

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação imunofenotípica dos precursores eritróides em
Neoplasias Mieloproliferativas

Gabriel Dessotti Barretto

Ribeirão Preto
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação imunofenotípica dos precursores eritróides em Neoplasias
Mieloproliferativas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientado: Gabriel Dessotti Barretto

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 18/08/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

BARRETO, G.D.	<i>Avaliação imunofenotípica dos precursores eritróides em Neoplasias Mieloproliferativas</i>		MESTRADO FCFRP - USP 2022
------------------	---	--	---------------------------------

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.

Barretto, Gabriel Dessotti

Avaliação imunofenotípica dos precursores eritroides em Neoplasias Mieloproliferativas. Ribeirão Preto, 2022.

p. 118 : il.; 30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Castro, Fabíola Attié de

1. Imunofenotipagem. 2. Diferenciação Terminal Eritróide. 3. Mutação JAK2V617F. 4. Neoplasias Mieloproliferativas. 5. *Sorting* Celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriel Dessotti Barretto

Avaliação imunofenotípica dos precursores eritróides em Neoplasias Mieloproliferativas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro
Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, à minha irmã, à minha tia e aos meus avós, por terem me proporcionado amor, compreensão, motivação e suporte. Dedico a todos vocês que sempre me acolheram e acreditaram em mim.

Agradecimentos

Agradeço à Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani e ao seu grupo de pesquisa pela oportunidade de ingressar no mundo acadêmico por meio das iniciações científicas que me foram concedidas, pela confiança que me foi depositada e por toda experiência histológica e molecular que pude ter nos anos em que trabalhamos juntos.

Agradeço à Profa. Dra. Fabiola Attié de Castro pela grande oportunidade de trabalho e de evolução acadêmica, nestes anos ao seu lado. Desde o início sempre foi solícita, atenciosa, cuidadosa, carinhosa e humana. Foram anos de grande evolução, não apenas acadêmica, como também pessoal. Sua calma e tolerância ajudaram a facilitar as mudanças pelas quais passei. Agradeço-lhe pela confiança que depositou em mim, a amizade que criamos e aguardo as parcerias que ainda estão por vir.

Agradeço à Patricia Vianna Bonini Palma por me acompanhar nesta jornada acadêmica e me apresentar o fascinante mundo da citometria de fluxo. Agradeço por todas as horas de dedicação na realização dos *sortings* deste trabalho, as imunofenotipagens, os ajustes de protocolo, pela paciência e calma que sempre teve comigo. O que sei de citometria de fluxo aprendi com a Patricia. Sua paixão pelo que faz me fascina, me motiva e eu me espelho nela. A convivência com a Patricia foi uma escola, não só acadêmica, mas também de vida.

Agradeço à Camila Bonaldo e Rita Figueiredo pelo suporte técnico, pelos ensinamentos de citometria de fluxo, pelas conversas, cafés e risadas que sempre se fizeram presentes.

Agradeço à Luciana Ambrósio e ao Luiz Chaim, não apenas pelo suporte técnico que proporcionaram, mas também pelo acolhimento desde minha graduação. Se posso dizer que guardo amigos daquela época, guardo vocês. Muito obrigado pelas conversas, cafés, comidas, saídas, pelo carinho e por tornarem essa jornada mais animada e leve.

Agradeço à equipe do laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP, em especial à Profa. Dra. Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes, que proporcionou a coleta das amostras de medula óssea para o presente trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Simone Kashima Haddad e sua equipe de laboratório, em especial Jonathan Milhomens, que proporcionaram apoio científico, metodológico e auxiliaram no desenvolvimento do presente trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Maira, Juçara, Illy, Giovana, em especial Felipe Campos de Almeida, pelo apoio aos experimentos, pelas conversas, almoços no Walter e discussões sentimentais.

Vitor Leonardo Bassan, o agradecimento que lhe cabe tomaria esta folha e as próximas. Mas de forma sucinta quero lhe dizer que você foi fundamental nesta caminhada acadêmica e no curso deste trabalho. Além daqui te conservo como um amigo para a vida. Não é sempre que conhecemos alguém em um dia e no dia seguinte vamos juntos a uma manifestação! Não se esqueça também que abri a porta do laboratório para você, pois ainda não tinha as chaves. Tomamos vários cafés na cantina, discutíamos da vida, saíamos todas as quintas-feiras, praticávamos o “ocultismo” para tentar entender se as análises de bioinformática dariam certo. É, eu me lembro como se fosse ontem, tudo era novo para nós dois, mas juntos fomos subindo os degraus acadêmicos e da vida, enfrentamos a pandemia, criamos uma área limpa e suja dentro do apartamento, praticamos a biossegurança tal qual nos foi ensinada, não pegamos COVID-19 até hoje. Sobrevivemos às adversidades, mas não passamos ilesos por ela, o fato é que fizemos isso juntos. Alguns foram, outros apareceram, mas você ficou e eu lhe agradeço por todo o suporte psicológico, emocional e sentimental dedicados a mim. Muito obrigado por ser o amigo que todo mundo deveria ter. Você é essencial.

Agradeço aos meus pais, minha irmã, minha tia e minha avó, Margarete, Carmo, Daniela, Monica e Therezinha, pelo cuidado e amor que sempre dedicaram a mim sem esperar nada em troca, por acreditarem nos meus sonhos, por me incentivarem a trilhar minha estrada da forma como eu queria, por todo o suporte educacional e financeiro, por todos os conselhos que me foram dados, por todas as oportunidades, por toda a confiança que vocês depositaram em mim. Meu muito obrigado a vocês que foram e são fundamentais na minha vida e na minha história e responsáveis pelas minhas conquistas.

Por fim, agradeço às agências de fomento pelo investimento financeiro confiado ao presente trabalho e ao grupo de pesquisa. O presente trabalho contou com recursos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001, CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – 2018/19714-7 e Centro de Terapia Celular (CTC) – 2013/08135-2.

Epígrafe

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza.”

Marie Curie

RESUMO

BARRETTO, G.D. **Avaliação imunofenotípica de precursores eritróides em Neoplasias Mieloproliferativas.** 2022. 118f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) são desordens hematológicas clonais caracterizadas pela proliferação exacerbada de células precursoras e maduras pertencentes à linhagem mieloide. Nestas doenças, a elevada proliferação e resistência à morte celular promove o acúmulo de células mieloides na medula óssea e no sangue periférico, alta viscosidade sanguínea e risco aumentado para a ocorrência de alterações cardiovasculares. A fisiopatologia das NMP está associada à presença de mutações genéticas iniciadoras nos genes Janus Kinase 2 (*JAK2*), Calreticulina (*CARL*) e Receptor de trombopoetina (*MPL*), que estimulam a ativação constitutiva da via JAK2-STAT. Apesar dos conhecimentos sobre a fisiopatologia das NMP, os mecanismos celulares e moleculares associados ao aparecimento das mutações iniciadoras, fenótipo e à progressão da doença não foram totalmente elucidados. Além disso, permanece incógnita a maneira pela qual a ativação da via JAK-STAT é capaz de alterar o processo de eritropoese nas NMP. Sendo assim, o presente trabalho padronizou as técnicas de separação das subpopulações de precursores terminais eritróides, caracterizou o imunofenótipo e quantificou a frequência dos precursores eritróides terminais de pacientes com Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MF). Foram estudados 18 aspirados de medulas ósseas de pacientes com PV (n=5), TE (n=4), MF (n=3) e de controles (n=6). As amostras de medula óssea foram marcadas com os anticorpos anti-glicoforina A, anti-band 3, anti- α 4-integrina e anti-CD45, imunofenotipadas e os precursores eritróides isolados por meio de *sorting* celular para realização do *cytospin*. Foi estabelecido o protocolo de separação das subpopulações da diferenciação terminal eritróide e por meio dele foram obtidas as frequências das células eritróides terminais por citometria de fluxo. A pureza das subpopulações de progenitores eritróides foi avaliada por *cytospin*. Os resultados indicam que há alterações nas frequências de subpopulações de precursores terminais eritróides nas NMP. Foi observado aumento da subpopulação de pró-eritroblastos na PV e da subpopulação de eritroblastos ortocromáticos na TE. Na MF, não foi possível a quantificação dos precursores terminais eritróides. Estes achados sugerem a existência de alterações da dinâmica da eritropoese em pacientes com PV e TE.

