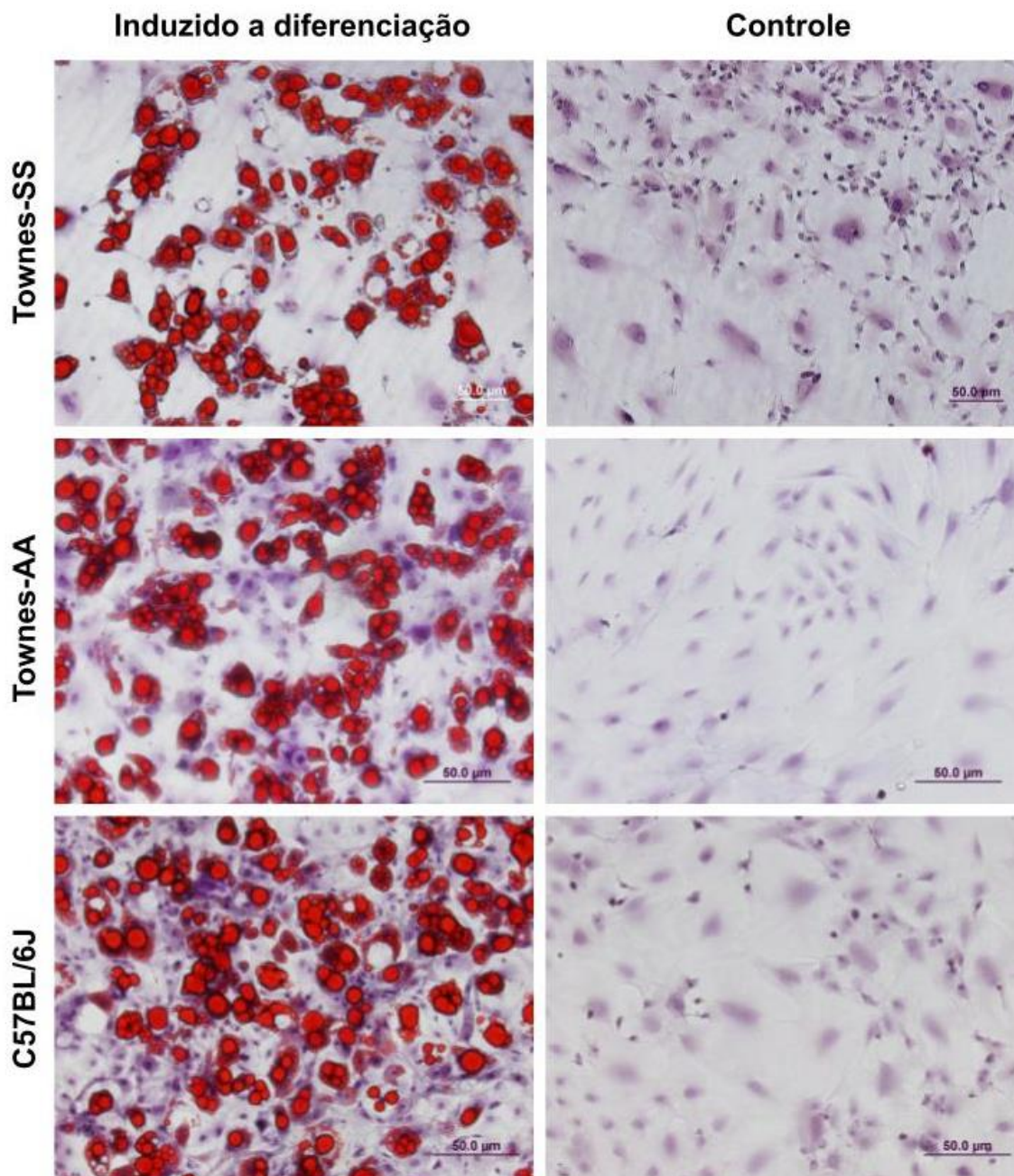
### 6.3.3 Diferenciação mesodérmica

A terceira etapa da caracterização das BM-MSC foi a capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas. Neste sentido, foi feita a análise da capacidade de diferenciação das BM-MSC em adipócitos e osteócitos. O ensaio de adipogênese mostrou que todas as linhagens celulares isoladas da MO dos Townes-SS, Townes-AA e C57BL/6J com 30 e 60 dias de vida foram capazes de se diferenciar em adipócitos dentro de 14 dias. Como pode ser observado nas figuras 25 e 26, as células induzidas à diferenciação acumularam vesículas lipídicas



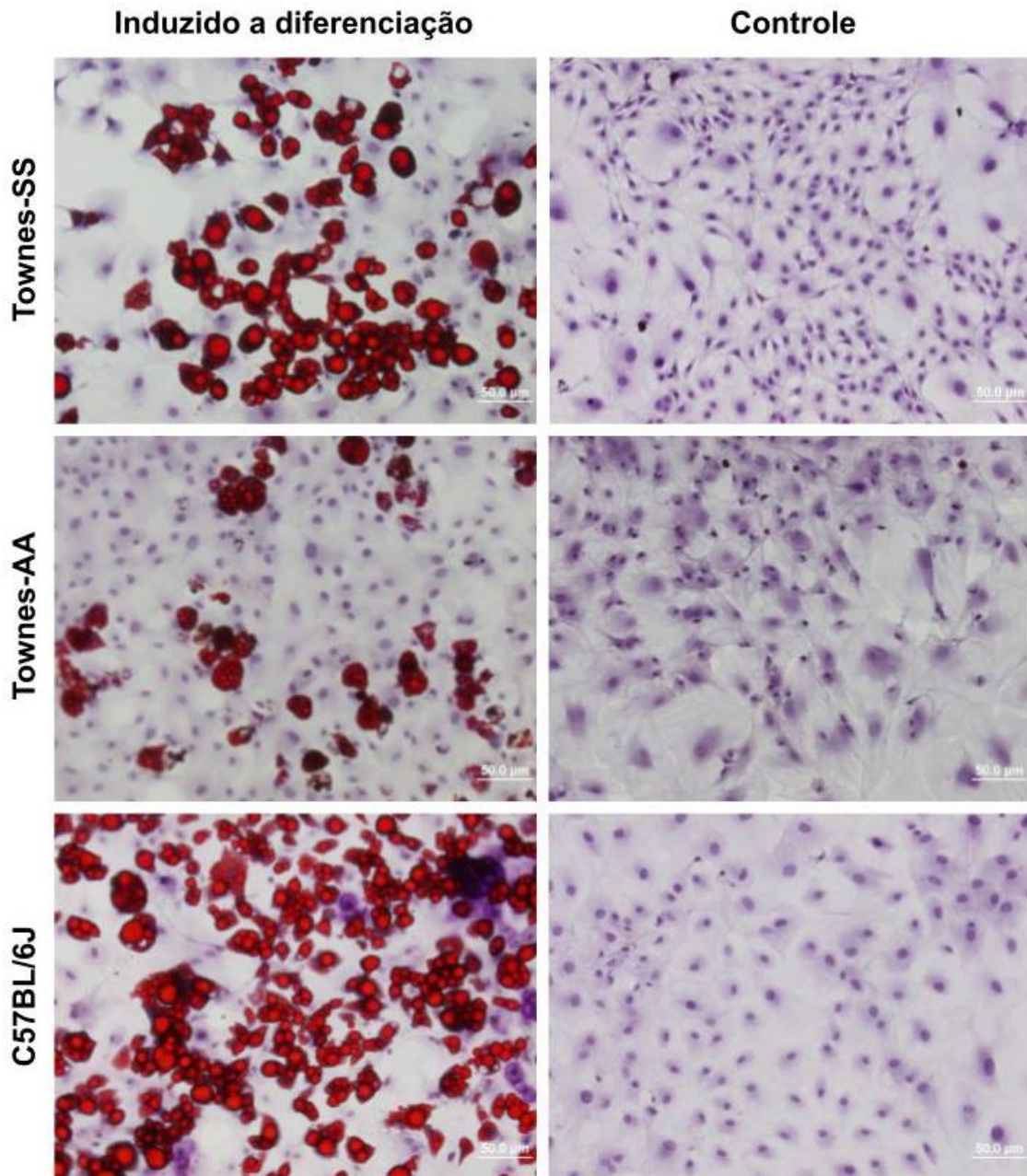
(coradas em vermelho) e adquiriram morfologia arredondada em comparação às células da condição controle.

**Figura 25.** Diferenciação adipogênica das BM-MSc isoladas com 30 dias de vida.



Diferenciação das BM-MSc em adipócitos após 14 dias de indução. (A) BM-MSc de Townes-SS com 30 dias diferenciadas em adipócitos após 14 dias de indução; (B) BM-MSc de Townes-SS com 30 dias não induzidas a diferenciação em adipócitos; (C) BM-MSc de Townes-AA com 30 dias diferenciadas em adipócitos após 14 dias de indução; (D) BM-MSc de Townes-AA com 30 dias não induzidas a diferenciação em adipócitos; (E) BM-MSc de C57BL/6J com 30 dias diferenciadas em adipócitos após 14 dias de indução; (D) BM-MSc de C57BL/6J com 30 dias não induzidas a diferenciação em adipócitos. Fonte: próprio autor.

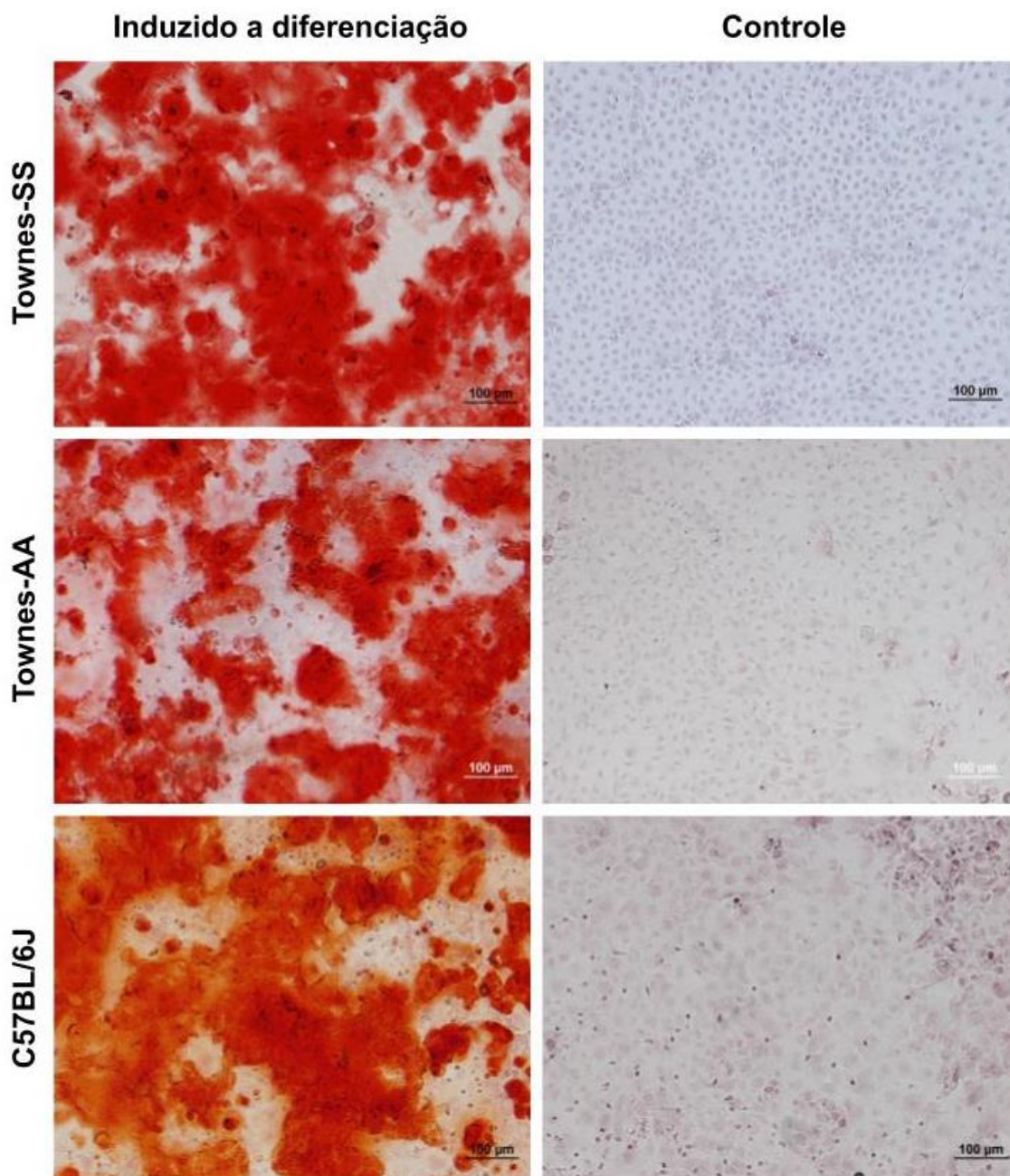
**Figura 26.** Diferenciação adipogênica das BM-MSc isoladas com 60 dias de vida.



Diferenciação das BM-MSc em adipócitos após 14 dias de indução. (A) BM-MSc de Townes-SS com 60 dias diferenciadas em adipócitos após 14 dias de indução; (B) BM-MSc de Townes-SS com 60 dias não induzidas a diferenciação em adipócitos; (C) BM-MSc de Townes-AA com 60 dias diferenciadas em adipócitos após 14 dias de indução; (D) BM-MSc de Townes-AA com 60 dias não induzidas a diferenciação em adipócitos; (E) BM-MSc de C57BL/6J com 60 dias diferenciadas em adipócitos após 14 dias de indução; (F) BM-MSc de C57BL/6J com 60 dias não induzidas a diferenciação em adipócitos. Fonte: próprio autor.

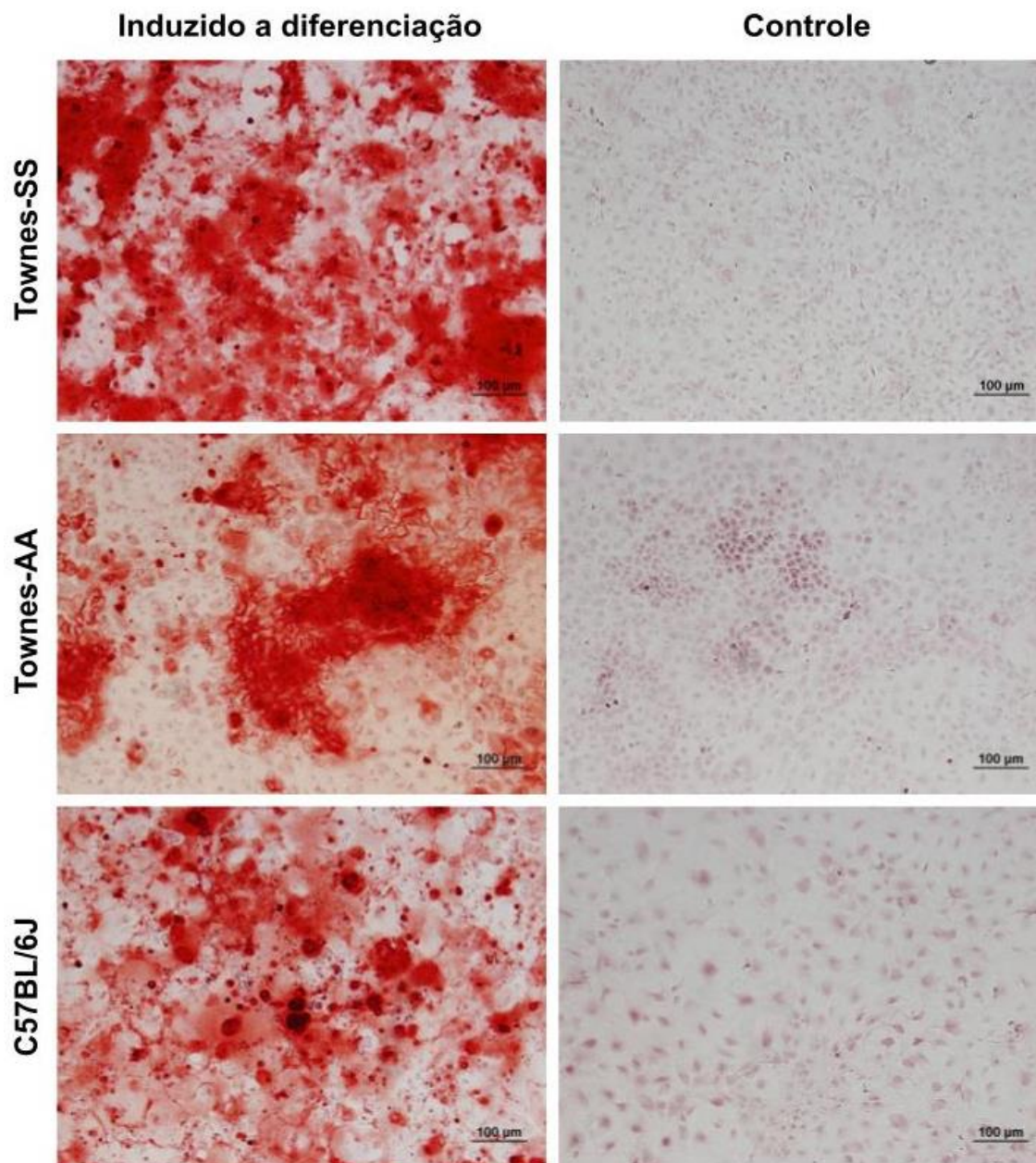
Para a diferenciação em osteócitos foram necessários 30 dias de indução. Nesta análise, todas as linhagens foram capazes de se diferenciar em osteócitos conforme observou-se pelo acúmulo de cristais oxalato de cálcio (corado em vermelho) nas células diferenciadas em relação ao controle (Figura 27 e 28).

Figura 27. Diferenciação osteogênica das BM-MSC isoladas com 30 dias de vida.



BM-MSC de animais com 30 dias de vida submetidas ao ensaio de diferenciação osteogênica por 30 dias (A) BM-MSC de Townes-SS com 30 dias diferenciadas em osteócitos; (B) BM-MSC de Townes-SS com 30 dias não induzidas a diferenciação em osteócitos; (C) BM-MSC de Townes-AA com 30 dias diferenciadas em osteócitos; (D) BM-MSC de Townes-AA com 30 dias não induzidas a diferenciação em osteócitos; (E) BM-MSC de C57BL/6J com 30 dias diferenciadas em osteócitos; (F) BM-MSC de C57BL/6J com 30 dias não induzidas a diferenciação em osteócitos. Fonte: próprio autor.

**Figura 28.** Diferenciação osteogênica das BM-MSC isoladas com 60 dias de vida.



BM-MSC de animais com 60 dias de vida submetidas ao ensaio de diferenciação osteogênica por 30 dias. (A) BM-MSC de Townes-SS com 60 dias diferenciadas em osteócitos; (B) BM-MSC de Townes-SS com 60 dias não induzidas a diferenciação em osteócitos; (C) BM-MSC de Townes-AA com 60 dias diferenciadas em osteócitos (D) BM-MSC de Townes-AA com 60 dias não induzidas a diferenciação em osteócitos; (E) BM-MSC de C57BL/6J com 60 dias diferenciadas em osteócitos; (D) BM-MSC de C57BL/6J com 60 dias não induzidas a diferenciação em osteócitos. Fonte: próprio autor.

### 6.3.4 Perfil de expressão gênica

O perfil de expressão gênica abrangeu três grupos de genes de interesse: genes envolvidos com a regulação do sistema hematopoético (*Cxcl12*, *Angpt*, *Vegfa*), genes associados a diferenciação óssea (*Runx2*, *Dlx6*, *Spp1*) e genes relacionados com a inflamação (*Tnfa*, *Il6* e *Il1*).

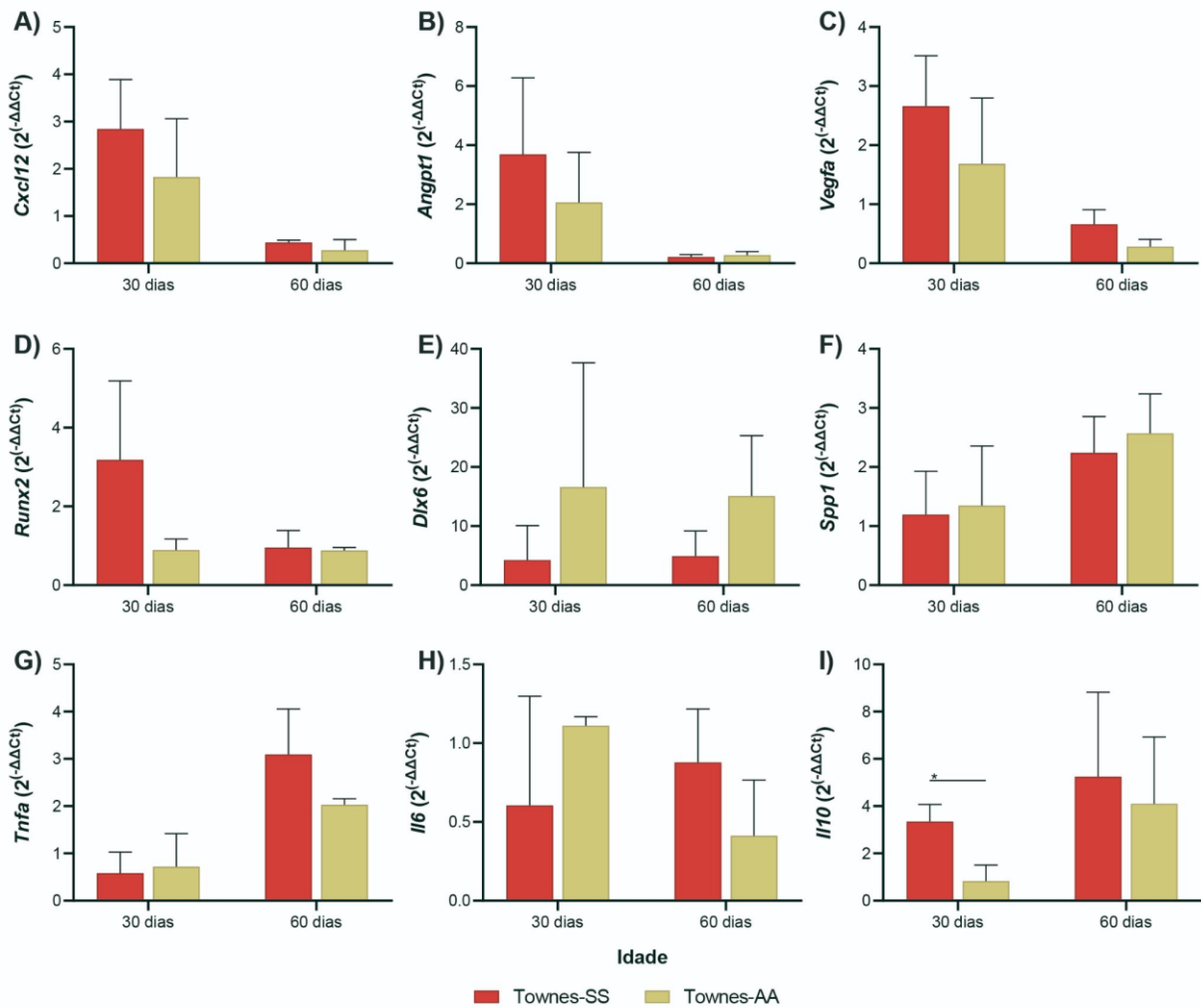
A análise dos envolvidos com a regulação do sistema hematopoético revelou que as BM-MSC isoladas dos Townes-SS ( $2,84 \pm 1,04$ ) e dos Townes-AA ( $1,82 \pm 1,23$ ) expressaram duas e meia vezes e uma vez e meia mais *Cxcl12* aos 30 dias (Figura 29A), respectivamente. Entretanto, aos 60 dias, a expressão de *Cxcl12* foi menor tanto nos Townes-SS ( $0,44 \pm 0,51$ ) quanto nos Townes-AA ( $0,28 \pm 0,22$ ) (Figura 29A). A expressão de *Angpt1* foi três vezes e meia maior nos Townes-SS ( $3,69 \pm 2,58$ ) e duas vezes maior nos Townes-AA ( $2,06 \pm 1,70$ ) com 30 dias (Figura 29B). Porém, aos 60 dias, as BM-MSC dos Townes-SS ( $0,27 \pm 0,12$ ) e Townes-AA ( $0,21 \pm 0,08$ ) apresentaram expressão reduzida de *Angpt1* (Figura 29B). A análise do *Vegfa* demonstrou expressão duas vezes e meia maior e uma vez e meia maior nas BM-MSC isoladas dos Townes-SS ( $2,66 \pm 0,85$ ) e Townes-AA ( $1,68 \pm 1,11$ ) com 30 dias, respectivamente (Figura 29C). Aos 60 dias, foi observada menor expressão de *Vegfa* nas BM-MSC dos Townes-SS ( $0,66 \pm 0,32$ ) e Townes-AA ( $0,28 \pm 0,12$ ) (Figura 29C).

Em relação aos genes associados a diferenciação óssea, observou-se que o *Runx2* foi três vezes mais expresso nas BM-MSC dos Townes-SS ( $3,18 \pm 2,00$ ) e levemente menos expresso nos Townes-AA ( $0,89 \pm 0,28$ ) aos 30 dias (Figura 29D). Aos 60 dias, não houve alteração na expressão de *Runx2* nas BM-MSC dos Townes-AA ( $0,88 \pm 0,07$ ) e dos Townes-SS ( $0,95 \pm 0,47$ ) (Figura 29C). A expressão média de *Dlx6*, aos 30 dias, foi quatro vezes maior nos Townes-SS ( $4,26 \pm 5,81$ ) e 16 vezes maior nos Townes-AA ( $16,62 \pm 21,01$ ) (Figura 29E). O mesmo perfil foi observado aos 60 dias, onde as BM-MSC dos Townes-SS ( $4,90 \pm 3,64$ ) apresentaram expressão média cinco vezes maior e os Townes-AA ( $15,08 \pm 10,23$ ) 15 vezes maior (Figura 29E). A análise de *Spp1* aos 30 dias, revelou semelhança entre a expressão gênica média das BM-MSC dos Townes-SS ( $1,19 \pm 0,73$ ) e Townes-AA ( $1,35 \pm 1,01$ ) (Figura 29F). Entretanto, aos 60 dias, as BM-MSC dos Townes-SS ( $2,24 \pm 0,61$ ) e Townes-AA ( $2,57 \pm 0,67$ ) expressaram duas vezes mais *Spp1* (Figura 29F).

A análise dos genes relacionados com a inflamação revelou que as BM-MSC isoladas dos Townes-SS ( $0,58 \pm 0,44$ ) e Townes-AA ( $0,72 \pm 0,70$ ) com 30 dias apresentaram expressão reduzida de *Tnfa* (Figura 29G). Aos 60 dias, a expressão de *Tnfa* tornou-se três vezes maior nos Townes-SS ( $3,09 \pm 1,41$ ) e duas vezes maior nos Townes-AA ( $2,03 \pm 0,12$ ) (Figura 29G). A expressão gênica de *Il6* pelas BM-MSC dos Townes-SS ( $0,60 \pm 0,69$ ) com 30 dias mostrou-se reduzida, enquanto as células dos Townes-AA ( $1,11 \pm 0,054$ ) apresentaram expressão semelhante ao controle (Figura 29H). Aos 60 dias as BM-MSC dos Townes-SS ( $0,88 \pm 0,41$ ) e Townes-AA ( $0,41 \pm 0,35$ ) apresentaram expressão reduzida de *Il6* (Figura 29H). Por fim, a expressão gênica de *Il10* das BM-MSC dos Townes-SS ( $3,35 \pm 0,72$ ) foi três vezes maior,

enquanto os Townes-AA ( $0,83 \pm 0,67$ ) apresentaram expressão levemente reduzida (Figura 29I). Aos 60 dias, as BM-MSC dos Townes-SS ( $5,24 \pm 3,56$ ) e dos Townes-AA ( $4,10 \pm 2,83$ ) expressaram cinco e quatro vezes mais *Il10*, respectivamente (Figura 29I).

**Figura 29.** Perfil de expressão gênica das BM-MSC.



Avaliação da expressão relativa dos genes *Cxcl12* (A), *Angpt* (B), *Vegfa* (C), *Runx2* (D), *Dlx6* (E), *Spp1* (F), *Tnfa* (G), *Il6* (H) e *Il10* (I) nas BM-MSC dos camundongos Townes-SS, Townes-AA (n=3) com 30 e 60 dias de vida. Foi utilizado o método  $\Delta\Delta C_t$  para determinar o nível de expressão relativa de cada gene utilizando os C57BL/6J como referência. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. Teste T não pareado: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

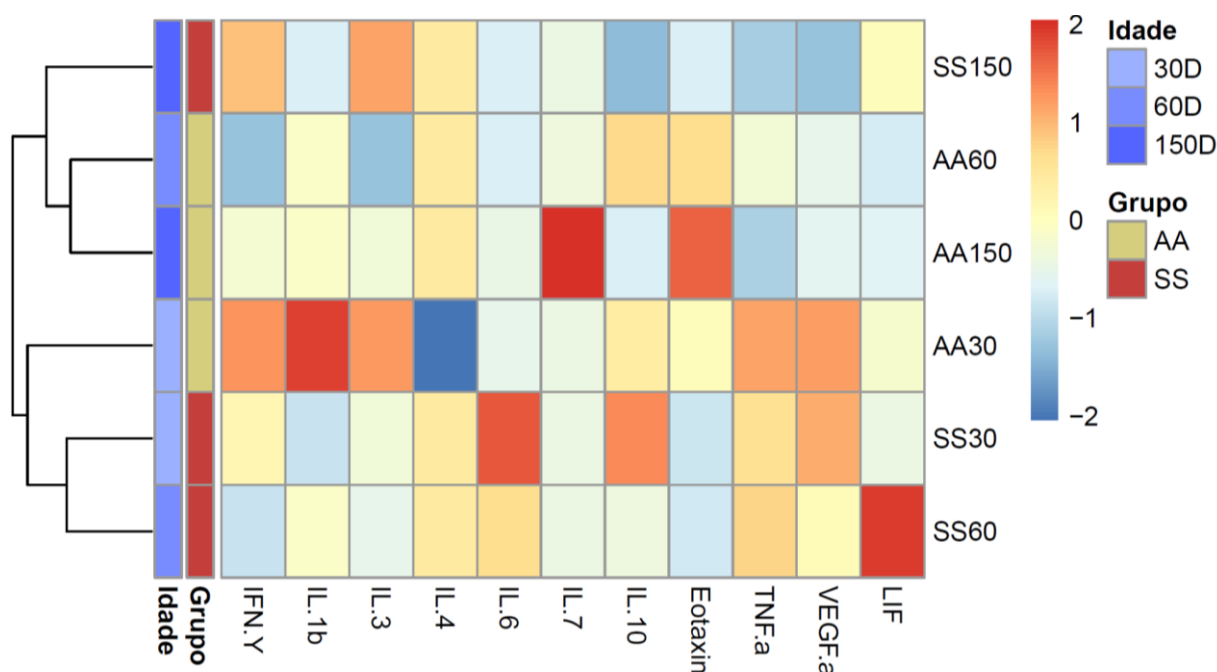
#### 6.4 Perfil de citocinas plasmáticas dos camundongos falciformes

A análise do perfil de citocinas plasmáticas obtido da média dos Townes-SS e Townes-AA revelou a formação de um primeiro *cluster* entre os Townes-AA com 60 e 150 dias e deste com os Townes-SS aos 150 dias. Adicionalmente, um segundo *cluster* se formou entre os Townes-SS com 30 e 60 dias e se uniu aos Townes-AA com 30 dias (Figura 30).

O primeiro *cluster* apresentou baixos níveis de *Tnfa*, *Vegfa* e *Lif* com um incremento de eotaxina nos Townes-AA e maiores níveis de *Ifng* e *Il3* nos Townes-SS com 150 dias. Por fim, foi encontrada uma alta quantidade média de *Il7* nos Townes-AA com 150 dias, porém este perfil não se repetiu nas demais idades do genótipo (Figura 30).

Já no segundo *cluster* formado pelos Townes-SS com 30 e 60 dias e os Townes-AA com 30 dias apresentaram maiores níveis de *Tnfa*, *Vegfa* e *Lif*, além de maior quantidade de *Il6* nos Townes-SS em relação aos Townes-AA. Adicionalmente, os Townes-AA com 30 dias revelaram a maior quantidade de *IL1b* dentre as médias analisadas, além de níveis de *Ifng* e *Il3* que só foram encontrados de forma semelhante nos Townes-SS com 150 dias (Figura 30).

**Figura 30.** Heatmap da média de citocinas plasmáticas.



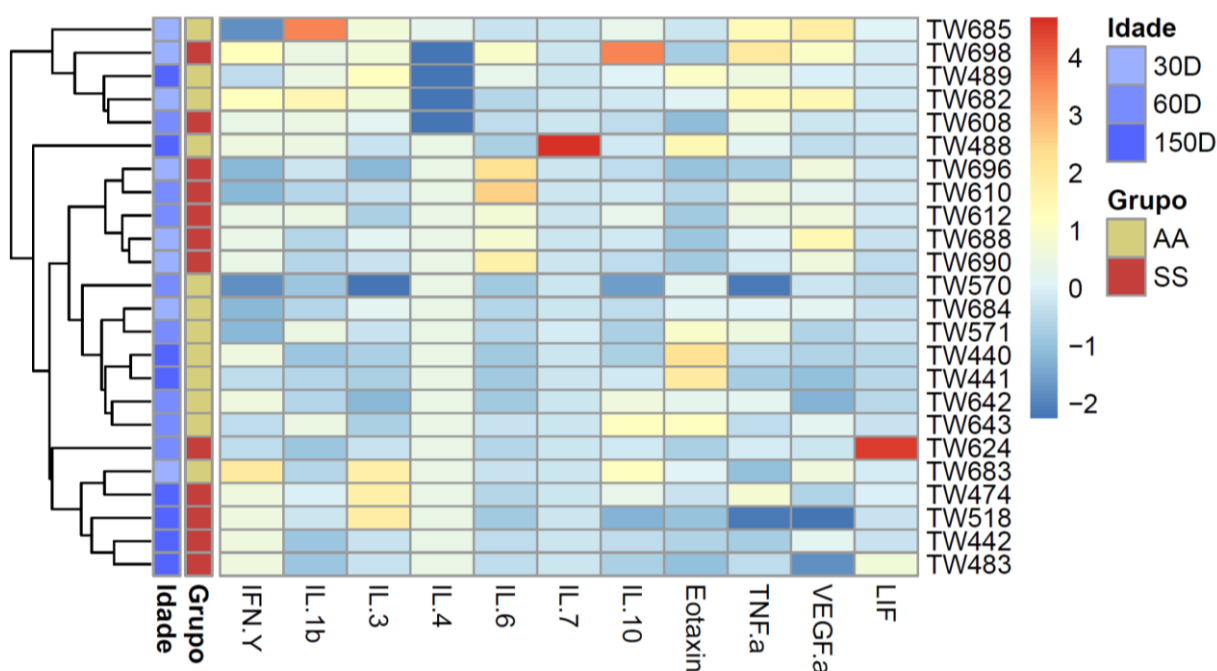
Heatmap da média dos níveis de IFN-γ, IL-1b, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF-α, VEGF-α, eotaxina e LIF plasmáticos (azul representa os menores níveis e o vermelho os maiores) dos camundongos Townes-SS (vermelho) e Townes-AA (amarelo) (n=4) com 30, 60 e 150 dias de vida (gradiente de cor azul). Fonte: próprio autor.

A análise do perfil de citocinas seguiu com a observação do perfil de citocinas individual, ou seja, dos níveis apresentados por cada um dos quatro animais que compuseram os grupos (Figura 31). Nesta abordagem foi observada a formação de quatro principais *clusters* de perfil de citocina, sendo eles: i) Townes-AA com 30 e 60 dias e dois Townes-SS (um com 30 e um com 60 dias); ii) Townes-SS com 30 e 60 dias; iii) Townes-AA com 30, 60 e 150 dias; e iv) Townes-SS com 60 e 150 dias e um Townes-AA com 30 dias.

A análise dos animais separadamente confirmou os maiores níveis de *Tnfa* e *Vegfa* nos Townes-SS com 30 e 60 dias. Já nos Townes-AA com 30 dias, observou-se maiores níveis de *Il6* nos Townes-SS com 30 e 60 dias, porém não se confirmou a maior quantidade de *Lif* observada na média dos Townes-SS com 60 dias (Figura 31). Adicionalmente, foram observados que maiores níveis de eotaxina plasmáticos observados nas médias dos Townes-AA quando comparados aos Townes-SS se confirmam na análise individual (Figuras 30 e 31). Além disso, os níveis de *Il1b* realmente são maiores em diversos Townes-AA quando comparado aos Townes-SS (Figura 31).

Por fim, não foram encontradas diferenças claras entre os níveis de *Il3*, *Il4*, *Il7* e *Lif* dos animais. Assim como no *Lif*, o aumento de *Il7* observado na análise das médias não foi confirmado como um perfil do grupo por se tratar da presença de altos níveis das citocinas em apenas um animal do grupo (Figura 31).