Palavras-chave: Imunofenotipagem. Diferenciação Terminal Eritróide. Mutação JAK2V617F. Neoplasias Mieloproliferativas. *Sorting* Celular.

ABSTRACT

BARRETTO, G.D. **Immunophenotypic evaluation of erythroid precursors in Myeloproliferative Neoplasms**. 2022. 118p. Dissertation (Master) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Myeloproliferative Neoplasms (MPN) are clonal hematological disorders characterized by exacerbated proliferation of myeloid precursor and mature cells. The elevated cell proliferation and resistance to cell death promote the accumulation of myeloid cells in the bone marrow and peripheral blood, high blood viscosity and increased risk for cardiovascular disorders. The pathophysiology of MPN is associated with the presence of driver mutations in the Janus Kinase 2 (JAK2), Calreticulin (CARL) and Thrombopoietin Receptor (MPL) genes, which induce constitutive activation of the JAK2-STAT pathway. Despite all the knowledge about the MPN pathophysiology, the cellular and molecular mechanisms associated with the onset of driver mutations, disease phenotype and progression have not been fully elucidated. Furthermore, the relation between the JAK-STAT pathway deregulated activation and erythropoiesis alteration remains unclear. Therefore, the present study described methodologies able to separate the subpopulations of terminal erythroid precursors, to characterize their immunophenotype and quantify the frequency of terminal erythroid precursors in patients with Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (MF). Eighteen bone marrow aspirates from patients with PV (n=5), ET (n=4), MF (n=3) and controls (n=6) were studied. Bone marrow samples were labelled with anti-glycophorin A, anti-band 3, anti- α 4-integrin and anti-CD45 antibodies, immunophenotyped, the erythroid precursors were isolated by cell sorting and analyzed by cytospin. The protocol for separating the subpopulations of terminal erythroid differentiation was established and the frequencies of terminal erythroid cells were obtained by flow cytometry. The purity of erythroid progenitor subpopulations was assessed by cytospin. The results indicated that there are changes in the frequencies of subpopulations of erythroid terminal precursors in MPN. In PV, there is an increase of pro-erythroblast subpopulation and in ET the augmentation of the subpopulation of orthochromatic erythroblasts was observed. In MF, was not possible to quantify the erythroid terminal precursors. These findings suggest the existence of changes in erythropoiesis dynamics in patients with PV and ET.

Keywords: Immunophenotyping. Erythroid terminal differentiation. JAK2V617F mutation. Myeloproliferative neoplasms. Cell Sorting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mutações iniciadoras associadas à patogênese das neoplasias mieloproliferativas (NMP).....	6
Figura 2. Representação esquemática das etapas da eritropoese na medula óssea.....	10
Figura 3. Representação esquemática das etapas de mitoses que ocorrem durante a maturação dos progenitores eritróides terminais no organismo humano.....	11
Figura 4. Representação esquemática da ilha eritroblastica.....	12
Figura 5. Progenitores eritróides terminais da medula óssea.....	14
Figura 6. <i>Dot-plot</i> dos precursores eritróides terminais da medula óssea de indivíduo saudável.....	30
Figura 7. Morfologia dos precursores eritróides da medula óssea. Células da MO submetidas ao cytopspin e coradas com May-Grunwald-Giemsa.....	33
Figura 8. Histogramas do marcador de viabilidade 7AAD demonstrando a porcentagem de células mortas nos quatro testes de congelamentos realizados.....	37
Figura 9. Porcentagem de viabilidade celular nos quatro testes de congelamento que foram realizados.....	38
Figura 10. <i>Dot-plots</i> Anexina V por 7AAD demonstrando a porcentagem de células em processo de apoptose nos quatro testes de congelamento que foram realizados.....	39
Figura 11. Porcentagem de apoptose na população GPA positiva nos quatro testes de congelamento que foram realizados.....	40
Figura 12.- Histogramas do marcador de viabilidade 7AAD demonstrando a porcentagem de células mortas nos três testes de descongelamento realizados.....	41
Figura 13. Micrografia das subpopulações terminais eritróides nas diferentes velocidades e tempos empregadas na padronização do cytopspin.....	42
Figura 14. Micrografia das subpopulações terminais eritróides nas diferentes colorações que foram testadas.....	42
Figura 15. Relatório disponibilizado pelo <i>plugin</i> FlowAI, após a realização do controle de qualidade automático dos arquivos de citometria de fluxo.....	44
Figura 16. Estratégia de <i>gates</i> empregada para a análise imunofenotípica e quantificação da frequência das células progenitoras eritróides terminais nas medulas ósseas.....	46
Figura 17. Perfil imunofenotípico dos progenitores eritróides terminais de medula óssea de um controle, empregando os marcadores CD49d e Band3.....	47
Figura 18. Estratégia de <i>backgating</i> utilizada para identificar e localizar as células eritróides terminais nos <i>dot-plots</i>	48
Figura 19. <i>Heatmaps</i> da expressão dos marcadores da linhagem eritróide utilizados para realizar a imunofenotipagem e o <i>sorting</i> das populações de progenitores eritróides terminais.....	48
Figura 20. Exemplo de ajuste manual das <i>gates</i> para realização do <i>sorting</i> das populações de progenitores eritróides terminais das medulas ósseas.....	50

Figura 21. <i>Dot-plots</i> da análise dos parâmetros CD49d e Band3 com as <i>gates</i> utilizadas para realização do <i>sorting</i> celular e documentação das células eritróides por cytopspin.....	51
Figura 22. Avaliação da pureza das populações celulares de progenitores eritróides terminais por Imunofenotipagem.....	53
Figura 23. Porcentagem de pureza dos progenitores eritróides terminais, após as células serem sorteadas.....	53
Figura 24 Média da frequência dos progenitores terminais eritróides nas medulas ósseas controle.....	54
Figura 25. Estratégia de <i>gates</i> empregada para a análise imunofenotípica e quantificação da frequência das células progenitoras eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com NMP.....	56
Figura 26. Perfil imunofenotípico dos precursores eritróides terminais das medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose, segundo expressão dos marcadores CD49d por Band3.....	57
Figura 27. <i>Backgating</i> utilizada para identificar a localização das células eritróides nos <i>dot-plots</i> que são utilizados para a estratégia de <i>gate</i> dos pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose.....	58
Figura 28. <i>Heatmaps</i> da expressão dos marcadores da linhagem eritróide utilizados para delimitar as subpopulações por imunofenotipagem e auxiliar no <i>sorting</i> das populações de progenitores eritróides terminais das amostras de pacientes com Policitemia Vera.....	59
Figura 29. <i>Heatmaps</i> da expressão dos marcadores da linhagem eritróide utilizados para delimitar as subpopulações por imunofenotipagem e auxiliar no <i>sorting</i> das populações de progenitores eritróides terminais das amostras de pacientes com Trombocitemia Essencial.....	60
Figura 30. <i>Heatmaps</i> da expressão dos marcadores da linhagem eritróide utilizados para delimitar as subpopulações por imunofenotipagem e auxiliar no <i>sorting</i> das populações de progenitores eritróides terminais das amostras de pacientes com Mielofibrose.....	60
Figura 31. <i>Dot-plot</i> das células eritróides terminais conforme os parâmetros de expressão de α -4-Integrina (CD49d) e Band3 de pacientes com Policitemia Vera.....	62
Figura 32. Avaliação da pureza do <i>sorting</i> das subpopulações celulares de progenitores eritróides terminais por imunofenotipagem das medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera.....	63
Figura 33. Média da porcentagem de pureza dos progenitores eritróides terminais das amostras de medula óssea de pacientes com Policitemia Vera, após as células serem isoladas por“ <i>sorting</i> ”.....	63
Figura 34. <i>Dot-plot</i> das células eritróides terminais conforme os parâmetros de expressão de α -4-Integrina (CD49d) e Band3 de pacientes com Trombocitemia essencial.....	64
Figura 35. Avaliação da pureza do <i>sorting</i> das subpopulações celulares de progenitores eritróides terminais por imunofenotipagem das medulas ósseas de pacientes com Trombocitemia Essencial.....	65