**Figura 31.** Heatmap dos níveis de citocinas plasmáticas individuais.



Heatmap dos níveis individuais de IFN- $\gamma$ , IL-1b, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$ , VEGF- $\alpha$ , eotaxina e LIF plasmáticos (azul representa os menores níveis e o vermelho os maiores) dos camundongos Townes-SS (vermelho) e Townes-AA (amarelo) (n=4) com 30, 60 e 150 dias de vida (gradiente de cor azul). Fonte: próprio autor.

## 6.5 Impactos da HU sobre as células dos nichos hematopoéticos

### 6.5.1 Análise do peso corporal, esplênico e hepático após HU

O tratamento dos Townes-SS ( $22,66 \pm 3,97$  g) e Townes-AA ( $23,44 \pm 3,18$  g) com HU não promoveu redução de peso vivo quando comparado com os Townes-SS ( $26,25 \pm 3,44$  g) e Townes-AA ( $25,50 \pm 4,05$  g) com 60 dias, sem tratamento (Figura 32A). Entretanto, o

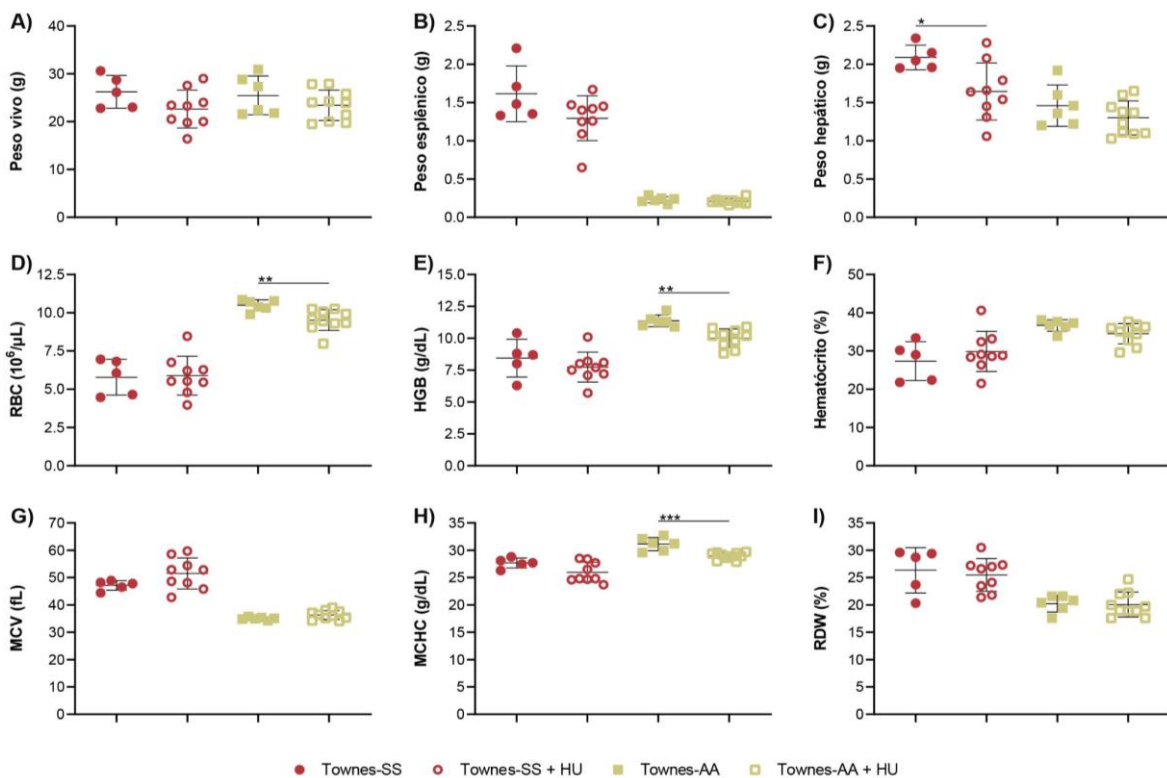


tratamento com HU promoveu uma redução no peso esplênico e hepático médio dos Townes-SS tratados ( $1,30 \pm 0,29$  e  $1,65 \pm 0,37$  g) em comparação aos Townes-SS sem tratamento ( $1,62 \pm 0,36$  e  $2,09 \pm 0,16$  g) (Figura 32B e 32C). Com relação aos Townes-AA, apenas o peso hepático demonstrou uma discreta redução, sem significância estatística com o número de animais estudados (Figura 32B e 32C).

### 6.5.2 Análise sanguínea após HU - Eritrograma

O eritrograma dos Townes-AA após HU revelou redução do RBC ( $9,52 \pm 0,68 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), HGB ( $10,01 \pm 0,72$  g/dL) e do MCHC ( $28,97 \pm 0,64$  g/dL) quando comparado ao Townes-AA com 60 dias sem tratamento ( $10,48 \pm 0,36 \times 10^6/\mu\text{L}$ ;  $11,37 \pm 0,46$  g/dL;  $10,85 \pm 0,37$  g/dL, respectivamente) (Figura 32D, 32E e 32H). Não foi observada diferença nos demais parâmetros eritrocitários dos Townes-AA e nos parâmetros dos Townes-SS submetidos à HU (Figura 32).

**Figura 32.** Eritrograma dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.



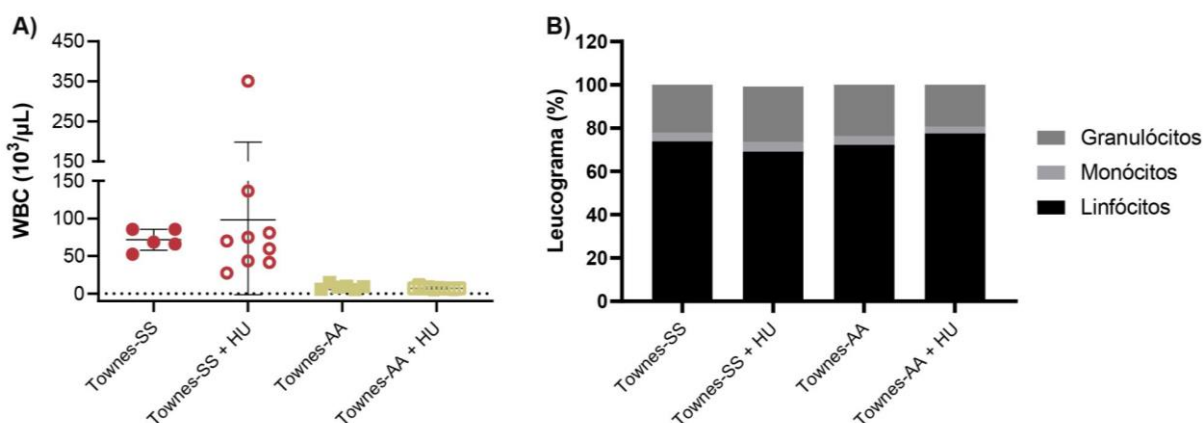
(A) Distribuição do peso vivo médio; (B) peso esplênico médio; (C) peso hepático médio; (D) contagem de células vermelhas (do inglês, *red blood cells*, RBC); (E) quantidade de hemoglobina (do inglês, *hemoglobin*, HGB); (F) valor do hematócrito; (G) volume corpuscular médio (do inglês, *mean corpuscular volume*, MCV); (H) concentração de hemoglobina corpuscular média (do inglês, *mean corpuscular hemoglobin concentration*, MCHC); (I) amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (do inglês, *red cell distribution width*, RDW) dos camundongos Townes-SS (n=5) e Townes-AA (n=6) com 60 dias de vida e Townes-SS (n=9) e Townes-AA

(n=10) com 60 dias de vida tratados 30 dias com hidroxiuréia. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. Teste T não pareado: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

### 6.5.3 Análise sanguínea após HU - Leucograma

O Leucograma dos Townes-SS e Townes-AA tratados com HU não revelou diferenças nas WBC, linfócitos, granulócitos e monócitos totais ou relativos quando comparado aos animais de mesma idade não tratados (Figura 33).

**Figura 33.** Leucograma dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.

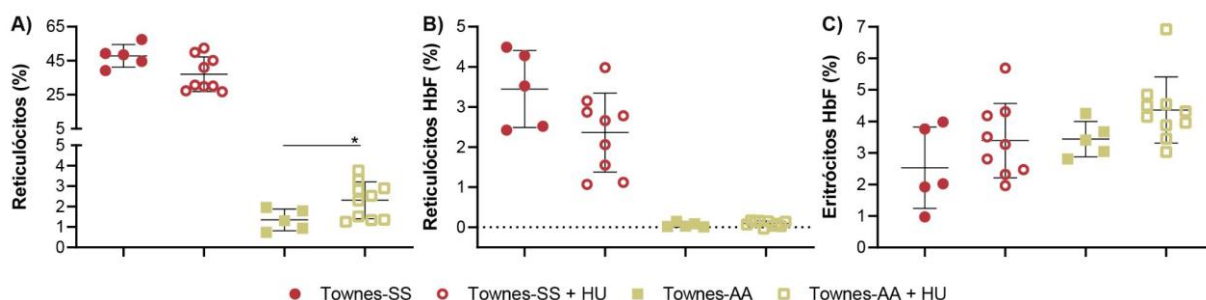


(A) Distribuição da contagem absoluta de leucócitos (do inglês, *white blood cell*, WBC); (B) Distribuição relativa dos leucócitos em linfócitos, granulócitos e monócitos dos camundongos Townes-SS (n=5) e Townes-AA (n=6) com 60 dias de vida e Townes-SS (n=9) e Townes-AA (n=10) com 60 dias de vida tratados 30 dias com hidroxiuréia. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. Teste T não pareado: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

### 6.5.4 Análise sanguínea após HU - Contagem de reticulócitos e células com HbF.

A análise dos reticulócitos, por sua vez, revelou tendência de redução na fração de reticulócitos dos Townes-SS ( $41,66 \pm 10,62$  %) tratados frente aos Townes-SS ( $47,84 \pm 6,72$  %) não tratados, ao passo que revelou aumento dos reticulócitos dos Townes-AA ( $2,77 \pm 0,91$  %) tratados em comparação aos Townes-AA ( $1,35 \pm 0,53$  %) não tratados (Figura 34A). A redução dos reticulócitos nos Townes-SS foi acompanhada da tendência de redução dos reticulócitos HbF+ nos Townes-SS ( $2,76 \pm 1,04$  %) tratados frente aos Townes-SS ( $3,45 \pm 0,96$  %) não tratados (Figura 34B). Por fim, o tratamento com HU apresentou tendência de aumento dos eritrócitos HbF+ nos Townes-SS e Townes-AA quando comparados aos Townes-SS ( $2,53 \pm 1,29$  %) e Townes-AA ( $3,43 \pm 0,56$  %) não tratados (Figura 34C).

**Figura 34.** Porcentagem de reticulócitos, reticulócitos com HbF e eritrócitos com HbF humana dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.



(A) Distribuição da porcentagem de reticulócitos; (B) reticulócitos com hemoglobina fetal (HbF) humana; (C) eritrócitos com HbF humana no sangue dos camundongos Townes-SS (n=5) e Townes-AA (n=5) com 60 dias de vida e Townes-SS (n=9) e Townes-AA (n=10) com 60 dias de vida tratados 30 dias com hidroxiuréia. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. Teste T não pareado: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

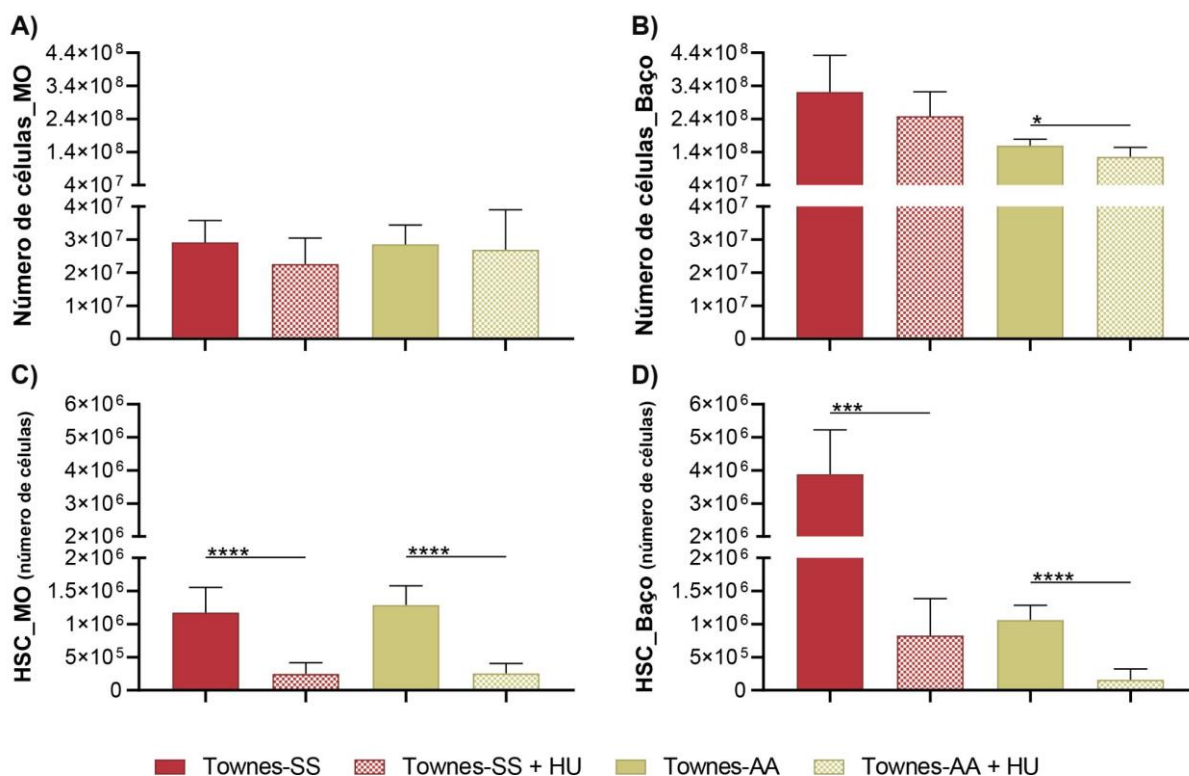
### 6.5.5 Celularidade da MO e do Baço após HU

A quantidade de células isoladas dos fêmures e das tíbias dos Townes-SS ( $2,26 \pm 0,78 \times 10^7$ ) após o tratamento foi menor que a encontrada nos Townes-SS ( $2,26 \pm 0,66 \times 10^7$ ) não tratados. O mesmo foi observado nos Townes-AA ( $2,69 \pm 1,21 \times 10^7$ ) tratados e Townes-AA ( $2,86 \pm 0,58 \times 10^7$ ) não tratados (Figura 35A). Em relação ao baço, os Townes-SS ( $24,84 \pm 7,39 \times 10^7$ ) e Townes-AA ( $12,54 \pm 2,89 \times 10^7$ ) tratados também demonstraram menor celularidade que os Townes-SS ( $32,12 \pm 11,14 \times 10^7$ ) e Townes-AA ( $15,92 \pm 1,94 \times 10^7$ ) não tratados (Figura 35B).

### 6.5.6 HSC na medula óssea e no baço após HU

A análise das HSC revelou menor quantidade de HSC na MO dos Townes-SS ( $2,20 \pm 1,68 \times 10^5$ ) após o tratamento quando comparado aos Townes-SS ( $11,75 \pm 3,83 \times 10^5$ ) não tratados. De igual forma, os Townes-AA ( $2,55 \pm 1,50 \times 10^5$ ) tratados apresentaram menos HSC na MO do que os Townes-AA ( $12,85 \pm 2,93 \times 10^5$ ) não tratados (Figura 35C). A análise do baço demonstrou que os Townes-SS ( $8,26 \pm 5,60 \times 10^5$ ) e Townes-AA ( $1,56 \pm 1,69 \times 10^5$ ) tratados tinham mais HSC no baço quando comparados aos Townes-SS ( $38,82 \pm 13,42 \times 10^5$ ) e Townes-AA ( $10,62 \pm 2,22 \times 10^5$ ) não tratados (Figura 35D).

**Figura 35.** Quantidade de células isoladas e quantidade de HSC da MO e do baço dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.