Figura 36. Porcentagem de pureza dos progenitores eritróides terminais das amostras de medula óssea de pacientes com Trombocitemia Essencial.....	65
Figura 37. <i>Dot-plot</i> das células eritróides terminais conforme os parâmetros de expressão de α -4-Integrina (CD49d) e Band3 de pacientes com Mielofibrose.....	66
Figura 38. Frequência das subpopulações de progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera.....	67
Figura 39. Frequência das subpopulações de progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Trombocitemia Essencial.....	68
Figura 40. Exemplo de uso do <i>plugin</i> FlowSOM no <i>dot-plot</i> de α -4-Integrina (CD49d) e Band3, mostrando as subpopulações de progenitores eritróides terminais das medulas ósseas.....	69
Figura 41. Comparação entre as frequências das subpopulações de progenitores eritróides terminais das medulas ósseas controle com as medulas de pacientes com Policitemia Vera e Trombocitemia Essencial.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes e anticorpos utilizados nos testes de criopreservação celular.....	25
Tabela 2. Referências dos reagentes utilizados nos testes de descongelamento.....	27
Tabela 3. Referencia dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem de precursores eritróides terminais.....	28
Tabela 4. Frequência das subpopulações de precursores terminais eritróides oriundos da <i>gate</i> GPA+.....	30
Tabela 5. Corantes utilizados nos testes de coloração das lâminas do <i>cytopsin</i>	33
Tabela 6. Características demográficas dos controles.....	36
Tabela 7. Características demográficas e clínico-laboratoriais dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas <i>BCR-ABL1</i> negativos.....	36
Tabela 8. Frequência de subpopulações de progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas controle.....	54
Tabela 9. Frequência de subpopulações de precursores terminais eritróides nas medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera.....	67
Tabela 10. Frequência de subpopulações de precursores terminais eritróides nas medulas ósseas de pacientes com Trombocitemia Essencial.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD-A – Solução Anticoagulante de citrato e dextrose
BASO – Eritroblastos basofílicos
BCR-ABL – *Break Cluster Region-Abelson Virus*
BFU-E – Unidade formadora de *burst* eritróide
BMMC – *Bone Marrow Mononuclear Cells* ou Células Mononucleares da Medula Óssea
BSA – *Bovine Serum Albumin*, albumina do soro bovino
CALR – Calreticulina
CD – *Cluster of differentiation*
CFU-E – Unidade formadora de colônia eritróide
C-KIT – CD117 ou proto-oncogene c-Kit
CSF – Fator estimulador de colônia ou colony stimulating factor
DIPSS – Sistema de escore dinâmico internacional de pontuação prognóstica
DMSO – Dimetilsulfóxido
EPO – Eritropoetina
F – Feminino
FCFRP-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo
FE-EM – Fator estimulador de crescimento de eritrócitos e megacariócitos
FEG-GM – Fator estimulador de crescimento granulocítico e macrófágico
FSC-A – *Forward Scatter-A*
GC – Grupo Controle
GPA – Glicoforina A
HCFMRP-USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo
IL – Interleucina
IFN – Interferon
JAK – Janus Kinase
ND – Indeterminado/não determinado
NMP – Neoplasias Mieloproliferativas
LMA – Leucemia mieloide aguda
M – Masculino
MF – Mielofibrose
MFS – Mielofibrose secundária
MGG – May-Grunwald Giemsa
MO – Medula óssea
MM – Mieloma múltiplo
MPL – *Myeloproliferative Leukemia* (receptor da trombopoetina)
OMS – Organização mundial da saúde
ORTO – Eritroblastos ortocromáticos
PBS – *Phosphate buffered saline* ou tampão salina fosfato
PEM – Progenitor de Eritrócitos e megacariócitos
Ph – Cromossomo Filadélfia
PMC – Progenitor Mieloide Comum
PMP – Progenitor Mieloide Pluripotente
POLI – Eritroblastos policromáticos
PRO – Pró-eritroblastos
PV – Policitemia Vera

REPO – Receptor de Eritropoetina
RMPL – Receptor de Trombopoetina
SFI – Soro fetal bovino inativado
SSC-A – *Side Scatter-A*
STAT – ativadores de transdução de sinal
TE – Trombocitemia essencial
TET2 – Ten eleven translocation 2
TGF – Fator de crescimento tumoral
TNF – Fator de necrose tumoral
TPO – Trombopoetina
VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule 1*, CD106
VLA-4 – *Very late antigen 4*, CD49d

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Neoplasias Mieloproliferativas: características gerais e epidemiologia.....	2
1.2 Fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas.....	4
1.3 Tratamento das Neoplasias Mieloproliferativas.....	7
1.4 Eritropoese.....	9
1.5 Alterações da eritropoese em doenças hematológicas.....	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos gerais.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Casuística.....	22
3.2 Material e Métodos	22
3.2.1 Isolamento das células mononucleares da medula óssea (BMMC) por gradiente de Ficoll-Hypaque, criopreservação celular e descongelamento.....	22
3.2.1.1 Separação de células mononucleares pelo gradiente de Ficoll-Hypaque.....	22
3.2.1.2 Congelamento das medulas ósseas dos controles e de pacientes.....	23
3.2.1.3 Descongelamento das amostras de células mononucleares das medulas ósseas.....	25
3.3 Titulação dos anticorpos para marcação das medulas ósseas de pacientes e controles.....	27
3.4 Calibração do citômetro de fluxo.....	28
3.5 Caracterização imunofenotípica e isolamento dos precursores eritróides terminais.....	29
3.5.1 Caracterização imunofenotípica das subpopulações dos precursores eritróides terminais.....	29
3.5.2 Padronização do <i>sorting</i> celular e pureza das populações de precursores eritróides.....	31
3.6 Padronização do <i>cyto-spin</i> , coloração das lâminas e análise da morfologia das subpopulações eritróides isoladas por <i>sorting</i>	31
3.6.1 Padronização do <i>cyto-spin</i>	31
3.6.2 Padronização da coloração das células eritróides das lâminas geradas pelo <i>cyto-spin</i>	32
3.6.3 Análise da morfologia das subpopulações eritróide isoladas por <i>sorting</i>	33
3.7 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Caracterização dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas e controles.....	35
4.2 Isolamento das células mononucleares da medula óssea (BMMC) por gradiente de Ficoll-Hypaque.....	36
4.3 Criopreservação das células mononucleares da medula óssea (BMMC).....	37
4.4 Descongelamento das células mononucleares da medula óssea (BMMC).....	40
4.5 <i>Cyto-spin</i> e coloração das lâminas do <i>sorting</i> dos precursores terminais eritróides.....	41
4.6 Imunofenotipagem e <i>sorting</i> dos precursores eritróides terminais nas medulas ósseas	43
4.6.1 Controle de qualidade das amostras de citometria de fluxo.....	43
4.6.2 Normalização do número de eventos das amostras de citometria de fluxo.....	44
4.6.3 Estratégia de <i>gates</i> utilizada para obtenção do gradiente de diferenciação terminal dos precursores eritróides nas medulas ósseas controle.....	45
4.6.4 Perfil imunofenotípico dos marcadores CD49d e Band3 nas medulas ósseas dos controles....	47
4.6.5 Isolamento das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos controles...	49
4.6.6 Frequência dos progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas controle conforme expressão de CD49d e Band3.....	54

4.7	Estratégia de <i>gates</i> , imunofenotipagem e <i>sorting</i> dos precursores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com NMP.....	55
4.7.1	Controle de qualidade e normalização dos dados de citometria de fluxo dos precursores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes.....	55
4.7.2	Estratégia de <i>gates</i> utilizada para detecção dos precursores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes.....	55
4.7.3	Perfil imunofenotípico dos marcadores CD49d e Band3 nas medulas ósseas dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas.....	57
4.7.4	Isolamento das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas.....	61
4.7.4.1	Isolamento e pureza do <i>sorting</i> das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos pacientes com Policitemia Vera.....	61
4.7.4.2	Isolamento e pureza do <i>sorting</i> das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos pacientes com Trombocitemia Essencial.....	63
4.7.4.3	Isolamento das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos pacientes com Mielofibrose.....	66
4.7.5	Frequência dos progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas conforme expressão de CD49d e Band3.....	67
4.7.5.1	Frequência dos progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera.....	67
4.7.5.2	Frequência dos progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Trombocitemia Essencial.....	68
4.8	Análise <i>in silico</i> das subpopulações de precursores eritróides terminais nas medulas ósseas de doadores e de pacientes com NMP.....	69
4.9	Comparação das frequências de subpopulações de progenitores eritróides terminais entre controles e pacientes com Policitemia Vera (PV) e Trombocitemia Essencial (TE).....	70
5	DISCUSSÃO.....	72
5.1	Isolamento, congelamento e imunofenotipagem dos precursores eritróides terminais da medula óssea.....	73
5.2	Frequência e Imunofenótipo dos precursores eritróides terminais da medula óssea em Neoplasias Mieloproliferativas <i>BCR-ABL1</i> -negativas.....	77
6	CONCLUSÃO.....	84
7	REFERÊNCIAS.....	86
	Anexo A – Aprovação do Projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP.....	94
	Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Pacientes.....	95
	Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Controles.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias Mieloproliferativas: características gerais e epidemiologia

Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) são desordens hematológicas caracterizadas pela expansão clonal e proliferação exacerbada de células precursoras e maduras pertencentes à linhagem mieloide na ausência de estímulos. A elevada proliferação celular gera o acúmulo de células mieloides na medula óssea e no sangue periférico, alta viscosidade sanguínea e aumenta o risco de ocorrência de alterações cardiovasculares nos pacientes (1-5).

A classificação das NMP, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS 2016), inclui, neste grupo, as doenças Leucemia Mieloide Crônica (LMC), Leucemia Neutrófila Crônica (LNC), Policitemia vera (PV), Mielofibrose Primária (MF), Trombocitemia Essencial (TE), NMP não classificável, Mastocitose e Leucemia Eosinofílica Crônica (LEC) (6,7). A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é a única neoplasia mieloproliferativa classificada como cromossomo Ph positiva ou *BCR/ABL1* positiva, enquanto que as demais NMP denominam-se cromossomo Ph negativas ou *BCR-ABL1* negativas (8).

Esta introdução terá como foco a PV, TE e MF, uma vez que o presente trabalho visou investigar a frequência dos precursores terminais eritróides nessas doenças.

A Policitemia Vera (PV) apresenta incidência de 0,68 a 2,6 indivíduos por 100.000 habitantes por ano, acometendo principalmente mulheres e sendo incomum em indivíduos com idade inferior a 60 anos (9). Os critérios estabelecidos pela OMS para o diagnóstico de PV baseiam-se em três critérios maiores e um critério menor. Os critérios maiores são: 1 – hemoglobina maior que 16,5 g/dl para homens e 16g/dl para mulheres e/ou hematócrito maior que 49% para homens e 48% para mulheres, ou então aumento da massa de eritrócitos. 2 – biópsia de medula óssea apresentando hiperplasticidade para a idade, panmielose das linhagens eritrocítica, granulocítica e megacariocítica. Os megacariócitos maduros podem apresentar pleomorfismo (variação de tamanho); 3 – presença da mutação *V617F* no gene da *JAK2* (éxons 14 ou 12). O critério menor se refere ao nível de eritropoietina sérica, que pode ser abaixo do valor de referência (10).

Na PV, a elevada produção de eritrócitos se desenvolve na ausência de estímulos reconhecíveis, visto que os níveis séricos de eritropoietina (EPO) podem ser normais ou baixos. Por conseguinte, no quadro de PV, a porcentagem de eritroblastos pode ser dependente ou independente da sinalização de EPO (11).

Pacientes com PV, de acordo com a história natural da doença, podem apresentar trombose arterial e venosa e evoluírem para mielofibrose secundária (MFS) ou leucemia

mieloide aguda (LMA) (12). A estratificação de risco na PV se divide em duas categorias, sendo elas: 1) baixo risco, na qual se incluem os pacientes com idade inferior a 60 anos e ausência de histórico de eventos trombóticos e 2) alto risco, na qual estão inclusos os pacientes com idade acima de 60 anos e aqueles que apresentam histórico de eventos trombóticos (13, 86).

A TE apresenta incidência de 0,38 a 1,7 indivíduos por 100.000 habitantes por ano, acometendo na maioria mulheres com mais de 60 anos (14), com sobrevida aproximada após o diagnóstico de cerca de 20 anos (15).

A OMS estabeleceu critérios para o diagnóstico da TE, que são quatro maiores e um menor. Os critérios maiores são: 1 – contagem de plaquetas acima de $450 \times 10^9/L$; 2 – biópsia de medula óssea apresentado aumento da proliferação da série megacariocítica, evidenciando número aumentado de megacariócitos maduros com núcleos hiperlobulados, sem aumento na contagem de eritrócitos e granulócitos; muito raramente, pode ocorrer fibrose com deposição de fibras reticulínicas (grau 1); 3 – não atender aos critérios da OMS para outras neoplasias mieloides como LMC, PV, MF e síndrome mielodisplásica (SMD); 4 – presença de uma das mutações iniciadoras em *JAK2*, *CARL* ou *MPL*. O critério menor se refere a presença de marcadores de clonalidade como cariótipo anormal ou a ausência de trombocitose reativa (10).

Na TE, ocorre o aumento isolado da produção de megacariócitos e a consequente síntese exacerbada de plaquetas, enquanto que na MF observa-se período inicial de hiperproliferação das três linhagens celulares e um período crônico posterior marcado pela pancitopenia das linhagens hematopoéticas e deposição de tecido fibroso na medula óssea (fibrose) (18).

Pacientes com PV e TE, conforme a história natural da doença, podem progredir para a fase blástica (LMA) e mielofibrose secundária (19).

A MF tem incidência de 0,1 a 1,0 indivíduo por 100.000 habitantes por ano, acometendo, principalmente, indivíduos com idade média de 66 anos (16) e a sobrevida é estimada em 3,5 a 5,5 anos a partir do diagnóstico (17).

No caso da MF, os critérios diagnósticos são:

1) Na fase pré-fibrótica (pré-MF) os critérios maiores da pré-MF são: a) proliferação megacariocítica atípica, sem a presença de fibrose maior que grau 1, aumento na celularidade da medula óssea com possível diminuição da eritropoiese; b) não se enquadrar em critérios diagnósticos estabelecidos pela OMS para outras neoplasias mieloides; c) presença de uma

das mutações em *JAK2*, *CARL* ou *MPL* e, na ausência destas, deve haver a presença de outro marcador de clonalidade ou ausência de fibrose reativa. Os critérios menores para pré-MF são a presença de um ou mais dos seguintes sinais: anemia não atribuída a comorbidades, leucocitose maior que $11 \times 10^9/L$, esplenomegalia palpável, nível de lactato desidrogenase (LDH) acima do limite superior de referência (10).