(A) Quantidade de células totais isoladas da medula óssea (MO) dos fêmures e tíbias; (B) células totais isoladas do baço; (C) quantidade de células-tronco hematopoética (do inglês, *Hematopoietic Stem Cell*, HSC) isoladas da MO; (D) quantidade de células-tronco hematopoética (do inglês, *Hematopoietic Stem Cell*, HSC) isoladas do baço dos camundongos Townes-SS (n=5) e Townes-AA (n=5) com 60 dias de vida e Townes-SS (n=9) e Townes-AA (n=10) com 60 dias de vida tratados 30 dias com hidroxauréia. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. Teste T não pareado: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

### 6.5.7 Progenitores mieloides após HU

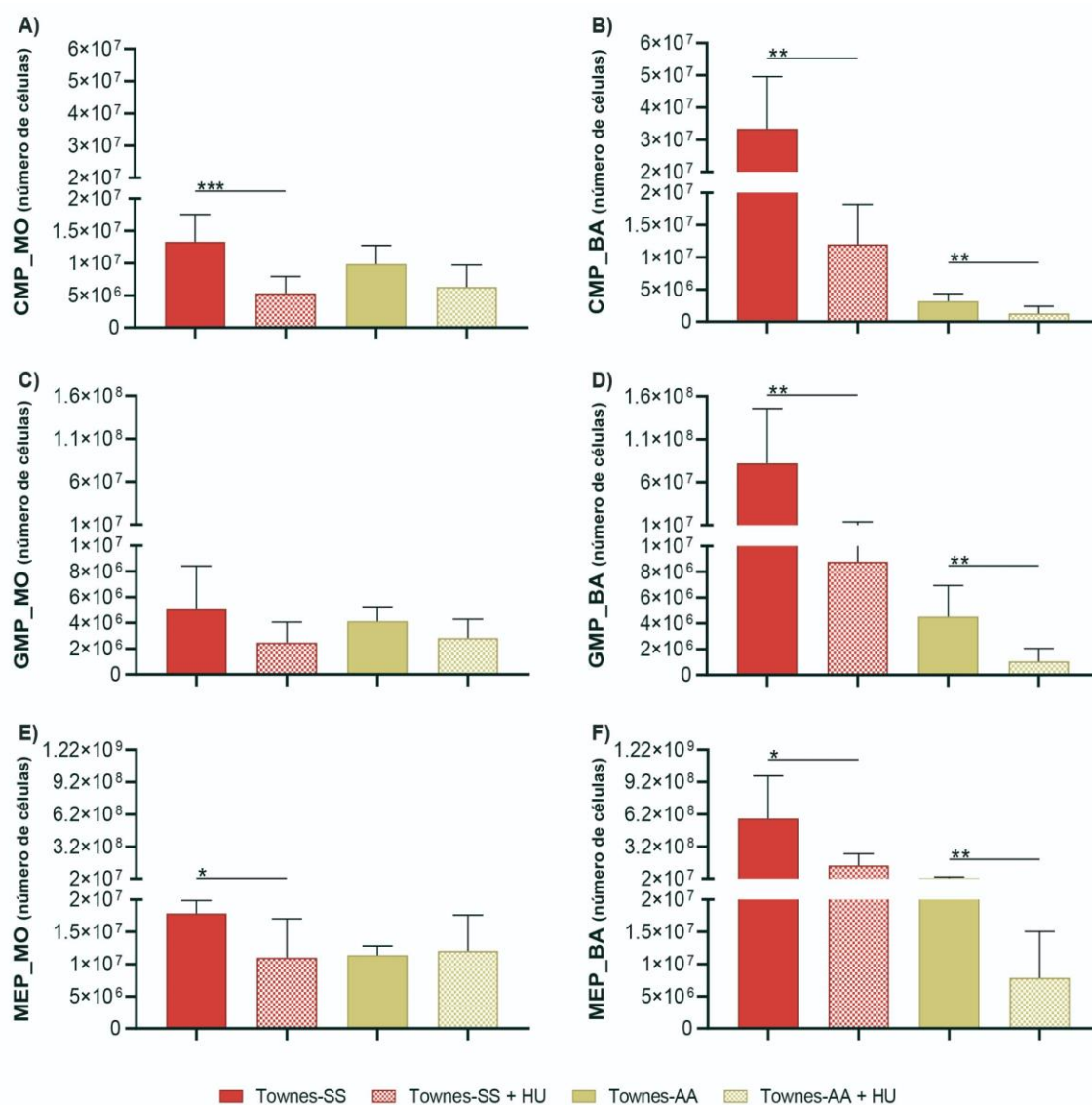
A análise dos progenitores mieloides revelou menor quantidade de CMP na MO e no baço dos Townes-SS ( $5,31 \pm 2,62 \times 10^6$  e  $12,00 \pm 6,23 \times 10^6$ , respectivamente) após o tratamento quando comparado aos Townes-SS ( $13,29 \pm 4,26 \times 10^6$  e  $33,37 \pm 16,24 \times 10^6$ , respectivamente) não tratados (Figura 36A e 36B). Os Townes-AA ( $6,29 \pm 3,40 \times 10^6$  e  $1,27 \pm 1,14 \times 10^6$ , respectivamente) tratados também apresentaram menos CMP na MO e no baço do que os Townes-AA ( $9,85 \pm 2,87 \times 10^6$  e  $3,18 \pm 1,16 \times 10^6$ , respectivamente) não tratados (Figura 36A e 36B).

Em relação aos GMP, as MO dos Townes-SS ( $2,48 \pm 1,59 \times 10^6$ ) e Townes-AA ( $2,84 \pm 1,44 \times 10^6$ ) tratados revelaram menor número de células do que a MO dos Townes-SS ( $5,12 \pm 3,30 \times 10^6$ ) e Townes-AA ( $4,13 \pm 1,12 \times 10^6$ ) não tratados (Figura 36C). No baço também foi observado menor número de GMP nos Townes-SS ( $8,79 \pm 5,02 \times 10^6$ ) e Townes-AA ( $1,06 \pm$

1,00 x10<sup>6</sup>) tratados frente aos Townes-SS (81,96 ± 63.78 x10<sup>6</sup>) e Townes-AA (4,51 ± 2,44 x10<sup>6</sup>) não tratados (Figura 36D).

Por fim, os MEP na MO dos Townes-SS (11,03 ± 6,00 x10<sup>6</sup>) após o tratamento também se apresentaram em menor número quando comparado aos MEP dos Townes-SS (17,87 ± 2,07 x10<sup>6</sup>) sem tratamento. Os Townes-AA não apresentaram diferença nos MEP da MO relacionadas ao tratamento (Figura 36E). A análise do baço demonstrou menor quantidade de MEP nos Townes-SS (143,17 ± 108,60 x10<sup>6</sup>) e Townes-AA (7,88 ± 7,16 x10<sup>6</sup>) tratados quando comparado aos Townes-SS (579,21 ± 397,62 x10<sup>6</sup>) e Townes-AA (25,06 ± 11,05 x10<sup>6</sup>) (Figura 36F).

**Figura 36.** Quantidade de CMP, GMP e MEP da MO e do baço dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.



(A)Quantidade de progenitores mieloides comuns (CMP) da MO; (B) quantidade de progenitores mieloides comuns (CMP) do baço; (C) quantidade de progenitores de granulócitos e monócitos (GMP) da MO; (D)

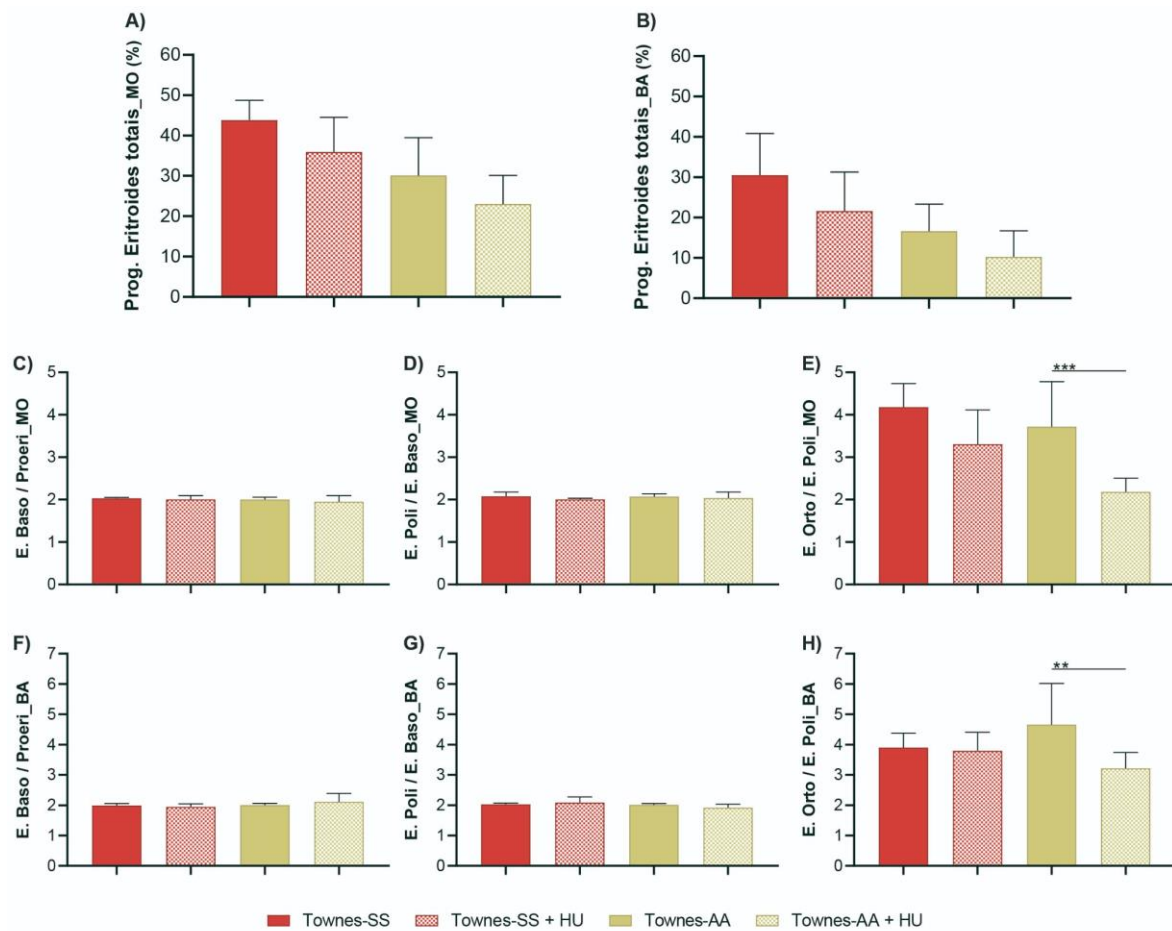
quantidade de progenitores de granulócitos e monócitos (GMP) do baço; (E) quantidade de progenitores de eritrócitos e megacariócitos (MEP) da MO; (F) quantidade de progenitores de eritrócitos e megacariócitos (MEP) do baço dos camundongos Townes-SS (n=5) e Townes-AA (n=5) com 60 dias de vida e Townes-SS (n=9) e Townes-AA (n=10) com 60 dias de vida tratados 30 dias com hidroxiuréia. CMP\_MO, progenitores mieloides comuns da medula óssea; GMP\_MO, progenitores de granulócitos e monócitos da medula óssea; MEP\_MO, progenitores de eritrócitos e megacariócitos da medula óssea; CMP\_BA, progenitores mieloides comuns do baço; GMP\_BA, progenitores de granulócitos e monócitos do baço; MEP\_BA, progenitores de eritrócitos e megacariócitos do baço. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. Teste T não pareado: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

### 6.5.8 Progenitores eritroides terminais

Os Townes-SS ( $35,92 \pm 8,59$  %) e Townes-AA ( $23,00 \pm 7,13$  %) tratados com HU apresentaram menor porcentagem de progenitores eritroides terminais (soma dos proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos) na MO quando comparado com Townes-SS ( $44,26 \pm 7,20$  %) e Townes-AA ( $30,10 \pm 49,38$  %) não tratados (Figura 37A). As análises do baço também revelaram um menor número de progenitores eritroides terminais nos Townes-SS ( $21,62 \pm 9,63$  %) e Townes-AA ( $10,27 \pm 6,43$  %) tratados frente os Townes-SS ( $30,54 \pm 10,27$  %) e Townes-AA ( $16,61 \pm 6,69$  %) não tratados (Figura 37B).

A avaliação da eritropoese terminal após o tratamento seguiu com a análise das proporções entre os progenitores. Estas análises revelaram que a proporção entre basofílicos/proeritroblastos e policromáticos/basofílicos foi mantida por volta de 2 (esperado para a espécie) na MO e baço dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não (Figura 37C, 37D, 37F e 37G). Entretanto, o tratamento resultou em menor número de ortocromáticos para cada policromático (proporção ortocromáticos/policromáticos) na MO e no baço dos Townes-SS e Townes-AA, levando a proporção de ortocromáticos/policromáticos na MO dos Townes-AA para aproximadamente 2 ( $2,18 \pm 0,32$ ) frente aos  $3,71 \pm 1,06$  dos Townes-AA não tratados (Figura 37E e 37H).

**Figura 37.** Porcentagem total e proporção mitótica dos progenitores eritroides terminais na MO e baço dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.



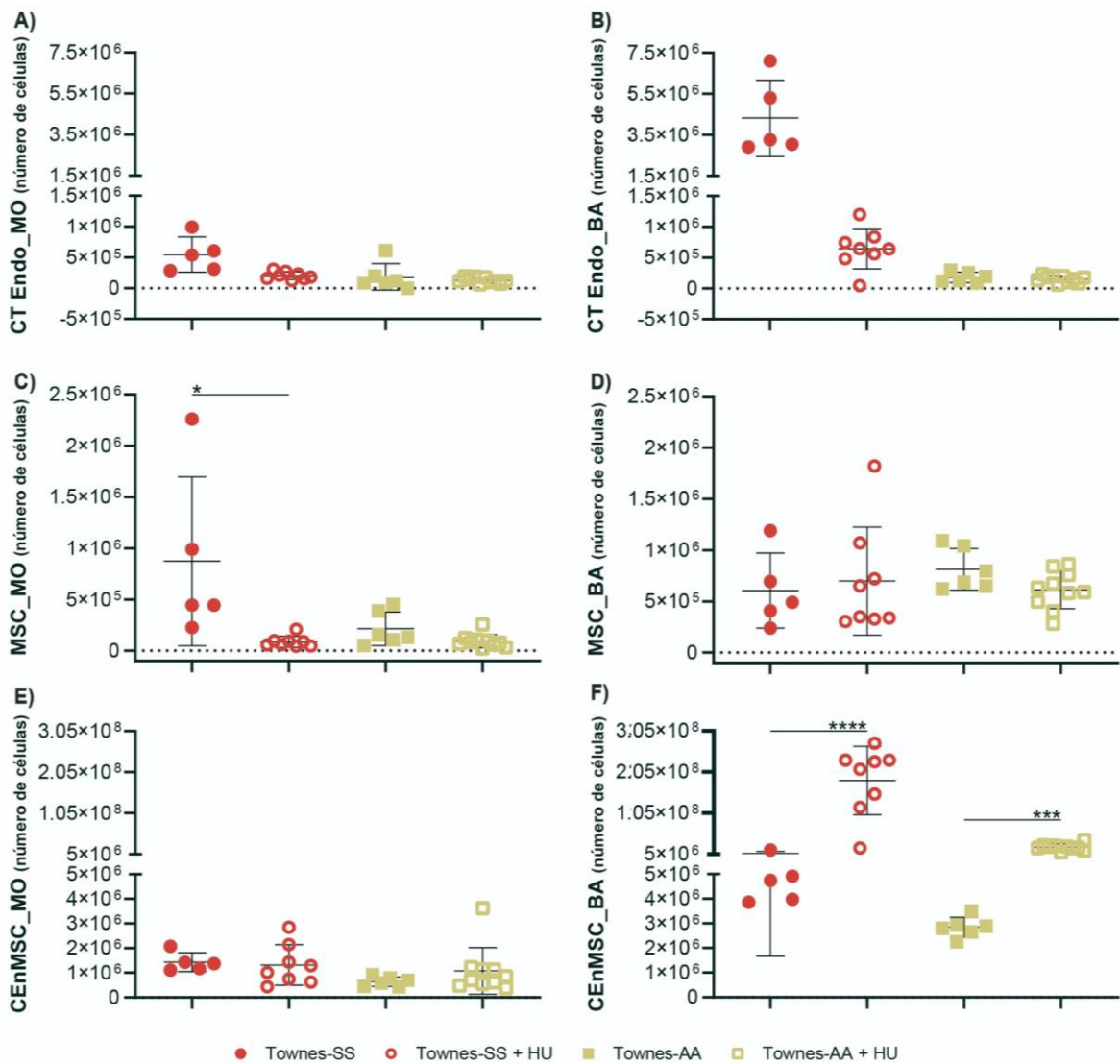
(A) Soma das porcentagens de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos da MO (dos fêmures e tíbias); (B) soma das porcentagens de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos do baço; (C) proporção de eritroblastos basofílicos para cada proeritroblasto da MO; (D) proporção de eritroblastos policromáticos para cada eritroblasto basófilo da MO; (E) proporção de eritroblastos ortocromáticos para cada proeritroblasto policromático da MO; (F) proporção de eritroblastos basofílicos para cada proeritroblasto do baço; (G) proporção de eritroblastos policromáticos para cada eritroblasto basófilo do baço; (H) proporção de eritroblastos ortocromáticos para cada eritroblasto policromático do baço dos camundongos Townes-SS (n=5) e Townes-AA (n=5) com 60 dias de vida e Townes-SS (n=9) e Townes-AA (n=10) com 60 dias de vida tratados 30 dias com hidroxiuréia. Prog. Eritroides\_MO, progenitores eritroides terminais na medula óssea; E. Baso/E. Proeri\_MO, proporção de eritroblastos basofílicos por proeritroblasto na medula óssea; E. Poli/E. Baso\_MO, proporção de eritroblastos policromáticos por eritroblasto basófilo na medula óssea; E. Orto/E. Poli\_MO, proporção de eritroblastos ortocromáticos por eritroblasto policromático na medula óssea; Prog. Eritroides\_BA, progenitores eritroides terminais no baço; E. Baso/E. Proeri\_BA, proporção de eritroblastos basofílicos por proeritroblasto no baço; E. Poli/E. Baso\_BA, proporção de eritroblastos policromáticos por eritroblasto basófilo no baço; E. Orto/E. Poli\_BA, proporção de eritroblastos ortocromáticos por eritroblasto policromático no baço. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. Teste T não pareado: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

### 6.5.9 Células não hematopoéticas

As análises das células não hematopoéticas que integram os nichos hematopoéticos revelaram que os Townes-SS ( $2,02 \pm 0,63 \times 10^5$  e  $6,44 \pm 2,26 \times 10^5$ ) tratados apresentaram menor número

de células-tronco endoteliais que os Townes-SS ( $5,45 \pm 2,85 \times 10^5$  e  $43,28 \pm 18,35 \times 10^5$ ) não tratados na MO e no baço, respectivamente (Figura 38A e 38B). A análise das MSC dos nichos hematopoéticos intra e extramedulares não demonstrou alteração numérica na MO e no baço dos Townes-SS e Townes-AA relacionada ao tratamento (Figura 38C e 38D). Por fim, a análise das CEnMSC não revelou diferença na MO dos Townes-SS e Townes-AA relacionada ao tratamento, porém no baço os Townes-SS ( $1843,59 \pm 833,03 \times 10^5$ ) e Townes-AA ( $219,97 \pm 81,02 \times 10^5$ ) tratados apresentaram maior quantidade de CEnMSC que os Townes-SS ( $65,43 \pm 48,83 \times 10^5$ ) e Townes-AA ( $28,40 \pm 4,04 \times 10^5$ ) não tratados (Figura 38E e 38F).

**Figura 38.** Células não hematopoéticas do nicho hematopoético intramedular e extramedular esplênico dos Townes-SS e Townes-AA tratados ou não com HU.