2) Para MF são: a) proliferação megacariocítica atípica com fibrose de fibras reticulínicas ou de colágeno grau 2 ou 3; b) não atender a outros critérios diagnósticos estabelecidos pela OMS para neoplasias mieloides; c) – presença de uma das mutações iniciadoras em *JAK2*, *CARL* ou *MPL* e, na ausência destas, deve haver a presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reativa. Para a avaliação dos critérios menores, os pacientes devem possuir um ou mais dos seguintes sinais confirmados por duas determinações consecutivas: anemia não atribuída a outras comorbidades, leucocitose maior que $11 \times 10^9/L$, esplenomegalia palpável, nível de LDH acima do limite superior de referência ou leucoeritroblastose (10).

A MF pode evoluir para a fase blástica (leucemia mieloide aguda, LMA) em cerca de 10% a 20% dos casos. Essa evolução causa a diminuição drástica da expectativa de vida dos pacientes e está associada à presença das mutações em genes envolvidos na regulação epigenética (20) e codificantes de constituintes de vias de sinalização celular (21). A instabilidade genética na MF é muito acentuada, corroborando para que ela seja a NMP com o pior prognóstico dentre as estudadas neste trabalho (22). Pacientes com MF podem ter o risco de evolução para LMA estratificado por meio de escores, como o Sistema de Escore Dinâmico Internacional de Pontuação Prognóstica (DIPSS). Este escore de prognóstico considera os seguintes parâmetros laboratoriais: concentração de hemoglobina, contagem de leucócitos, porcentagem de blastos, anemia e idade dos pacientes (23, 24) e auxilia na escolha do tratamento para estes pacientes.

1.2 Fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas

PV, TE e MF compartilham várias características em comum, como proliferação de progenitores hematopoéticos multipotentes da medula óssea e acúmulo de células maduras mieloides no sangue periférico sem a presença de estímulo hormonal ou de citocinas e fatores de crescimento, hematopoese extramedular e progressão para LMA (6, 10, 25).

Desde o ano de 2005, foram identificadas em pacientes com NMP mutações genéticas, designadas como iniciadoras, nos genes que codificam a Janus Kinase 2 (*JAK2*), o Receptor de Trombopoetina (*MPL*) e a Calreticulina (*CARL*) (figuras 1A, B e C) (26-28).

Estas mutações promovem ganho de função nas proteínas codificadas, o que resulta na ativação constitutiva da via de sinalização JAK2-STAT (29), bem como na proliferação celular e resistência das células da linhagem mieloide à apoptose.

A primeira mutação iniciadora a ser descrita foi a *JAK2V617F*, que ocorre no éxon 14 do gene promovendo a troca de uma guanina por timina na posição 1849, alterando o produto proteico final. Com a substituição do resíduo de valina pelo resíduo de fenilalanina no códon 617, ocorre o ganho de função da enzima, resultando na proliferação celular exacerbada e na independência das células hematopoéticas ao estímulo das citocinas (30).

A enzima *JAK2* é uma das quatro proteínas da família das Janus Kinases e possui função de tirosina-quinase. Esta família de quinases, mais especificamente a *JAK2*, é responsável pela ativação de vias intracelulares nas células hematopoéticas e localiza-se de forma justaposta aos receptores da eritropoetina (REPO), da trombopoetina (RMPL) e do fator estimulador de colônias de granulócitos (RFEC-G) (28).

Quando as citocinas se ligam aos receptores, estes mudam de conformação, se autofosforilam e, conseqüentemente, ativam a enzima *JAK2*. A *JAK2* ativada fosforila moléculas sinalizadoras chamadas de STAT, que, quando ativadas, se homodimerizam ou heterodimerizam, ativam as vias MAPK e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), migram para o núcleo e induzem a transcrição de genes-alvo envolvidos na regulação da síntese de citocinas, proliferação e apoptose celular. A ativação desta via favorece, portanto, o acúmulo dos precursores hematopoéticos, o bloqueio da apoptose e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (31).

A mutação em *JAK2* no éxon 14 é responsável por aproximadamente 95% dos casos de PV e os demais 5% dos casos estão relacionadas às mutações do éxon 12 ou mutações epigenéticas. A mutação no éxon 12 em pacientes com PV negativos para a mutação *JAK2V617F* foi descrita em 2007 e é rara em pacientes com TE e MF (31, 34, 35). Portanto, o encontro destas mutações é de fundamental importância para o diagnóstico de PV, ao passo que o encontro delas em TE e MF auxilia na determinação da clonalidade, pois estão presentes em apenas 50 a 60% destes pacientes (32, 33, 37).

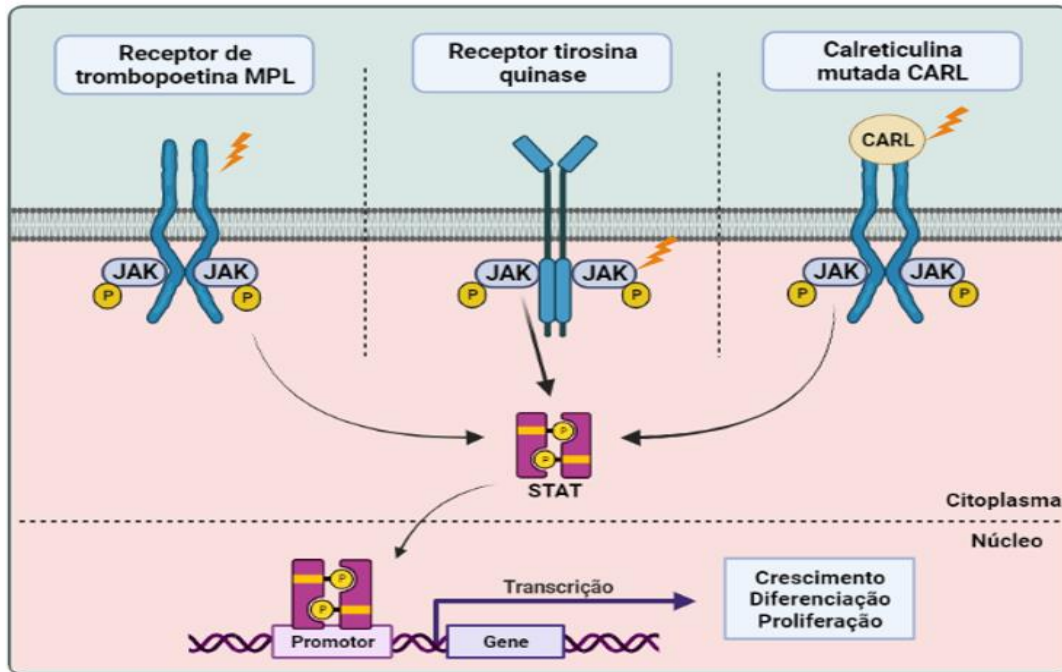


Figura 1. Mutações iniciadoras associadas à patogênese das neoplasias mieloproliferativas (NMP). As mutações nos genes *MPL*, *JAK* e *CARL* conduzem à ativação constitutiva da via JAK-STAT e à alteração da expressão de genes relacionados com a proliferação, crescimento, sobrevivência e diferenciação celular. Os círculos alaranjados com P representam a fosforilação das proteínas envolvidas no processo ativação e os raios representam as mutações em *MPL*, *JAK* e *CARL*. A) mutação no receptor de trombopoetina (*MPL*), B) mutação em janus quinase 2 (*JAK2V617F*), C) mutação da calreticulina (*CALR*). JAK - enzima janus quinase, CARL - calreticulina, P - fosforilação, STAT - proteína intracelular com a função de transdução de sinal. Fonte: elaborada pelo autor.

Um ano após a descoberta da mutação *JAK2*, foi descrita em pacientes com NMP a mutação iniciadora no gene que codifica o receptor da trombopoetina (*MPL*), proteína importante para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das células da linhagem megacariocítica. O gene que codifica este receptor fica localizado no cromossomo 1, na região 1p34. A mutação ocorre no éxon 10, resultando na substituição do aminoácido triptofano na posição 515 por uma leucina, lisina, arginina ou alanina. A consequência desta mutação é a ativação constitutiva do *MPL*, que ativa a via JAK-STAT de forma independente da interação do receptor com as citocinas e fatores de crescimento. Esta mutação raramente é encontrada em PV, mas pode ser detectada em cerca de 5% a 10% dos casos de TE e MF, respectivamente (32, 34, 36, 37).

A mutação na Calreticulina (*CARL*), uma chaperona que se liga ao íon cálcio e é encontrada no retículo endoplasmático, foi descrita em 2013 em NMP. O gene que a codifica se localiza no cromossomo 19 na posição 19p13. As mutações ocorrem no éxon 9 e são originadas pela deleção de 52 pares de base (pb) ou inserção de 5 pb, levando à produção da chaperona com alteração na região c-terminal e prejudicando a afinidade de ligação pelo

cálcio. Por conseguinte, a CARL se transloca até a membrana celular e se liga ao receptor MPL e com baixa frequência ao receptor de fator estimulante de crescimento de colônias granulocíticas (RFEC-G), ativando a sinalização JAK2-STAT. Esta mutação raramente é encontrada na PV, mas é detectada em cerca de 30% dos casos de TE e em 35% de pacientes com MPF (37, 38) negativos para a mutação JAK2V617F.

Além das alterações fenotípicas e funcionais envolvendo as proteínas JAK2, CARL e MPL, anormalidades em complexos epigenéticos têm sido associadas com a gênese e progressão das NMP. Mutações nos genes *DNMT3*, *TET2*, *IDH1/2*, *EZH2* e *ASXL1* demonstraram contribuir para a hiperproliferação celular, instabilidade genômica e pior prognóstico dessas doenças (37, 39, 40).

Apesar dos conhecimentos recentes sobre a fisiopatologia destas desordens, os mecanismos celulares e moleculares associados ao aparecimento das mutações, progressão da doença e ativação da via JAK/STAT na ausência das mutações ainda precisam ser melhor elucidados.

Ainda neste contexto, permanece desconhecido o processo pelo qual a mesma mutação iniciadora (JAK2) pode originar diferentes doenças e quais alterações ocorrem nas células da linhagem mieloide, como, por exemplo, nas células eritróides.

Assim sendo, este estudo visou descrever possíveis alterações imunofenotípicas e de frequência dos precursores eritróides terminais na medula óssea de pacientes com PV, TE e MF.

1.3 Tratamento das Neoplasias Mieloproliferativas

A maioria dos tratamentos empregados, até o momento, para PV, TE e MF não são curativos e nem alteram a história natural de progressão da doença para mielofibrose secundária (MFS) e LMA.

Os tratamentos, no caso de PV e TE, têm como objetivo principal diminuir o risco da ocorrência de eventos trombo-hemorrágicos e na MF a melhora dos sintomas e qualidade de vida (41).

A flebotomia, utilizada para tratar pacientes com PV, visa diminuir o hematócrito do paciente, mantendo-o abaixo de 45% nos homens e 42% nas mulheres. Sua importância pode ser ilustrada por meio da análise da sobrevida do paciente, que era menor que dois anos, antes do início de sua utilização, mas após sua introdução, houve aumento da sobrevida em quatorze anos (3, 42).

O tratamento dos pacientes com PV depende da estratificação de risco da doença, que dita a condução do tratamento farmacológico. Os pacientes de baixo risco são aqueles que possuem idade inferior ou igual a 60 anos e que não possuem histórico de trombose. Estes pacientes são tratados com aspirina em baixas doses e eventualmente realizam a flebotomia para manter o hematócrito nos valores ideais. Os pacientes com PV de alto risco são aqueles que possuem idade acima de 60 anos e histórico de trombose. Para estes pacientes, o tratamento segue como o preconizado para os pacientes de baixo risco, porém, com o acréscimo de citorredutores (hidroxicarbamida) ou inibidores da JAK2 (ruxolitinibe) ou interferon- α (43).

Pacientes que apresentam histórico familiar de eventos trombóticos são mais susceptíveis a desenvolvê-los na PV e TE e, neste caso, devem ser empregados como terapia os fármacos hidroxicarbamida (HU) e aspirina (44). Aproximadamente 24% dos pacientes desenvolvem resistência ou intolerância à HU (45) e, nestes casos, os pacientes podem ser tratados com interferon-alfa (IFN- α), inibidor de JAK2 ou bussulfano (46, 47).

O IFN- α é uma citocina que potencializa a resposta imune, inibe a proliferação celular e exerce atividade antitumoral, auxiliando na modulação da remissão hematológica em pacientes com PV (47). O bussulfano é um agente alquilante que se liga às fitas de DNA, levando a célula neoplásica à morte, auxiliando no controle razoável dos parâmetros hematológicos em pacientes com PV (48).

O ruxolitinibe é um potente inibidor de *JAK2*, *JAK1* e *TYK2*, promovendo a diminuição da leucocitose e esplenomegalia nos pacientes com PV (48). A incidência de progressão, na PV, encontra-se entre 5% a 10%, com aumento do risco ao longo do tempo. A TE apresenta o menor risco de evolução, entre 2% a 5%, enquanto a MF está associada ao maior risco 20% (49).

O tratamento para a TE segue outra estratificação de risco, que varia de muito baixo, baixo, intermediário e alto risco. O paciente de risco muito baixo caracteriza-se por possuir idade igual ou inferior a 60 anos, positividade para a mutação JAK2 e não possuir histórico de trombose, sendo estes pacientes tratados com aspirina em baixas doses (43).

Os pacientes com TE de baixo risco são aqueles que possuem idade igual ou inferior a 60 anos, mutação JAK2V617F e ausência de histórico de trombose, sendo tratados também com aspirina em baixas doses (43).

Os pacientes com risco intermediário apresentam idade superior a 60 anos, positividade para a mutação JAK2V617F e ausência de histórico de eventos trombóticos. São tratados com

aspirina em doses baixas ou caso haja eventos cardiovasculares e a aspirina é associada com fármacos citorrredutores. Nos pacientes de alto risco, com idade superior a 60 anos, presença de mutação JAK2V617F ou histórico de eventos trombóticos, o tratamento é realizado com associação de aspirina com fármacos citorrredutores (43).

A decisão sobre o tratamento para pacientes com MF segue a estratificação de risco da pontuação DIPSS ou DISSP-plus, que atribui aos pacientes os escores de risco baixo, intermediário 1, intermediário 2 e alto. Os pacientes de baixo risco e risco intermediário 1 são mantidos em observação ou em tratamento com hidroxycarbamida. Na presença de sintomatologia, podem ser tratados com hidroxycarbamida ou outros citorrredutores. Os pacientes de risco intermediário 2 e alto risco, que não são elegíveis para transplante de medula óssea, são tratados com inibidor de JAK2 (ruxolitinibe), enquanto que os elegíveis para transplante podem ser submetidos à esta terapia (43,50).

O transplante de medula óssea (TMO) é o único tratamento curativo, até o momento, indicado para MF (50). O TMO é limitado a pacientes que possuem escore de fibrose avançado, uma vez que se trata de um procedimento invasivo e que ainda possui taxa de rejeição e mortalidade pós-transplante não desprezíveis, sendo, portanto, fatores que limitam a utilização desta terapia, tornando apenas elegíveis os pacientes com MF jovens com doador que seja HLA-compatível. (3,50).

PV, TE e MF podem evoluir para LMA, e, neste caso, as modalidades terapêuticas são limitadas e paliativas. Em pacientes que evoluem para a LMA, a decitabina, agente hipometilante que atua regulando o perfil de metilação do DNA, tem sido utilizada em pacientes com MF em fase avançada. Os resultados obtidos ainda são limitados e atualmente estudos clínicos têm utilizado como esquema terapêutico a terapia combinada do agente hipometilante (decitabina ou azacitidina) com o inibidor de JAK ou com agentes citoredutores, como a HU, ou com inibidores da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (venetoclax). Espera-se que a associação destes fármacos reduza a esplenomegalia, aumente a sobrevida dos pacientes e diminua os quadros de anemia, comuns em pacientes com MF (51-53).