(A) Número de células-tronco endoteliais da MO; (B) número de células-tronco endoteliais do baço; (C) número de células estromais mesenquimais da MO; (D) número de células estromais mesenquimais do baço; (E) número de células estromais não mesenquimais da MO; (F) número de células estromais não mesenquimais do baço dos camundongos Townes-SS (n=5) e Townes-AA (n=5) com 60 dias de vida e Townes-SS (n=9) e Townes-AA



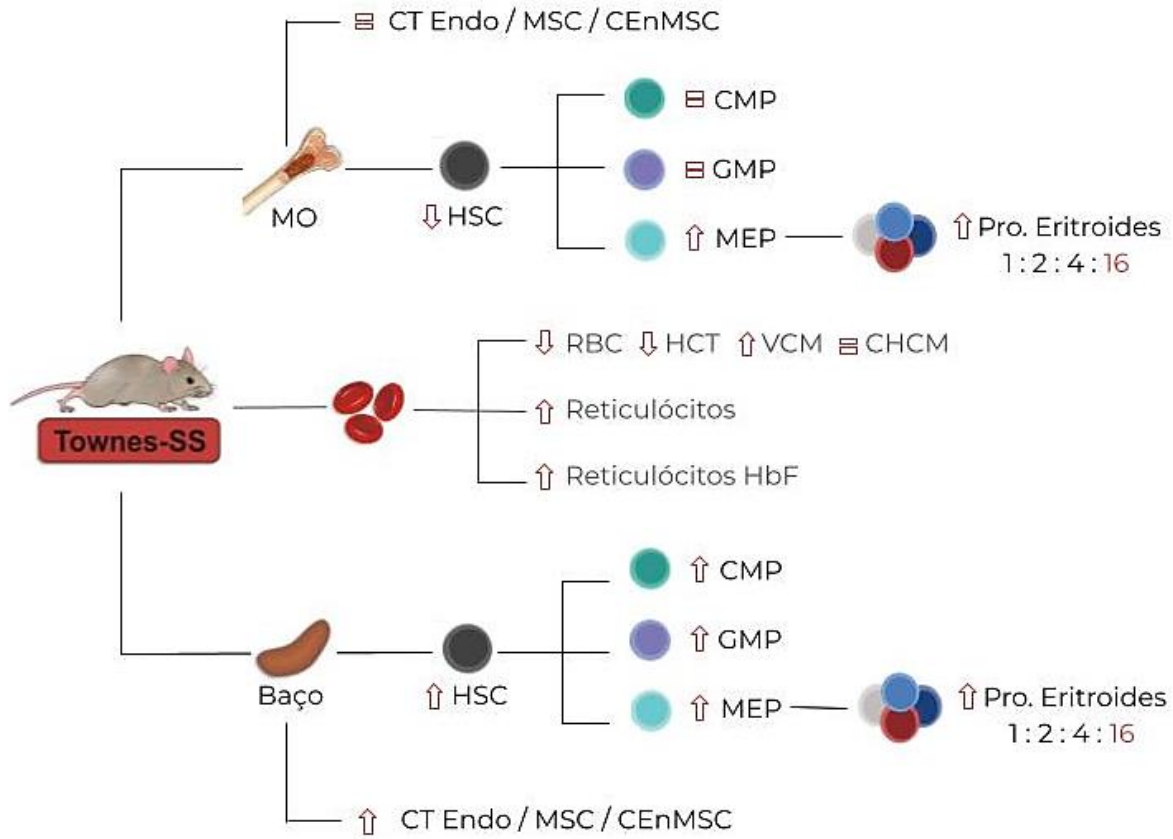
(n=10) com 60 dias de vida tratados 30 dias com hidroxiuréia. CT Endo\_MO, células-tronco endoteliais da medula óssea; MSC\_MO, células estromais mesenquimais da medula óssea; CEnMSC\_MO, células estromais não mesenquimais da medula óssea; CT Endo\_BA, células-tronco endoteliais do baço; MSC\_BA, células estromais mesenquimais do baço; CEnMSC\_BA, células estromais não mesenquimais do baço. Os dados estão expressos em relação à média e desvio padrão. Teste T não pareado: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Fonte: próprio autor.

## 6.6 Principais resultados

Neste último capítulo dos resultados serão apresentados os principais achados deste trabalho. Inicialmente, a análise sanguínea revelou que os Townes-SS apresentaram anemia com reticulocitose e presença de eritrócitos e reticulócitos HbF. No nicho hematopoético intramedular foi observada tendência de redução das HSC e maior número de MEP. A diferença nos MEP foi acompanhada de maior frequência dos progenitores eritroides terminais totais com destaque para os eritroblastos ortocromáticos (Figura 39). A análise do nicho hematopoético extramedular esplênico revelou maior número de HSC nos Townes-SS que foi acompanhado de maior número de CMP, GMP e MEP. O maior número de MEP refletiu em maior frequência dos progenitores eritroides terminais totais, sobretudo da população de eritroblastos ortocromáticos (Figura 39). A presença expressiva de eritroblastos ortocromáticos no nicho hematopoético intramedular e extramedular esplênico dos Townes, independente do genótipo, revelou um distúrbio na proporção mitótica esperada para a diferenciação eritroide terminal de camundongos tipo selvagem em homeostase.

Adicionalmente, a análise comparativa entre Townes-SS tratados com HU durante 4 semanas e Townes-SS de mesma idade sem tratamento revelou menor frequência de reticulócitos e de reticulócitos com HbF e maior frequência dos eritrócitos HbF circulantes. A análise do nicho hematopoético intramedular dos mesmos grupos revelou menor celularidade total na MO, menor número de HSC, CMP, GMP e MEP nos Townes-SS tratados. A redução dos MEP repercutiu em menor frequência dos progenitores eritroides terminais sem alteração do distúrbio mitótico decorrente da elevada frequência de eritroblastos ortocromáticos. A análise do nicho hematopoético extramedular esplênico também demonstrou menor número de HSC, CMP, GMP e MEP nos Townes-SS tratados (Figura 40). Adicionalmente, a análise dos Townes-AA tratados com HU frente a Townes-AA não tratados revelou as mesmas reduções das HSC, progenitores mielóides e progenitores eritroides terminais observadas nos Townes-SS, porém nos Townes-AA houve uma redução dos eritroblastos ortocromáticos que ajustou a proporção mitótica após o tratamento (Figura 40).

**Figura 39.** Sumário de resultados dos Townes-SS em comparação aos Townes-AA e C57BL/6J.

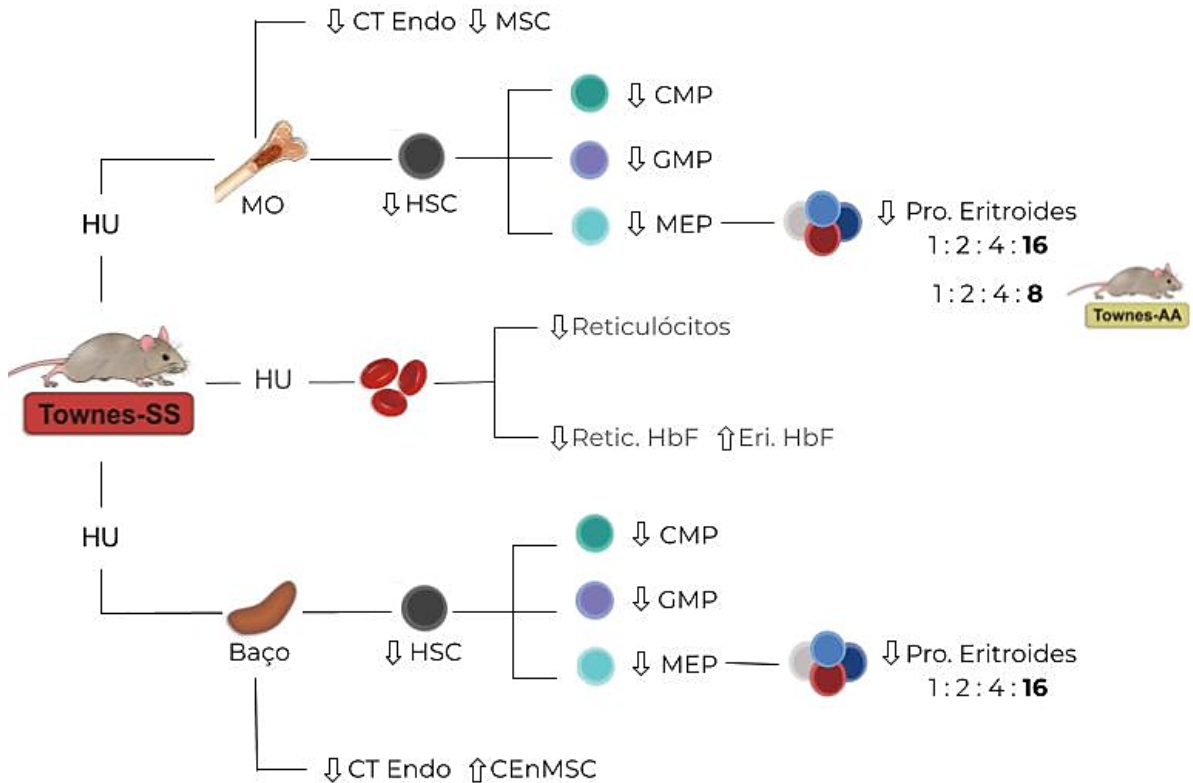


Resumo dos resultados obtidos com as análises sanguíneas e de celularidade dos nichos hematopoéticos intramedular e extramedular esplênicos dos Townes-SS em comparação com os resultados obtidos nos animais controles (Townes-AA e C57BL/6J). Na porção superior da imagem é possível observar que as análises da MO demonstraram uma tendência de menor número de HSC e um maior número de MEP e de progenitores eritroides terminais totais (Proeritroblastos + Basofílicos + Policromáticos + Ortocromáticos) nos Townes-SS frente aos Townes-AA e C57BL/6J. Adicionalmente, as células não hematopoéticas do nicho intramedular não revelaram diferenças entre os animais. No centro da imagem é possível observar que os Townes-SS apresentaram anemia com reticulocitose e maior frequência de reticulócitos HbF circulantes. Na porção inferior da imagem está descrito o maior número de HSC, dos progenitores mieloides (CMP, GMP e MEP) e maior frequência dos progenitores eritroides terminais totais no nicho extramedular esplênico dos Townes-SS frente aos Townes-AA e C57BL/6J. Por fim, do lado direito da imagem está destacado a alteração na proporção mitótica da diferenciação eritroide terminal, encontrada no MO e no baço, associada ao elevado número de ortocromáticos. CT Endo, célula-tronco endotelial; MSVC, células estromais mesenquimais; CEnMSC, células estromais não mesenquimais; MO, medula óssea; HSC, células-tronco hematopoéticas; CMP, progenitores mieloides comuns; GMP, progenitores de monócitos e granulócitos; MEP, progenitores de eritrócitos e megacariócitos; RBC, contagem de glóbulos vermelhos; HCT, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média.

Em seguida, a análise das células não hematopoéticas que compõem o nicho hematopoético intramedular não revelou diferença na celularidade das células-tronco endoteliais, MSC e CEnMSC entre Townes-SS e Townes-AA. Entretanto, no nicho hematopoético extramedular esplênico foi observado maior número de células-tronco endoteliais, MSC e CEnMSC nos Townes-SS frente aos Townes-AA (Figura 39). Por fim, foi observado menor número de células-tronco endoteliais e MSC no nicho hematopoético

intramedular dos Townes-SS tratados com HU em comparação aos Townes-SS não tratados. No nicho hematopoético extramedular esplênico um menor número de células-tronco endoteliais também foi observado, porém houve maior número de CEnMSC nos Townes-SS tratados frente aos Townes-SS não tratados (Figura 40).

**Figura 40.** Sumário de resultados dos Townes-SS tratados com HU em comparação aos Townes-SS não tratados.



Resumo dos resultados obtidos com as análises sanguíneas e de celularidade dos nichos hematopoéticos intramedular e extramedular esplênicos dos Townes-SS tratados durante quatro semanas com HU em comparação com os resultados obtidos nos Townes-SS não tratados. Na porção superior da imagem é possível observar que as análises da MO demonstraram menor número de HSC, dos progenitores mieloides (CMP, GMP e MEP) e menor frequência de progenitores eritroides terminais totais (Proeritroblastos + Basofílicos + Policromáticos + Ortocromáticos) nos Townes-SS tratados frente aos Townes-SS não tratados. Adicionalmente, os Townes-SS tratados apresentaram menor número de CT Endo e MSC do que os Townes-SS não tratados. No centro da imagem é possível observar que os Townes-SS tratados apresentaram menor frequência de reticulócitos totais e de reticulócitos HbF com maior frequência de eritrocitos HbF circulantes. Na porção inferior da imagem pode-se observar o menor número de HSC, dos progenitores mieloides (CMP, GMP e MEP) e a menor frequência dos progenitores eritroides terminais totais descrita no nicho extramedular esplênico dos Townes-SS tratados frente aos Townes-SS não tratados. Por fim, do lado direito da imagem está destacada a manutenção alteração na proporção mitótica da diferenciação eritroide terminal, encontrada no MO e no baço, nos Townes-SS após o tratamento. Entretanto, destaca-se o ajuste na proporção mitótica encontrado nos Townes-AA após o tratamento com HU. CT Endo, célula-tronco endotelial; MSC, células estromais mesenquimais; CEnMSC, células estromais não mesenquimais; MO, medula óssea; HSC, células-tronco hematopoéticas; CMP, progenitores mieloides comuns; GMP, progenitores de monócitos e granulócitos; MEP, progenitores de eritrócitos e megacariócitos; RBC, contagem de glóbulos vermelhos; HCT, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média.

## 7. Discussão

Este trabalho descreveu pela primeira vez de forma detalhada as repercussões da mutação falciforme sobre a hematopoese, eritropoese e nichos hematopoéticos dos camundongos Townes em diferentes idades e após o tratamento com HU. Além disso, foi demonstrado que a análise conjunta da MO e do baço apresentam um comportamento celular muito semelhante ao descrito para as populações de HSC, CMP, GMP e MEP em humanos com AF frente indivíduos saudáveis. O estudo da eritropoese terminal revelou pela primeira vez um distúrbio no perfil de diferenciação mitótico com elevada frequência de eritroblastos ortocromáticos em camundongos Townes, independente do genótipo. O estudo do baço dos Townes-AA revelou hematopoese extramedular esplênica. Com isso, o uso dos Townes-AA como controle dos Townes-SS deve ser cauteloso e acompanhado de animais tipo selvagem em estudos sobre hematopoese. Por fim, as MSC da medula óssea não revelaram alterações morfológicas, mas apresentaram de forma inédita um perfil de expressão gênica que indica intensa proliferação e diferenciação das HSC em AF.

Detalhadamente, as análises contidas neste trabalho avaliaram as alterações causadas pela homozigose da mutação falciforme nos camundongos Townes-SS em comparação aos Townes-AS que representam genotipicamente humano traço falciformes e aos Townes-AA que são considerados os melhores controles para os estudos envolvendo o modelo descrito pelo grupo do Dr Ryan Townes <sup>49-50</sup>. Entretanto, estudos realizados pelo nosso grupo observaram aumento no tamanho do baço dos Townes-AA sugestivo de hematopoese extramedular esplênica. Adicionalmente, o hemograma dos Townes-AA não obedece o padrão estabelecido para camundongos de linhagens isogênicas já conhecidas e amplamente utilizadas, como os C57BL/6J. Ainda que as alterações no perfil das células sanguíneas dos Townes-AA possam não configurar doença, os camundongos da linhagem C57BL/6J foram adicionados ao trabalho, a fim de demonstrar o comportamento de cada análise em camundongos não manipulados geneticamente e para detectar possíveis alterações na hematopoese dos Townes-AA. Desta forma, as análises utilizaram Townes-SS, Townes-AS, Townes-AA e C57BL/6J, sendo os dois últimos considerados os controles humanizado e selvagem, respectivamente.

Dito isso, as alterações potencialmente causadas pela AF sobre os camundongos transgênicos começaram por um discreto atraso no desenvolvimento dos Townes-SS e Townes-AS aos 30 dias que foi sinalizado por um menor peso vivo. Essa diferença entre os animais falcêmicos e os Townes-AA não está relacionada ao sexo, visto que a proporção de

machos/fêmeas dos grupos foi 2/3 nos Townes-SS, 3/2 nos Townes-AS e 0/6 nos Townes-AA. Por isso, acredita-se que a presença de HbS humana, a anemia e as demais complicações interferiram no ganho de peso dos animais nas primeiras semanas de vida.

Outro ponto de atenção foi a esplenomegalia observada nos Townes-SS durante a análise macroscópica *post mortem*. Esta característica já foi descrita neste e em outros modelos murinos utilizados para o estudo da AF<sup>48-50</sup> e está relacionado, sobretudo, à migração de HSC da MO para o baço, visando a expansão do sistema hematopoético e aumento da produção de células sanguíneas. Conhecido como hematopoese extramedular esplênica, este mecanismo adaptativo é comum em camundongos sob condições de estresse hematopoético, como em anemias crônicas ou gestação<sup>76,49-50,93</sup>. Nestas condições, ocorre um aumento da polpa vermelha em detrimento aos folículos linfóides esplênicos que no caso dos Townes-SS é acompanhado de congestão sinusoidal com presença de eritrócitos falcizados, eventos de vaso-oclusão e lesões focais<sup>49-50</sup>.

Nos humanos com AF, entretanto, não acontece a mesma resposta à doença, pois o baço não se torna um órgão importante para a hematopoese. Ainda que exista uma possível hipertrofia esplênica até o segundo ano de vida, o baço humano evolui progressivamente para fibrose, atrofia e asplenia funcional na fase adulta<sup>94</sup>. A MO, portanto, continua sendo o órgão hematopoético primário dos pacientes e o único responsável pela produção das células sanguíneas. Por isso, a análise das alterações hematopoéticas e do nicho hematopoético em humanos se limita a MO, mas nos modelos murinos precisa abranger o baço.

Os reflexos da anemia hemolítica crônica dos animais falciformes pode ser observada para além da hematopoese extramedular, visto que durante as análises sanguíneas os Townes-SS apresentaram anemia macrocítica normocrômica quando comparado aos Townes-AS e Townes-AA. Este perfil sanguíneo obedece ao descrito para o modelo Townes<sup>49-50</sup>, mas não corresponde ao perfil dos humanos com AF que, geralmente, apresentam anemia normocítica normocrômica<sup>95</sup>. Entretanto, o aumento do MCV nos Townes-SS não torna o fenótipo dos animais menos grave, uma vez que a MCHC não se altera e com isso a polimerização não é reduzida.

A reticulocitose e a anisocitose encontradas nos Townes-SS indicam eritropoese abundante com aumento das formas jovens de eritrócitos circulantes. O mesmo aumento dos reticulócitos ocorre em humanos com AF e estão intimamente associados aos eventos de vaso-oclusão, uma vez que os reticulócitos falciformes apresentam aumento na expressão de integrinas  $\alpha 4\beta 1$ , que se ligam à fibronectina<sup>96</sup> e à proteína de adesão das células vasculares 1

(VCAM1) nas células endoteliais ativadas <sup>97</sup>, além de expressarem CD36 que se associa à trombospondina secretada por plaquetas ativadas <sup>7,17,98</sup>. Por fim, os Townes-SS apresentaram leucocitose em todas as idades, seguindo o encontrado em pacientes com AF e descrito para os camundongos falciformes.