Pelo exposto, a fisiopatologia destas doenças precisa continuar a ser estudada, uma vez que ainda não existem tratamentos curativos e opções terapêuticas capazes de alterar a história natural das NMP.

1.4 Eritropoese

Eritropoese define-se como o processo de produção e renovação dos eritrócitos na medula óssea e no sangue periférico (56).

No microambiente medular, monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e mesenquimais encontram-se associados aos progenitores eritróides, produzindo citocinas como IL-3, hormônios, fatores de crescimento como a eritropoetina (EPO), o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (FEC-GM), fator estimulador de eritrócitos e megacariócitos (FE-EM), dentre outros. Em consequência, estas moléculas se ligam aos seus respectivos receptores nas células eritróides, ativando vias de sinalização que estimulam a regulação da diferenciação, maturação celular e funcional destas células (54,55).

Na hematopoese, o progenitor multipotente (PMP) dá origem aos progenitores mielóides comuns (PMC) e bipotentes eritróide e megacariocítico (PEM) (56-58). A partir deste último, surgem os precursores eritróides, cuja maturação ocorre em três estágios: eritropoese precoce, terminal e maturação dos reticulócitos (59) (figura 2).

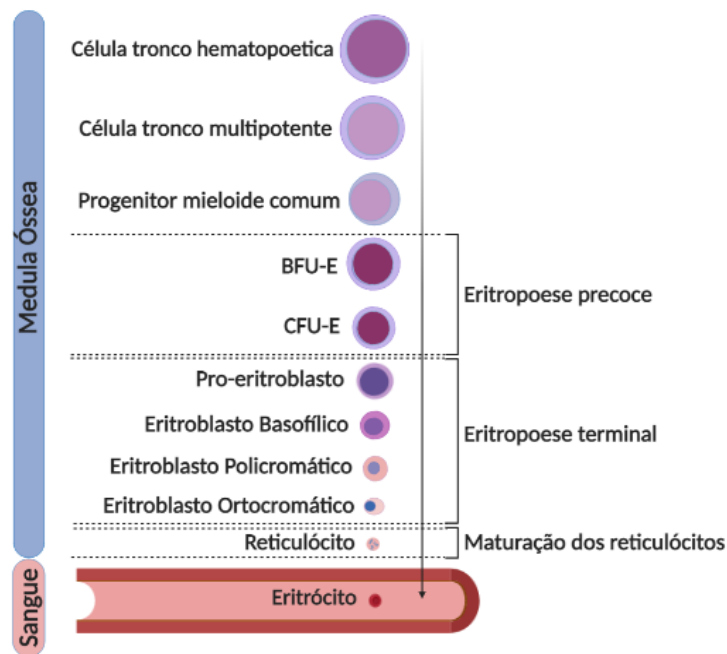


Figura 2. Representação esquemática das etapas da eritropoese na medula óssea. A eritropoese precoce compreende as unidades BFU-E e CFU-E, a eritropoese terminal dos pró-eritroblastos até os eritroblastos ortocromáticos e na fase final ocorre a maturação de reticulócitos em eritrócitos. Fonte: elaborada pelo autor.

Na eritropoese precoce, a diferenciação celular ocorre a partir das unidades formadoras de colônia de crescimento rápido (tipo “Burst” eritróide, BFU-E) e unidades formadoras de colônias eritróides (UFC-E), que darão origem aos pró-eritroblastos. A eritropoese terminal se inicia no estágio de pró-eritroblasto, que, após mitoses sucessivas e

diferenciação, formação da hemoglobina e diminuição do núcleo, originam os eritroblastos basofílicos I e II, policromáticos e ortocromáticos (figura 3).

As divisões por mitose ocorrem até o estágio de eritroblasto ortocromático e, a partir deste estágio celular, haverá a enucleação, resultando em reticulócitos e, em seguida, nos eritrócitos maduros (59).

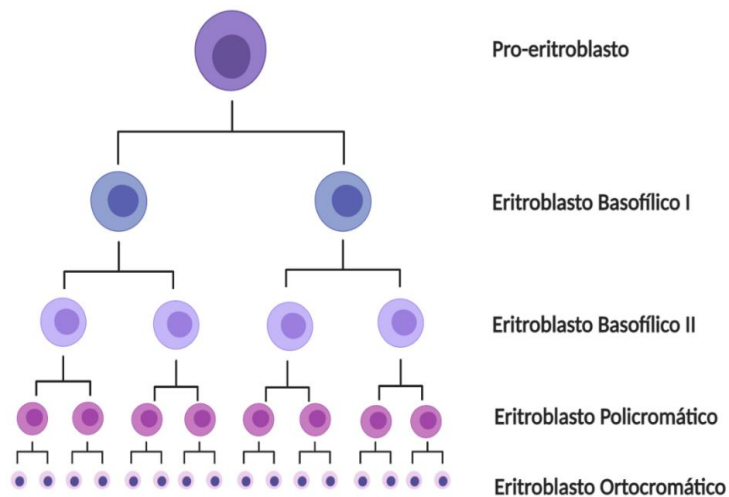


Figura 3. Representação esquemática das etapas de mitose que ocorrem durante a maturação dos progenitores eritróides terminais no organismo humano. Na parte superior está o proeritroblasto, que dará origem a 16 eritroblastos ortocromáticos por meio de sucessivas mitoses e diferenciação até o estágio ortocromático. Pro-eritroblastos (cor roxo), eritroblastos basofílicos I (cor azul) e II (cor roxo claro), eritroblastos policromáticos (cor rosa) e eritroblastos ortocromáticos (núcleo roxo e citoplasma rosa). Fonte: elaborada pelo autor.

Na diferenciação terminal ocorrem modificações morfológicas e bioquímicas nas células, tais como diminuição do tamanho celular, produção de hemoglobina até a saturação da hemácia, condensação da cromatina, perda de organelas e extrusão nuclear. Na última etapa, os reticulócitos apresentam decréscimo de volume, perdem o núcleo e as organelas, reorganizam a membrana e o citoesqueleto e se saturam de hemoglobina, originando os eritrócitos (56,59,60).

O local de maturação dos progenitores eritróides terminais no organismo humano denomina-se ilha eritroblástica, que se localiza nos órgãos eritropoéticos, como fígado fetal, medula óssea e baço. O caminho de diferenciação terminal eritróide ocorre nas ilhas eritroblásticas do centro – região na qual o macrófago está presente – em direção à periferia, região na qual podem ser encontrados os eritroblastos ortocromáticos (figura 4).