A presença de eritrócitos e reticulócitos com HbF humana circulantes nos Townes dos 30 aos 150 dias de vida demonstra a expressão contínua do gene da  $\gamma$ -globina que foi inserido junto com o transgene da  $\beta$ -globina durante a construção do modelo Townes <sup>49-50</sup>. Entretanto, os resultados indicam que a presença da HbF não parece estar relacionada com a proteção dos eritrócitos contra a falcização e hemólise nos Townes-SS como é descrito em humanos <sup>99</sup>. Por mais que os Townes-SS apresentaram as maiores porcentagens de reticulócitos com HbF isso não resultou em aumento do número de eritrócitos com HbF. Entretanto, a influência da HbF sobre o fenótipo da doença fica claro em um estudo feito por Meiler *et. al.* (2011) que tratou Townes-SS com pomalidomida ou HU por 8 semanas. Os resultados demonstraram aumento de aproximadamente 30% do nível de HbF dos animais, independente do fármaco. Mesmo que não tenha havido aumento na proporção de células com HbF circulantes, os animais que receberam HU apresentaram redução da leucocitose, aumento na proporção M: E (células mieloides: células eritroides) no baço e na MO e redução da esplenomegalia <sup>100</sup>.

A análise celular dos sítios hematopoéticos demonstrou um aumento no número total de células esplênicas (após a lise de eritrócitos) que combina com o maior peso esplênico dos Townes-SS. O aumento celular encontrado no baço não foi acompanhado de uma redução da celularidade total da MO nos Townes-SS frente aos Townes-AS e Townes-AA. Porém, foi observada uma tendência de redução do número médio de HSC na MO dos Townes-SS. Esta redução de HSC na MO já foi descrita por Javazon *et. al.* (2012) em camundongos Berkeley. No estudo, os camundongos Berkeley apresentaram redução das células LSK (Lin-, C-kit+, Sca-1+) na MO e redução das células LSK na fase G0, além de redução na formação de colônias *in vitro* e prejuízo no potencial de enxertia das progenitoras hematopoiéticas <sup>42</sup>. A mobilização das HSC sugerida pela redução das células em G0 pode ser associada com a alta de WBC descrita em humanos e camundongos com AF <sup>42</sup>, além do aumento na demanda de produção de RBC.

O estudo de Javazon *et. al.* (2012) demonstrou ainda que as LSK dos Berkeley possuíam um aumento intracelular de ROS e peroxidação lipídica quando comparado aos animais selvagens. O dano oxidativo nas HSC dos camundongos foi relacionado ao defeito funcional e à redução do potencial de enxertia destas células quando o tratamento dos animais

com antioxidante (N-acetilcisteína) por quatro semanas melhorou a enxertia das LSK falciformes <sup>42</sup>.

Resultados semelhantes foram descritos em modelo murino para mutações no gene ATM conhecida como Ataxia Telangiectasia. O ATM controla o reparo do DNA, o ciclo celular e a homeostase redox. A ausência do gene *Atm* em camundongos *knockout* promoveu redução no número de LSK, queda no potencial de formação de colônia, perda da quiescência e falhas na autorrenovação das HSC associada ao aumento de ROS e ativação da p38 MAPK <sup>101</sup>. Assim como nos Berkeley, o tratamento com N-acetilcisteína (NAC) por seis semanas restaurou o potencial de CFU do modelo animal *knockout* para *Atm* à níveis próximos ao normal <sup>101</sup>.

Em seguida, a análise do nicho hematopoético extramedular esplênico revelou maior quantidade de HSC dos Townes-SS que nos demais animais. Em situações de hematopoese extramedular, as células estromais e endoteliais do baço aumentam a expressão de citocinas como CXCL12 e estimulam a migração das HSC <sup>76</sup>. Essa migração das HSC da MO para o baço também pode explicar a redução de HSC observada na MO dos Townes-SS, assim como pode ser a causa da redução de HSC na medula óssea dos Berkeley, descrita pelo estudo supracitado. Entretanto, as alterações funcionais das HSC, descritas Javazon *et. al.* nos Berkeley e provavelmente presentes nos Townes, não podem ser explicadas se não pelo aumento da produção de células sanguíneas em resposta à anemia e pelos impactos da inflamação e do estresse oxidativo sobre as células da MO <sup>42</sup>.

A análise dos progenitores mieloides revelou que o perfil de comprometimento das HSC em linhagens mieloides na MO e no baço está associado a um aumento progressivo dos CMP na linhagem Townes após os 60 dias, sobretudo nos Townes-SS e Townes-AS. O aumento dos CMP se associou diretamente ao maior número de MEP nos Townes-SS. O aumento dos MEP já era esperado, uma vez que a anemia resultante da redução da vida útil dos eritrócitos estimula uma diferenciação eritroide acelerada <sup>102</sup>.

O aumento dos GMP também foi observado na MO e no baço dos Townes quando comparado aos C57BL/6J após os 60 dias. Mesmo que todos os animais da linhagem Townes tenham apresentado um aumento dos progenitores avaliados, a superioridade das alterações nos Townes-SS é evidente, sobretudo no baço. O aumento dos GMP pode ser explicado, dentre outras coisas, pela dependência da interação entre os macrófagos residentes na MO e no baço e os eritroblastos durante a eritropoese. A hiperplasia de macrófagos em conjunto com hiperplasia eritroide na MO durante a eritropoese de estresse em Townes-SS

foi descrita por Gbotosho *et. al.* (2020). Adicionalmente, o estudo demonstrou a importância do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (*Nrf2*) para este sistema, uma vez que que animais *knockout* para *Nrf2* apresentam menor número de macrófagos e menor hiperplasia eritroide quando desafiados <sup>103</sup>.

O aumento da porcentagem de progenitores eritroides terminais encontrados nas análises da MO e do baço corroboram com os achados anteriores e reforçam a presença de hiperplasia eritroide intra e extramedular. A superioridade dos progenitores eritroides na MO e no baço dos Townes-SS é evidente. Porém, o aumento destes progenitores no baço dos Townes-AA confirma a presença de hematopoese e eritropoese extramedular esplênica não associada a anemia neste genótipo. Em seguida, a investigação da proporção celular revelou que eritropoese terminal dos Townes não obedeceu a relação mitótica descrita para a eritropoese intramedular murina que consiste em 1 proeritroblasto: 2 eritroblastos basofílicos: 4 eritroblastos policromáticos: 8 eritroblastos ortocromático <sup>57</sup>.

O aumento dos eritroblastos ortocromático não foi esclarecido nos experimentos realizados neste trabalho. Novos experimentos que analisem a possibilidade de uma mitose adicional ou de alterações no perfil de expressão de Ter119, CD44 e tamanho das células no processo final de diferenciação em eritrócitos serão necessários para compreender esta mudança. Em humanos, o estudo da eritropoese ineficaz na AF feito por Sara El Hoss *et. al.* (2020) revelou morte celular de eritroblastos policromático e eritroblastos ortocromático em células com elevados níveis de HbS. Além disso, o estudo *in vitro* destacou um efeito protetivo para morte celular associado a HbF induzida por pomalidomida em eritroblastos que resultou na melhora da diferenciação <sup>104</sup>.

A análise das células não hematopoéticas não demonstrou diferenças sólidas na composição celular do nicho hematopoético intramedular dos diferentes genótipos de Townes e dos C57BL/6J no que se refere às células-tronco endoteliais, MSC e CEnMSC. Entretanto, a migração de HSC e aumento dos progenitores mieloides para o baço dos Townes-SS foi acompanhada do aumento da população de células-tronco endoteliais, MSC e CEnMSC. As alterações celulares esplênicas dos Townes-SS foram semelhantes às descritas por Inra *et. al.* (2015) no baço de camundongos nos quais a hematopoese extramedular foi induzida por mieloablação, perda de sangue ou gravidez. Após a indução da hematopoese extramedular, os animais apresentaram expansão das células endoteliais produtoras de *Scf* e das células estromais positivas para o fator de transcrição 21 (*Tcf21*) produtoras de *Scf* e *Cxcl12* em torno dos sinusóides da polpa vermelha <sup>76</sup>.



O isolamento e cultivo das MSC não demonstrou diferenças morfológicas ou na capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos das BM-MSC dos Townes-SS frente aos Townes-AA ou C57BL/6J. O perfil imunofenotípico das BM-MSC apresentou alta porcentagem de células positivas para os marcadores de MSC murinas (Sca-1, CD29 e CD44) e demonstrou baixa expressão de marcadores de células endoteliais e hematopoéticas (CD31, CD117 e CD45) com exceção dos Townes-SS com 30 dias que apresentaram mais células CD45+. Porcentagens mais altas de células positivas para CD45 decorrentes de contaminação da cultura de MSC de camundongos por células hematopoéticas são descritas em diversos estudos <sup>105</sup>. Entretanto, a maior permanência destas células nas BM-MSC isoladas dos Townes-SS com 30 dias pode estar relacionada a maior expressão de *Cxcl12* e *Angpt1* destas células.

A semelhança morfológica, imunofenotípica e da capacidade de diferenciação das MSC isoladas dos Townes-SS, Townes-AA e C57BL/6J descritas em nosso estudo concorda com os resultados obtidos por Stenger *et. al.* (2018) ao avaliar MSC isoladas da MO de crianças com AF frente a doadores adultos. No estudo de Stenger *et. al.* (2018), as MSC dos pacientes apresentaram fenótipo e função semelhante aos controles e dentro dos critérios definidos pela ISCT. Adicionalmente, as MSC de pacientes e doadores analisadas por Stenger *et. al.* (2018) não apresentaram diferença na capacidade de controlar a proliferação de células T <sup>106</sup>.

O perfil de expressão gênica das BM-MSC quanto aos genes envolvidos na sustentação e na manutenção da quiescência da HSC revelou maior expressão inicial de *Cxcl12*, *Angpt1* e *Vegfa* nas BM-MSC dos Townes-SS com 30 dias que evoluiu para uma menor expressão aos 60 dias. Esta menor expressão de *Cxcl12*, *Angpt1* das BM-MSC aos 60 dias adicionada da maior expressão de *Spp1* e *Dlx6* torna o perfil das BM-MSC semelhante ao descrito por Ramos *et. al.* (2017) em MSC isoladas da MO de paciente com diferentes neoplasias mieloproliferativas (MNP) positivas para a mutação JAK2 <sup>107</sup>. Esta semelhança entre as MSC pode estar relacionada ao aumento da diferenciação da HSC presente na AF e na MNP, resultantes da anemia crônica com hematopoese extramedular e inflamação e da proliferação e expansão anormal de células mieloides maduras por conta de mutações nas HSC, respectivamente.

Um estudo desenvolvido por Schepers *et. al.* (2013) mostra que as alterações nas MSC da MO de pacientes e modelos animais com MNP vão além da redução da expressão de fatores que sustentam e promovem a quiescência das HSC. Os pesquisadores demonstraram

que a MNP remodela progressivamente o nicho endosteal da MO ao ponto de prejudicar a manutenção das HSC saudáveis e favorecer a função das células-tronco leucêmicas (LSC), além de contribuir para a fibrose da MO <sup>108</sup>.

No contexto da AF, o estudo de Elisabeth H. Javazon *et al.* (2012) mostra que os camundongos Berkeley apresentaram maior enxertia que os controles quando foram submetidos a um transplante experimental de células da MO de C57BL/6J. Foi observado ainda um aumento contínuo das células de C57BL/6J na MO do camundongo falciforme que sugere vantagens de sobrevivência e proliferação destas células no microambiente falciforme. Em seguida, as LSK dos camundongos falciformes foram submetidas ao estudo de repovoamento competitivo e demonstraram prejuízo no potencial de enxertia <sup>42</sup>. Esses resultados, assim como os obtidos em nosso estudo, não indicam uma associação clara entre as MSC e a manutenção ou potencialização da AF na MO como foi relatado no nicho hematopoético dos modelos murinos para estudo das MNP.

A avaliação das citocinas plasmáticas não revelou um perfil claramente associado ao genótipo ou idade dos animais analisados. Ainda que o armazenamento do plasma tenha sido feito seguindo as recomendações do fabricante (-80°C), o tempo de armazenamento, a hemólise associada à coleta de sangue e número de camundongos analisados podem ter influenciado os resultados. Entretanto, mesmo com essas ponderações, algumas tendências puderam ser observadas de forma a apontarem alvos para futuras investigações.

Os resultados não revelaram diferença nos níveis de IFN- $\gamma$  entres os animais, mas demonstraram maiores níveis de IL-6 aos 30 e 60 dias. Ainda que os dados sobre os níveis de IL-6 e IFN- $\gamma$  em pacientes com AF sejam inconsistentes, Pathare *et al.* (2004) <sup>109</sup>, Hibbert *et al.* (2005) <sup>110</sup> e Veiga *et al.* (2013) <sup>111</sup> já descreveram maiores níveis séricos destas citocinas pró-inflamatórias, apoiando um papel para a inflamação induzida por citocinas em pacientes com e sem crise vasclusiva.

A *Il1b* e o *Tnfa* em pacientes com AF estão associados principalmente com a ativação de monócitos e neutrófilos e essa ativação estimula a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que regula a produção de *Il4* <sup>112</sup>. Entretanto, em nossas análises não foi observado um maior nível plasmático dessas citocinas associado aos Townes-SS.

Os níveis de *Il10* mais baixos nos Townes-SS quando comparados aos Townes-AA com 30 e 60 dias podem indicar predisposição para ocorrência de vaso-oclusão, segundo estudo feito em crianças com AF. No estudo feito por Sarray *et al.* (2014), crianças em estado

estacionário possuíam *IL10* alta e *IL6* baixa, enquanto aquelas com vaso-oclusão apresentaram redução do *IL10* e aumento do *IL6* durante as crises <sup>113</sup>.

Os níveis plasmáticos de *IL3* não demonstraram diferença entre os Townes-SS e Townes-AA. Entretanto, em humanos já foram descritos maiores níveis de *IL3* em pacientes SS e SC, assim como a correlação positiva entre *IL3* e níveis de hemoglobina e níveis de HbF menores que 8,5% e correlação negativa entre *IL3* e porcentagem de reticulócitos que sugerem que a *IL-3* estimula a hematopoese em pacientes SS <sup>114</sup>.

Os maiores níveis de eotaxina-1 encontrados nos Townes-AA não concordam com o estudo feito por Pallis *et al.* (2010) que descreveu maiores níveis de eotaxina-1 plasmática em humanos com AF quando comparado aos controles <sup>115</sup>. Entretanto, Qari *et al.* (2012) não descreveu o mesmo aumento nos níveis desta citocina (responsável por induzir quimiotaxia seletiva de eosinófilo), descrito por Pallis *et al.* <sup>115-116</sup>. No segundo estudo não houve diferença entre a eotaxina plasmática dos doentes e saudáveis ao passo que revela níveis de *VEGFA* três vezes maiores nos pacientes SS., porém, o *Vegfa* dos Townes-SS também não foi maior que dos Townes-AA em nosso estudo.

Após a caracterização geral das alterações sanguíneas e celulares causadas pela inserção da hemoglobina humana saudável ou falciforme (HbS) no modelo Townes, dois novos grupos de animais: um de Townes-SS e outro de Townes-AA com 30 dias de vida foram tratados com 50 mg/kg de HU por quatro semanas (até completarem 60 dias de vida) <sup>121</sup>. O tratamento objetivou analisar os impactos da HU sobre as células e nichos hematopoéticos do modelo, além de demonstrar a possibilidade do uso dos Townes em análises preliminares do efeito de fármacos sobre células. A escolha da HU baseou-se em seu amplo uso para tratamento dos pacientes com AF devido a sua capacidade de aumentar a qualidade e expectativa de vida <sup>5,117</sup>.

Inicialmente, foi observada uma redução do peso esplênico e do peso hepático, sobretudo nos Townes-SS, após o tratamento com HU. Esta redução também foi encontrada em um trabalho comparativo entre os efeitos da HU e da pomalidomida sobre a expressão de HbF. Segundo os dados de Meiler *et al.* (2011) o tratamento com HU (100 mg/kg) e com pomalidomida (10 mg/kg) + HU (100 mg/kg) por oito semanas reduziu o peso esplênico dos Townes-SS cerca de 30% e 50%, respectivamente <sup>100</sup>. Essa redução pode estar associada à redução da eritropoese extramedular e à redução da congestão e da vaso-oclusão esplênica.

As análises sanguíneas não revelaram diferenças no eritrograma e no leucograma dos Townes-SS associadas à HU, mas foi observada redução na contagem de reticulócitos e uma

tendência de aumento dos eritrócitos com HbF. Tais dados se assemelham com o descrito por Meiler *et. al.* (2011), exceto pela redução das WBC que não foi observada em nosso estudo, provavelmente devido à diferença entre as doses de HU administradas <sup>100</sup>.

A análise dos eritrócitos com HbF revelou uma tendência de redução dos reticulócitos com HbF e uma tendência de aumento dos eritrócitos com HbF, entretanto a indução de HbF por HU pode refletir mais sobre a concentração de HbF intraeritrocitário do que na quantidade de células HbF, conforme demonstrado por Meiler *et. al.* (2011). As alterações discretas nas análises de HbF podem estar relacionadas também a dose de HU que utilizamos neste estudo (100 mg/kg) e a construção genética do modelo, cujo transgene contém apenas o gene que codifica a A $\gamma$ -globina e não contém a sequência da G $\gamma$ -globina <sup>49-50,100</sup>.

A redução da celularidade total e do número de HSC da MO e do baço observada nos Townes-AA e Townes-SS após a HU concordam com estudos que descrevem redução das células totais na MO dos Townes-SS e a redução de células-tronco e progenitoras hematopoéticas (HSPCs) no sangue e na MO de humanos após o tratamento com HU <sup>100,118-120</sup>. Segundo Uchida *et al.* (2017) pacientes tratados com HU apresentam redução dos HSPCs, além de menor número de células formadoras de colônia no sangue e na MO quando comparado com pacientes não tratados com HU, sugerindo que a HU diminuiu a hematopoese ou o número de células circulantes <sup>119</sup>. Adicionalmente, o estudo de Tolu *et. al.* (2020) demonstrou que existe uma correlação negativa entre o tempo de uso da HU e a quantidade de HSPCs no sangue periférico e na MO <sup>120</sup>.

O trabalho de Tolu *et. al.* (2020) observou ainda que os pacientes falciformes tratados com HU apresentavam menor no número de CMP, GMP e MEP por  $\mu$ L de sangue do que os pacientes submetidos a transfusão ou que não faziam uso de nenhum tratamento <sup>118-120</sup>. Tais resultados se assemelham aos nossos dados de celularidade da MO e do baço, sejam eles antes ou depois do tratamento com HU, visto que houve redução de CMP e MEP na MO dos Townes-SS tratados e redução de CMP, GMP e MEP no baço dos Townes-SS e Townes-AA após o tratamento com HU.

Como esperado, a redução dos MEP foi acompanhada de redução na porcentagem de progenitores eritroides terminais na MO e baço dos Townes, independente do genótipo. Surpreendentemente, a redução na porcentagem de progenitores foi acompanhada da redução na proporção de eritroblastos ortocromáticos/ eritroblastos policromáticos na MO dos Townes-SS e em normalização da proporção dos Townes-AA (2). A explicação para este achado está associada à elucidação do mecanismo que promove o desbalanço e precisa de

mais experimentos. Entretanto, é possível que uma maior dose de HU também consiga normalizar a proporção de eritroblastos ortocromáticos/ eritroblastos policromáticos na MO dos Townes-SS.

Por fim, não foram observadas alterações nas células não hematopoéticas do nicho hematopoético intramedular analisadas neste trabalho. No que se refere ao baço, foi observado um menor número de células-tronco endoteliais nos Townes-SS tratados com HU frente aos não tratados. Tal aumento provavelmente está associado à desaceleração da hematopoese, uma vez que as células endoteliais são importantes produtoras de *Scf* e *Cxcl12* e aumentam em quantidade durante os momentos de hematopoese extramedular esplênica <sup>76</sup>. Adicionalmente, foi observado um maior número das CEnMSC no baço dos Townes-SS e Townes-AA após o tratamento com HU. Estas células são caracterizadas pelo imunofenótipo Ter119-/CD71-/CD45-/CD31-/Sca1-/CD150+ e foram descritas no trabalho de Schepers *et al.* (2013) como células comprometidas com a diferenciação em linhagens ósseas. Entretanto, a presença destas células no baço e as associações descritas entre elas e a hematopoese esplênica precisam ser melhor estudadas <sup>108</sup>.

Portanto, ainda que mais estudos sejam necessários para entender as alterações funcionais das células aqui descritas, as diversas semelhanças entre as alterações populacionais dos Townes-SS e humanos com AF possibilitam o uso dos camundongos Townes-SS, como ferramenta auxiliar, em estudos sobre: i) impactos de protocolos farmacológicos ou de terapia celular nas células hematopoéticas e não hematopoéticas do nicho hematopoético; ii) desenvolvimento de novos protocolos de mobilização e transplante; iii) refinamento dos protocolos de transplante haploidêntico visando reduzir a rejeição do enxerto e o GVHD agudo e crônico; iv) fatores associados a eficiência de transformação celular para terapia gênica; v) impactos dos novos protocolos de tratamento a longo prazo.

## **8) Conclusão**

A AF altera a celularidade das HSC, dos progenitores mielóides, dos progenitores eritropoéticos terminais, das células sanguíneas maduras e das células não hematopoéticas na MO, baço ou em ambos sítios hematopoéticos dos Townes-SS. Além do aumento dos progenitores eritroides terminais, existe uma alteração na diferenciação eritroide terminal que precisa ser melhor explorada. Os Townes-AA possuem eritropoese extramedular esplênica não associada à anemia. O tratamento com HU reduziu a esplenomegalia e o número de HSC, progenitores mielóides e progenitores eritroides terminais, além de corrigir a proporção entre

os eritroblastos ortocromáticos e policromáticos na MO dos Townes-AA. As MSC da MO apresentam um perfil transcricional que possivelmente reduz a quiescência das HSC com objetivo de atender a demanda por células sanguíneas. Por fim, o perfil de citocinas plasmáticas não revelou um perfil claro de alterações associadas à AF e sua progressão, entretanto, a análise de um número maior de animais poderia deixar mais evidente a resposta inflamatória sistêmica.

## Referências Bibliográficas

1. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J Biol Med.* 2001 May-Jun;74(3):179-84. PMID: 11501714; PMCID: PMC2588723.
2. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2010 Dec 11;376(9757):2018-31. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21131035.
3. Pauling L, Itano HA, et al. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science.* 1949 Nov 25;110(2865):543-8. doi: 10.1126/science.110.2865.543. PMID: 15395398.
4. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1997 Sep 11;337(11):762-9. doi: 10.1056/NEJM199709113371107. PMID: 9287233.
5. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, Vichinsky EP. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Mar 15;4:18010. doi: 10.1038/nrdp.2018.10. PMID: 29542687.
6. Perutz MF, Fermi G, Abraham DJ, Poyart C, Bursaux E. Hemoglobin as a receptor of drugs and peptides: x-ray studies of the stereochemistry of binding. *J. Am. Chem. Soc.* 1986; 108(5):1064-1078. DOI: 10.1021/ja00265a036.
7. Steinberg MH. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1998 Mar;11(1):163-84. doi: 10.1016/s0950-3536(98)80074-7. PMID: 10872477.
8. Vermynen C, Cornu G, Ferster A, Brichard B, Ninane J, Ferrant A, Zenebergh A, Maes P, Dhooge C, Benoit Y, Beguin Y, Dresse MF, Sariban E. Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Jul;22(1):1-6. doi: 10.1038/sj.bmt.1701291. PMID: 9678788.
9. Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, Labopin M, Volt F, Carreras J, Pinto Simões B, Ferster A, Dupont S, de la Fuente J, Dalle JH, Zecca M, Walters MC, Krishnamurti L, Bhatia M, Leung K, Yanik G, Kurtzberg J, Dhedin N, Kuentz M, Michel G, Apperley J, Lutz P, Neven B, Bertrand Y, Vannier JP, Ayas M, Cavazzana M, Matthes-Martin S, Rocha V, Elayoubi H, Kenzey C, Bader P, Locatelli F, Ruggeri A, Eapen M; Eurocord, the Pediatric Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2017 Mar 16;129(11):1548-1556. doi: 10.1182/blood-2016-10-745711. Epub 2016 Dec 13. PMID: 27965196; PMCID: PMC5356458.
10. Alayash AI. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. *Blood Cells Mol Dis.* 2018 May;70:78-86. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.05.009. Epub 2017 May 20. PMID: 28554826; PMCID: PMC5696113.
11. Quinn CT, Smith EP, Arbabi S, Khera PK, Lindsell CJ, Niss O, Joiner CH, Franco RS, Cohen RM. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2016 Dec;91(12):1195-1201. doi: 10.1002/ajh.24562. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27648808; PMCID: PMC5118160.
12. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S83-6. PMID: 9413407.
13. Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *J Lab Clin Med.* 2004 Nov;144(5):260-7; discussion 227-8. doi: 10.1016/j.lab.2004.08.004. PMID: 15570244.
14. Kaul DK, Tsai HM, Liu XD, Nakada MT, Nagel RL, Collier BS. Monoclonal antibodies to alphaVbeta3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. *Blood.* 2000 Jan 15;95(2):368-74. PMID: 10627437.
15. Setty BN, Stuart MJ. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood.* 1996 Sep 15;88(6):2311-20. PMID: 8822953.
16. Hines PC, Zen Q, Burney SN, Shea DA, Ataga KI, Orringer EP, Telen MJ, Parise LV. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. *Blood.* 2003 Apr 15;101(8):3281-7. doi: 10.1182/blood-2001-12-0289. Epub 2002 Dec 27. PMID: 12506027.
17. Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Hebbel RP. Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood.* 1992 Nov 15;80(10):2634-42. PMID: 1384794.
18. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol.* 2014 May 27;5:115. doi: 10.3389/fphar.2014.00115. PMID: 24904418; PMCID: PMC4035012.
19. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood.* 2016 Feb 18;127(7):801-9. doi: 10.1182/blood-2015-09-618538. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26758915; PMCID: PMC4760086.

20. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, Sohler C, Hinderliter A, Parise LV, Orringer EP. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica*. 2008 Jan;93(1):20-6. doi: 10.3324/haematol.11763. PMID: 18166781.
21. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J 6th, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM Jr, Gladwin MT. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2279-85. doi: 10.1182/blood-2005-06-2373. Epub 2005 Nov 15. PMID: 16291595; PMCID: PMC1895723.
22. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2004 Feb 26;350(9):886-95. doi: 10.1056/NEJMoa035477. PMID: 14985486.
23. Kato GJ, Hsieh M, Machado R, Taylor J 6th, Little J, Butman JA, Lehky T, Tisdale J, Gladwin MT. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. *Am J Hematol*. 2006 Jul;81(7):503-10. doi: 10.1002/ajh.20642. PMID: 16755569; PMCID: PMC2206539.
24. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2005 May;129(4):465-81. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05411.x. PMID: 15877729.
25. Kassim AA, DeBaun MR. The case for and against initiating either hydroxyurea therapy, blood transfusion therapy or hematopoietic stem cell transplant in asymptomatic children with sickle cell disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2014 Feb;15(3):325-36. doi: 10.1517/14656566.2014.868435. Epub 2014 Jan 7. PMID: 24392871.
26. Chakravorty S, Williams TN. Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. *Arch Dis Child*. 2015 Jan;100(1):48-53. doi: 10.1136/archdischild-2013-303773. Epub 2014 Sep 19. PMID: 25239949; PMCID: PMC4285890.
27. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017 Apr 20;376(16):1561-1573. doi: 10.1056/NEJMra1510865. PMID: 28423290.
28. Gardner K, Douiri A, Drasar E, Allman M, Mwirigi A, Awogbade M, Thein SL. Survival in adults with sickle cell disease in a high-income setting. *Blood*. 2016 Sep 8;128(10):1436-8. doi: 10.1182/blood-2016-05-716910. Epub 2016 Jul 20. PMID: 27439910.
29. Grosse SD, Odame I, Atrash HK, Amendah DD, Piel FB, Williams TN. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. *Am J Prev Med*. 2011 Dec;41(6 Suppl 4):S398-405. doi: 10.1016/j.amepre.2011.09.013. PMID: 22099364; PMCID: PMC3708126.
30. Hyacinth HI, Adams RJ, Voeks JH, Hibbert JM, Gee BE. Frequent red cell transfusions reduced vascular endothelial activation and thrombogenicity in children with sickle cell anemia and high stroke risk. *Am J Hematol*. 2014 Jan;89(1):47-51. doi: 10.1002/ajh.23586. Epub 2013 Nov 28. PMID: 23996496; PMCID: PMC4070426.
31. Walters MC, De Castro LM, Sullivan KM, Krishnamurti L, Kamani N, Bredeson C, Neuberger D, Hassell KL, Farnia S, Campbell A, Petersdorf E. Indications and Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb;22(2):207-211. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.10.017. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26500093; PMCID: PMC5031360.
32. Gluckman E. Allogeneic transplantation strategies including haploidentical transplantation in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:370-6. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.370. PMID: 24319206.
33. Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, Caccavelli L, Neven B, Bourget P, El Nemer W, Bartolucci P, Weber L, Puy H, Meritet JF, Grevent D, Beuzard Y, Chrétien S, Lefebvre T, Ross RW, Negre O, Veres G, Sandler L, Soni S, de Montalembert M, Blanche S, Leboulch P, Cavazzana M. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017 Mar 2;376(9):848-855. doi: 10.1056/NEJMoa1609677. PMID: 28249145.
34. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, Shao Z, Canver MC, Smith EC, Pinello L, Sabo PJ, Vierstra J, Voit RA, Yuan GC, Porteus MH, Stamatoyannopoulos JA, Lettre G, Orkin SH. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science*. 2013 Oct 11;342(6155):253-7. doi: 10.1126/science.1242088. PMID: 24115442; PMCID: PMC4018826.
35. Mettananda S, Fisher CA, Hay D, Badat M, Quek L, Clark K, Hublitz P, Downes D, Kerry J, Gosden M, Telenius J, Sloane-Stanley JA, Faustino P, Coelho A, Doondea J, Usukhbayar B, Sopp P, Sharpe JA, Hughes JR, Vyas P, Gibbons RJ, Higgs DR. Editing an  $\alpha$ -globin enhancer in primary human hematopoietic stem cells as a treatment for  $\beta$ -thalassemia. *Nat Commun*. 2017 Sep 4;8(1):424. doi: 10.1038/s41467-017-00479-7. PMID: 28871148; PMCID: PMC5583283.
36. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, Pavel-Dinu M, Saxena N, Wilkens AB, Mantri S, Uchida N, Hendel A, Narla A, Majeti R, Weinberg KI, Porteus MH. CRISPR/Cas9  $\beta$ -globin



- gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016 Nov 17;539(7629):384-389. doi: 10.1038/nature20134. Epub 2016 Nov 7. PMID: 27820943; PMCID: PMC5898607.
37. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade PW. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*. 2006 Jun;24(6):801-12. doi: 10.1016/j.immuni.2006.04.008. PMID: 16782035; PMCID: PMC1626529.
  38. Schuettpehl LG, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation. *Front Immunol*. 2013 Jul 19;4:204. doi: 10.3389/fimmu.2013.00204. PMID: 23882270; PMCID: PMC3715736.
  39. Mirantes C, Passequé E, Pietras EM. Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Exp Cell Res*. 2014 Dec 10;329(2):248-54. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.017. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25149680; PMCID: PMC4250307.
  40. Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S, Loeffler D, Kovtonyuk LV, Zhang S, Lakshminarasimhan R, Chin CP, Techner JM, Will B, Nerlov C, Steidl U, Manz MG, Schroeder T, Passequé E. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol*. 2016 Jun;18(6):607-18. doi: 10.1038/ncb3346. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27111842; PMCID: PMC4884136.
  41. Grover A, Mancini E, Moore S, Mead AJ, Atkinson D, Rasmussen KD, O'Carroll D, Jacobsen SE, Nerlov C. Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate. *J Exp Med*. 2014 Feb 10;211(2):181-8. doi: 10.1084/jem.20131189. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24493804; PMCID: PMC3920567.
  42. Javazon EH, Radhi M, Gangadharan B, Perry J, Archer DR. Hematopoietic stem cell function in a murine model of sickle cell disease. *Anemia*. 2012;2012:387385. doi: 10.1155/2012/387385. Epub 2012 Jun 4. PMID: 22701784; PMCID: PMC3372279.
  43. Fabry ME, Suzuka SM, Weinberg RS, Lawrence C, Factor SM, Gilman JG, Costantini F, Nagel RL. Second generation knockout sickle mice: the effect of HbF. *Blood*. 2001 Jan 15;97(2):410-8. doi: 10.1182/blood.v97.2.410. PMID: 11154217.
  44. Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell*. 1987 Dec 24;51(6):975-85. doi: 10.1016/0092-8674(87)90584-8. PMID: 3690667.
  45. Greaves DR, Fraser P, Vidal MA, Hedges MJ, Ropers D, Luzzatto L, Grosveld F. A transgenic mouse model of sickle cell disorder. *Nature*. 1990 Jan 11;343(6254):183-5. doi: 10.1038/343183a0. PMID: 2296310.
  46. Ryan TM, Townes TM, Reilly MP, Asakura T, Palmiter RD, Brinster RL, Behringer RR. Human sickle hemoglobin in transgenic mice. *Science*. 1990 Feb 2;247(4942):566-8. doi: 10.1126/science.2154033. PMID: 2154033.
  47. Trudel M, Saadane N, Garel MC, Bardakdjian-Michau J, Blouquit Y, Guerquin-Kern JL, Rouyer-Fessard P, Vidaud D, Pachnis A, Roméo PH, et al. Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD. *EMBO J*. 1991 Nov;10(11):3157-65. PMID: 1915288; PMCID: PMC453038.
  48. Pászty C, Brion CM, Mancini E, Witkowska HE, Stevens ME, Mohandas N, Rubin EM. Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science*. 1997 Oct 31;278(5339):876-8. doi: 10.1126/science.278.5339.876. PMID: 9346488.
  49. Ryan TM, Ciavatta DJ, Townes TM. Knockout-transgenic mouse model of sickle cell disease. *Science*. 1997 Oct 31;278(5339):873-6. doi: 10.1126/science.278.5339.873. PMID: 9346487.
  50. Wu LC, Sun CW, Ryan TM, Pawlik KM, Ren J, Townes TM. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1183-8. doi: 10.1182/blood-2006-02-004812. Epub 2006 Apr 25. PMID: 16638928; PMCID: PMC1895869.
  51. Olson OC, Kang YA, Passequé E. Normal Hematopoiesis Is a Balancing Act of Self-Renewal and Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020 Dec 1;10(12):a035519. doi: 10.1101/cshperspect.a035519. PMID: 31988205; PMCID: PMC7706583.
  52. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):242-5. doi: 10.1126/science.273.5272.242. PMID: 8662508.
  53. Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, Alizadeh AA. Association of a Leukemic Stem Cell Gene Expression Signature With Clinical Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA*. 2010;304(24):2706-2715. doi:10.1001/jama.2010.1862.
  54. Cabezas-Wallscheid N, Klimmeck D, Hansson J, Lipka DB, Reyes A, Wang Q, Weichenhan D, Lier A, von Paleske L, Renders S, Wünsche P, Zeisberger P, Brocks D, Gu L, Herrmann C, Haas S, Essers MAG, Brors B, Eils R, Huber W, Milsom MD, Plass C, Krijgsveld J, Trumpp A. Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. *Cell Stem Cell*. 2014 Oct 2;15(4):507-522. doi: 10.1016/j.stem.2014.07.005. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25158935.

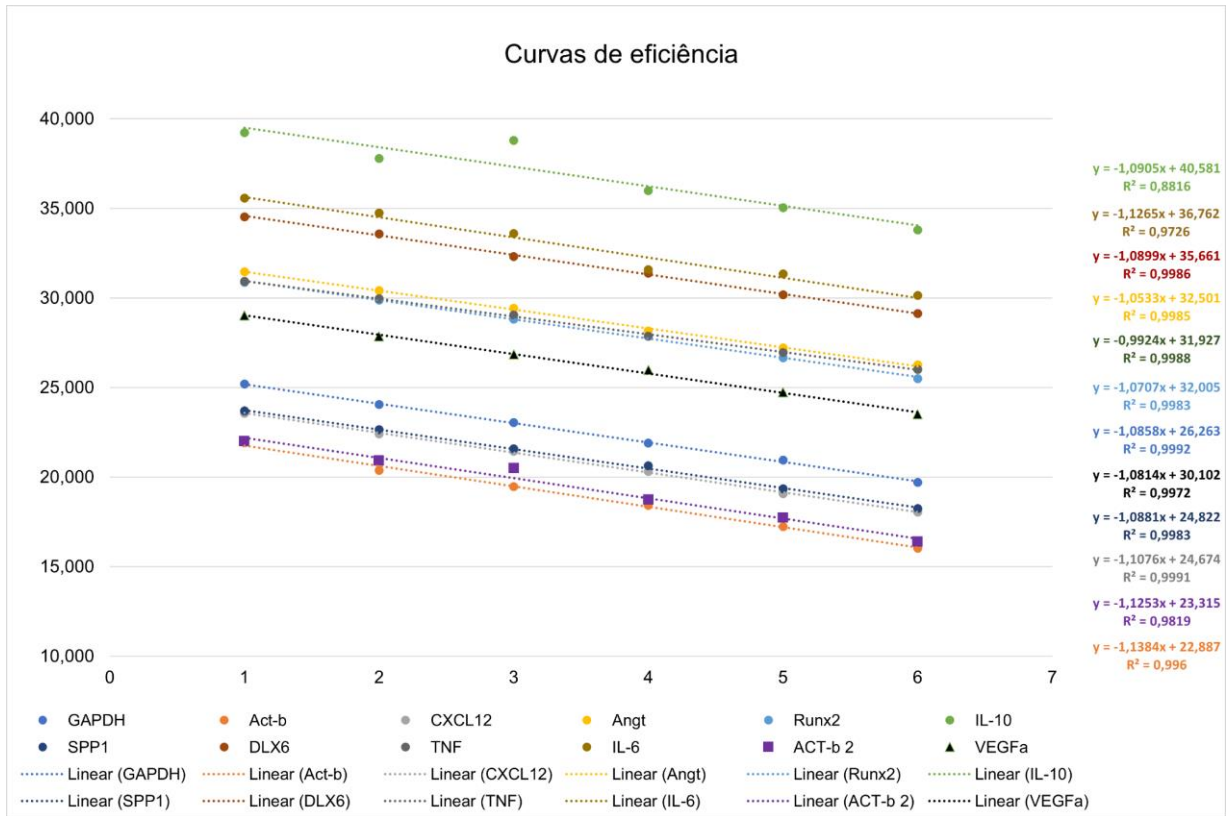
55. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008 Dec 12;135(6):1118-29. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.048. Erratum in: *Cell*. 2009 Jul 10;138(1):209. PMID: 19062086.
56. Flach J, Bakker ST, Mohrin M, Conroy PC, Pietras EM, Reynaud D, Alvarez S, Diolaiti ME, Ugarte F, Forsberg EC, Le Beau MM, Stohr BA, Méndez J, Morrison CG, Passegué E. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014 Aug 14;512(7513):198-202. doi: 10.1038/nature13619. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25079315; PMCID: PMC4456040.
57. Liu J, Zhang J, Ginzburg Y, Li H, Xue F, De Franceschi L, Chasis JA, Mohandas N, An X. Quantitative analysis of murine terminal erythroid differentiation in vivo: novel method to study normal and disordered erythropoiesis. *Blood*. 2013 Feb 21;121(8):e43-9. doi: 10.1182/blood-2012-09-456079. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23287863; PMCID: PMC3578961.
58. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*. 1976 Sep;58(3):705-15. doi: 10.1172/JCI108517. PMID: 956397; PMCID: PMC333229.
59. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012 Feb 3;10(2):120-36. doi: 10.1016/j.stem.2012.01.006. PMID: 22305562.
60. Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell*. 2010 Mar 5;6(3):265-78. doi: 10.1016/j.stem.2010.02.002. PMID: 20207229; PMCID: PMC2837284.
61. Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. *Cell*. 1986 Feb 28;44(4):653-62. doi: 10.1016/0092-8674(86)90274-6. PMID: 2868799.
62. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2017 Sep;17(9):573-590. doi: 10.1038/nri.2017.53. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28604734.
63. Wei Q, Frenette PS. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity*. 2018 Apr 17;48(4):632-648. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.024. PMID: 29669248; PMCID: PMC6103525.
64. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:285-316. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095919. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23298209.
65. Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med*. 2005;56:509-38. doi: 10.1146/annurev.med.54.101601.152334. PMID: 15660525.
66. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010 Aug 12;466(7308):829-34. doi: 10.1038/nature09262. PMID: 20703299; PMCID: PMC3146551.
67. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):387-99. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.017. PMID: 20850355.
68. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 2011 Nov 23;147(5):1146-58. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.053. PMID: 22118468.
69. Monteiro JP, Benjamin A, Costa ES, Barcinski MA, Bonomo A. Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1484-91. doi: 10.1182/blood-2004-07-2856. Epub 2004 Oct 28. PMID: 15514013.
70. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, Kunisaki Y, Zhang D, van Rooijen N, Silberstein LE, Weber C, Nagasawa T, Frenette PS, Castrillo A, Hidalgo A. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013 May 23;153(5):1025-35. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.040. PMID: 23706740; PMCID: PMC4128329.
71. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, Scheiermann C, Schiff L, Poncz M, Bergman A, Frenette PS. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*. 2014 Nov;20(11):1315-20. doi: 10.1038/nm.3707. Epub 2014 Oct 19. PMID: 25326802; PMCID: PMC4258871.
72. Selicean SE, Tomuleasa C, Grewal R, Almeida-Porada G, Berindan-Neagoe I. Mesenchymal stem cells in myeloproliferative disorders - focus on primary myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*. 2019 Apr;60(4):876-885. doi: 10.1080/10428194.2018.1516881. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30277128.
73. Freedman MH, Saunders EF. Hematopoiesis in the human spleen. *Am J Hematol*. 1981 Nov;11(3):271-5. doi: 10.1002/ajh.2830110307. PMID: 7053225.

74. Lowell CA, Niwa M, Soriano P, Varmus HE. Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis. *Blood*. 1996 Mar 1;87(5):1780-92. PMID: 8634424.
75. Johns JL, Christopher MM. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. *Vet Pathol*. 2012 May;49(3):508-23. doi: 10.1177/0300985811432344. Epub 2012 Jan 18. PMID: 22262354.
76. Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, Morrison SJ. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature*. 2015 Nov 26;527(7579):466-471. doi: 10.1038/nature15530. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26570997; PMCID: PMC4838203.
77. Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol*. 2011 Mar;39(3):351-359.e3. doi: 10.1016/j.exphem.2010.12.008. Epub 2010 Dec 24. PMID: 21185906.
78. Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med*. 2014 Aug;20(8):833-46. doi: 10.1038/nm.3647. PMID: 25100529; PMCID: PMC4459580.
79. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 May;20(5):303-320. doi: 10.1038/s41580-019-0103-9. PMID: 30745579; PMCID: PMC6483843.
80. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x. PMID: 5523063.
81. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50. doi: 10.1002/jor.1100090504. PMID: 1870029.
82. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905. PMID: 16923606.
83. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Oct-Dec;20(5-6):419-27. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002. Epub 2009 Nov 18. PMID: 19926330.
84. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974 Apr;17(4):331-40. doi: 10.1097/00007890-197404000-00001. PMID: 4150881.
85. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006 Dec;25(6):977-88. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016. PMID: 17174120.
86. Hamzic E, Whiting K, Gordon Smith E, Pettengell R. Characterization of bone marrow mesenchymal stromal cells in aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2015 Jun;169(6):804-13. doi: 10.1111/bjh.13364. Epub 2015 Mar 29. PMID: 25819548.
87. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C, Villaron EM, Hernández-Campo P, Lopez-Holgado N, Diez-Campelo M, Barbado MV, Perez-Simon JA, Hernández-Rivas JM, San-Miguel JF, del Cañizo MC. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia*. 2009 Apr;23(4):664-72. doi: 10.1038/leu.2008.361. Epub 2009 Jan 8. PMID: 19151777.
88. Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, Fröbel J, Brückner B, Kündgen A, Fenk R, Bruns I, Zilkens C, Hermsen D, Gattermann N, Kobbe G, Germing U, Lyko F, Haas R, Schroeder T. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1841-51. doi: 10.1038/leu.2013.193. Epub 2013 Mar 29. PMID: 23797473.
89. Pleyer L, Valent P, Greil R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Normal and Dysplastic Hematopoiesis-Masters of Survival and Clonality? *Int J Mol Sci*. 2016 Jun 27;17(7):1009. doi: 10.3390/ijms17071009. PMID: 27355944; PMCID: PMC4964385.
90. Li Y, Chen S, Yuan J, Yang Y, Li J, Ma J, Wu X, Freund M, Pollok K, Hanenberg H, Goebel WS, Yang FC. Mesenchymal stem/progenitor cells promote the reconstitution of exogenous hematopoietic stem cells in Fancg<sup>-/-</sup> mice in vivo. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2342-51. doi: 10.1182/blood-2008-07-168138. Epub 2009 Jan 7. PMID: 19129541; PMCID: PMC2742339.
91. Liu GH, Suzuki K, Li M, Qu J, Montserrat N, Tarantino C, Gu Y, Yi F, Xu X, Zhang W, Ruiz S, Plongthongkum N, Zhang K, Masuda S, Nivet E, Tsunekawa Y, Soligalla RD, Goebel A, Aizawa E, Kim NY, Kim J, Dubova I, Li Y, Ren R, Benner C, Del Sol A, Bueren J, Trujillo JP, Surrallés J, Cappelli E, Dufour C, Esteban CR, Belmonte JCI. Modelling Fanconi anemia pathogenesis and therapeutics using integration-free patient-derived iPSCs. *Nat Commun*. 2014 Jul 7;5:4330. doi: 10.1038/ncomms5330. PMID: 24999918; PMCID: PMC4291073.

92. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013 Aug;3(3):71-85. PMID: 25558171; PMCID: PMC4280562.
93. Mancini EA, Hillery CA, Bodian CA, Zhang ZG, Luty GA, Coller BS. Pathology of Berkeley sickle cell mice: similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1651-8. doi: 10.1182/blood-2005-07-2839. Epub 2005 Sep 15. PMID: 16166585; PMCID: PMC1895417.
94. Rogers DW, Vaidya S, Serjeant GR. Early splenomegaly in homozygous sickle-cell disease: An indicator of susceptibility to infection. *Lancet*. 1978 Nov 4;2(8097):963-5. doi: 10.1016/s0140-6736(78)92527-8. PMID: 81988.
95. Glader BE, Propper RD, Buchanan GR. Microcytosis associated with sickle cell anemia. *Am J Clin Pathol*. 1979 Jul;72(1):63-4. doi: 10.1093/ajcp/72.1.63. PMID: 453112.
96. Kumar A, Eckman JR, Swerlick RA, Wick TM. Phorbol ester stimulation increases sickle erythrocyte adherence to endothelium: a novel pathway involving alpha 4 beta 1 integrin receptors on sickle reticulocytes and fibronectin. *Blood*. 1996 Dec 1;88(11):4348-58. PMID: 8943872.
97. Swerlick RA, Eckman JR, Kumar A, Jeitler TM, Wick TM. Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. *Blood*. 1993;82(6):1891-99. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V82.6.1891.1891.
98. Brittain HA, Eckman JR, Swerlick RA, Howard RJ, Wick TM. Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. *Blood*. 1993 Apr 15;81(8):2137-43. PMID: 8471771.
99. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, Chui DH, Steinberg MH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 2011 Jul 7;118(1):19-27. doi: 10.1182/blood-2011-03-325258. Epub 2011 Apr 13. PMID: 21490337; PMCID: PMC3139383.
100. Meiler SE, Wade M, Kutlar F, Yerigenahally SD, Xue Y, Moutouh-de Parseval LA, Corral LG, Swerdlow PS, Kutlar A. Pomalidomide augments fetal hemoglobin production without the myelosuppressive effects of hydroxyurea in transgenic sickle cell mice. *Blood*. 2011 Jul 28;118(4):1109-12. doi: 10.1182/blood-2010-11-319137. Epub 2011 May 2. PMID: 21536862; PMCID: PMC3148160.
101. Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2006 Apr;12(4):446-51. doi: 10.1038/nm1388. Epub 2006 Mar 26. Erratum in: *Nat Med*. 2010 Jan;16(1):129. PMID: 16565722.
102. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol*. 2007 Mar;78(3):183-205. doi: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17253966.
103. Gbotosho OT, Kapetanaki MG, Ross M, Ghosh S, Weidert F, Bullock GC, Watkins S, Ofori-Acquah SF, Kato GJ. Nrf2 deficiency in mice attenuates erythropoietic stress-related macrophage hypercellularity. *Exp Hematol*. 2020 Apr ;84:19-28.e4. doi: 10.1016/j.exphem.2020.02.005. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32151553; PMCID: PMC7237317.
104. El Hoss S, Cochet S, Godard A, Yan H, Dussiot M, Frati G, Boutonnat-Faucher B, Laurance S, Renaud O, Joseph L, Miccio A, Brousse V, Mohandas N, El Nemer W. Fetal hemoglobin rescues ineffective erythropoiesis in sickle cell disease. *Haematologica*. 2020 Aug 27. doi: 10.3324/haematol.2020.265462. Epub ahead of print. PMID: 32855279.
105. Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci*. 2004 Nov 1;117(Pt 23):5655-64. doi: 10.1242/jcs.01488. Epub 2004 Oct 19. PMID: 15494370.
106. Stenger EO, Chinnadurai R, Yuan S, Garcia M, Arafat D, Gibson G, Krishnamurti L, Galipeau J. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Sickle Cell Disease Display Intact Functionality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 May;23(5):736-745. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.01.081. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28132869; PMCID: PMC5390328.
107. Ramos TL, Sánchez-Abarca LI, Rosón-Burgo B, Redondo A, Rico A, Preciado S, Ortega R, Rodríguez C, Muntión S, Hernández-Hernández Á, De Las Rivas J, González M, González Porras JR, Del Cañizo C, Sánchez-Guijo F. Mesenchymal stromal cells (MSC) from JAK2+ myeloproliferative neoplasms differ from normal MSC and contribute to the maintenance of neoplastic hematopoiesis. *PLoS One*. 2017 Aug 10;12(8):e0182470. doi: 10.1371/journal.pone.0182470. PMID: 28796790; PMCID: PMC5552029.
108. Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, Flach J, Binnewies M, Garg T, Wagers AJ, Hsiao EC, Passegué E. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*. 2013 Sep 5;13(3):285-99. doi: 10.1016/j.stem.2013.06.009. Epub 2013 Jul 11. PMID: 23850243; PMCID: PMC3769504.

109. Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *American Journal of Hematology*. 2004 Dec;77(4):323-328. <https://doi.org/10.1002/ajh.20196>.
110. Hibbert JM, Hsu LL, Bhatena SJ, Irune I, Sarfo B, Creary MS, Gee BE, Mohamed AI, Buchanan ID, Al-Mahmoud A, Stiles JK. Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 Jan;230(1):68-74. doi: 10.1177/153537020523000109. PMID: 15618128; PMCID: PMC4033607.
111. Veiga PC, Schroth RJ, Guedes R, Freire SM, Nogueira-Filho G. Serum cytokine profile among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. *Arch Oral Biol*. 2013 May;58(5):505-10. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.11.006. Epub 2012 Dec 6. PMID: 23219179.
112. Pitanga, T, Vilas-Boas, W, Cerqueira, B, Seixas, M, Barbosa, C, Adorno, E, Goncalves M. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013 Jul;4(7A):6-12. doi: 10.4236/abb.2013.47A1002.
113. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNF $\alpha$  levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine*. 2015 Mar;72(1):43-7. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.030. Epub 2015 Jan 5. PMID: 25569375.
114. Rodrigues L, Costa FF, Saad ST, Grotto HZ. High levels of neopterin and interleukin-3 in sickle cell disease patients. *J Clin Lab Anal*. 2006;20(3):75-9. doi: 10.1002/jcla.20104. PMID: 16721831; PMCID: PMC6807391.
115. Flavia Rubia Pallis, Nicola Conran, Kleber Yotsumoto Fertrin, Sara T. Olalla-Saad, Fernando Ferreira Costa, Carla Fernanda Franco-Penteado; Altered Functional Properties of Eosinophils In Sickle Cell Anemia and Effects of Hydroxyurea Therapy. *Blood* 2010; 116 (21): 2656. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V116.21.2656.2656>.
116. Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012 Mar-Apr;18(2):195-200. doi: 10.1177/1076029611420992. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21949038.
117. McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opin Drug Saf*. 2015;14(11):1749-58. doi: 10.1517/14740338.2015.1088827. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26366626; PMCID: PMC5868345.
118. Seda S, Tolu, Kai Wang, Zi Yan, Andrew Crouch, Gracy Sebastian, Mark Chaitowitz, Eric Fornari, Evan Schwechter, Joan Uehlinger, Deepa Manwani, Caterina P. Minniti, Eric E. Bouhassira; Long-Term Hydroxyurea Use Is Associated with Lower Levels of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Patients with Sickle Cell Disease. *Blood* 2019; 134 (Supplement\_1): 985. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2019-131648>.
119. Uchida N, Fujita A, Hsieh MM, Bonifacino AC, Krouse AE, Metzger ME, Donahue RE, Tisdale JF. Bone Marrow as a Hematopoietic Stem Cell Source for Gene Therapy in Sickle Cell Disease: Evidence from Rhesus and SCD Patients. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2017 Sep;28(3):136-144. doi: 10.1089/humc.2017.029. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28447889; PMCID: PMC5695729.
120. Tolu SS, Wang K, Yan Z, Zhang S, Roberts K, Crouch AS, Sebastian G, Chaitowitz M, Fornari ED, Schwechter EM, Uehlinger J, Manwani D, Minniti CP, Bouhassira EE. Characterization of Hematopoiesis in Sickle Cell Disease by Prospective Isolation of Stem and Progenitor Cells. *Cells*. 2020 Sep 24;9(10):2159. doi: 10.3390/cells9102159. PMID: 32987729; PMCID: PMC7598721.
121. Lebensburger JD, Howard T, Hu Y, Pestina TI, Gao G, Johnson M, Zakharenko SS, Ware RE, Tuomanen EI, Persons DA, Rosch JW. Hydroxyurea therapy of a murine model of sickle cell anemia inhibits the progression of pneumococcal disease by down-modulating E-selectin. *Blood*. 2012 Feb 23;119(8):1915-21. doi: 10.1182/blood-2011-08-374447. Epub 2011 Nov 30. PMID: 22130804; PMCID: PMC3293645.

## Apêndice 1. Análise da eficiência das sondas TaqMan.



Cálculo da eficiência:

Sonda	Slope	Eficiência $((2^{-(1/slope)}-1)*100)$
GAPDH	-1,086	<b>89,34 %</b>
Act-b	-1,125	<b>85,14 %</b>
CXCL12	-1,107	<b>87,00 %</b>
Angt	-1,053	<b>93,11 %</b>
Runx2	-1,071	<b>91,05 %</b>
IL-10	-1,091	<b>88,81 %</b>
SPP1	-1,088	<b>89,08 %</b>
DLX6	-1,090	<b>88,89 %</b>
TNF	-0,992	<b>101,06 %</b>
IL-6	-1,127	<b>85,02 %</b>
VEGFa	-1,081	<b>89,83 %</b>