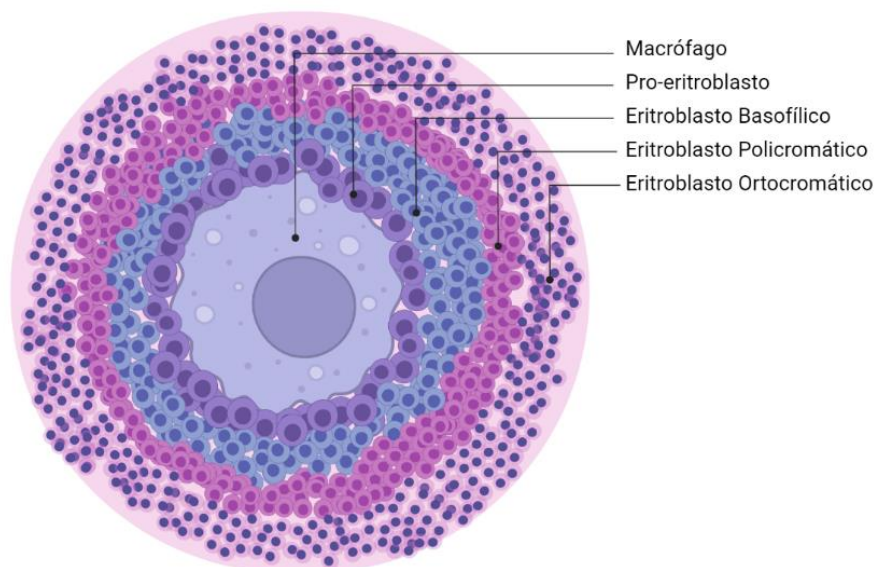


Figura 4. Representação esquemática da ilha eritroblástica. No centro, é possível visualizar o macrófago e, a partir do centro para a periferia, estão as células em diferentes etapas da diferenciação terminal eritróide. Na sequência, há pro-eritroblastos (cor roxo), eritroblastos basofílicos (cor azul), eritroblastos policromáticos (rosa) e eritroblastos ortocromáticos (núcleo roxo e citoplasma rosa). Fonte: elaborada pelo autor.

Na medula óssea, a diferenciação eritróide terminal ocorre a partir dos pro-eritroblastos, os quais sofrem numerosas modificações, até que se tornam reticulócitos, saem do microambiente medular e migram para a circulação periférica (61). Em cada estágio da diferenciação eritróide atuam fatores de transcrição, de sobrevivência e citocinas específicas para que a célula atinja o próximo estágio maturativo (56).

As células mais indiferenciadas, como BFU-E, CFU-E e pro-eritroblastos, possuem sensibilidade ao fator de células-tronco, fator estimulador de colônias granulocíticas e a IL-3. Nos pró-eritroblastos e eritroblastos basofílicos I e II, a eritropoetina (EPO), o metabolismo do ferro e a interação com o receptor de morte FAS são responsáveis pela maturação das células até os estágios de progenitores eritróides mais diferenciados (62).

Muitos são os fatores que regulam a diferenciação eritróide, porém, dentre eles, o principal é a EPO, que induz a diferenciação dos precursores eritróides terminais, atuando na prevenção da apoptose destas células e ativando a via JAK/STAT. Por consequência, JAK-STAT ativa outras vias de sinalização intracelulares ligadas à proliferação e diferenciação nestes precursores (96).

Morfologicamente, a primeira célula que pode ser identificada por meio de microscopia óptica é o pró-eritroblasto (PRO). Esta célula apresenta tamanho entre 20 a 25µm de diâmetro e é mononuclear. O núcleo preenche quase todo o citoplasma da célula (75-80%

do volume), apresenta cromatina grumosa com nucléolos visíveis, citoplasma escasso e basofílico (63) (figura 5A). Os pró-eritroblastos sofrem em média uma mitose e originam os eritroblastos basofílicos (63).

Os eritroblastos basofílicos (BASO) possuem tamanho que varia de 14 a 18 μ m de diâmetro. O núcleo é menor do que o do pró-eritroblasto e apresentam a cromatina mais condensada sem nucléolos; na porção citoplasmática há regiões perinucleares com pontos de hemoglobinação (63) (figura 5B e C). Cada eritroblasto basofílico sofre duas mitoses, dando origem ao eritroblasto basófilo inicial I e ao eritroblasto basófilo terminal II. Este último, por meio de mitose e diferenciação, origina o eritroblasto policromático (63).

Os eritroblastos policromáticos (POLI) são células menores do que os basofílicos, com 12 a 15 μ m de diâmetro, possuem relação núcleo-citoplasma menor, cromatina densa sem nucléolos e citoplasma com maior concentração de hemoglobina. Os eritroblastos policromáticos realizam uma mitose, que origina os eritroblastos ortocromáticos, como mostrado na figura 5D (63).

Eritroblastos ortocromáticos (ORTO) são células com diâmetro em torno de 8 a 12 μ m, com relação núcleo-citoplasma menor do que os eritroblastos policromáticos, cromatina condensada e sem nucléolos. A coloração do citoplasma se apresenta desde pouco basofílica (azul clara) até acidófila (alaranjada), podendo este fato ser explicado pela intensa hemoglobinação (figura 5E). Em circunstâncias fisiológicas, não realizam mitoses, produzem hemoglobina e o núcleo picnótico é eliminado da célula, originando os reticulócitos (63).

Os reticulócitos (RETIC) são as células do final da diferenciação terminal, possuem fragmentos de RNA e alta concentração de hemoglobina (figura 5F) (63). Os eritrócitos maduros (ERI) são o tipo celular mais abundante no sangue periférico, compreendendo, em média, entre 20 a 30 trilhões de células. Não apresentam núcleo e nem organelas, o que as torna especializadas em transportar oxigênio. Possuem formato bicôncavo, que facilita a passagem pelos microcapilares, com diâmetro de 7,2 a 7,9 μ m (figura 5G) (64, 65).

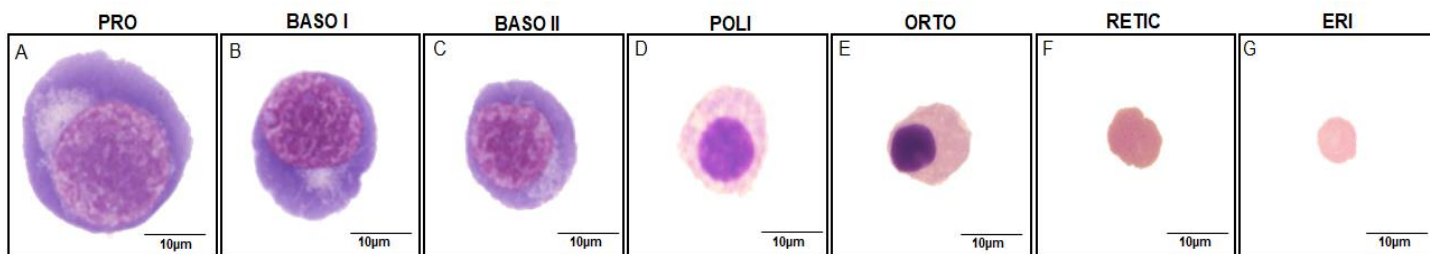


Figura 5. Progenitores eritróides terminais da medula óssea. Células eritróides terminais coradas pela coloração May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica no aumento de 100 X, com óleo de imersão. A) PRO - pro eritroblasto, B) BASO I - eritroblasto basófilo I, C) BASO II- eritroblasto basófilo II, D) POLI - eritroblasto policromático, E) ORTO - eritroblasto ortocromático, F) RETIC- reticulócito, G) ERI- eritrócito maduro. Fonte: elaborada pelo autor.

A função primordial do eritrócito é o transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos, por meio das moléculas de hemoglobina. Sua vida útil na circulação sanguínea é de aproximadamente 120 dias, sendo, ao final deste período, degradados no baço (66). Além disso, o eritrócito é responsável por outros tipos de transporte, como o de proteínas, nucleotídeos e nucleosídeos, peptídeos e fármacos (68).

Fenotipicamente, a maturação da linhagem eritróide a partir das células-tronco hematopoéticas na medula óssea pode ser avaliada por marcadores de superfície, que são expressos ao longo dos períodos de maturação durante a eritropoese. Portanto, a avaliação dos marcadores de superfície torna-se relevante para o entendimento do processo de maturação celular da linhagem eritróide (69), além de possibilitar o isolamento e quantificação das células em estágios de maturação específicos (59).

Os estágios finais do processo de eritropoese podem ser avaliados por meio da imunofenotipagem das células eritróides por citômetro de fluxo e por meio da detecção da expressão diferencial de marcadores de superfície específicos, empregados para identificar a fase de diferenciação das células.

O imunofenótipo ideal para designar as células da linhagem eritróide é: negatividade para CD45 (antígeno comum leucocitário) e positividade para os marcadores CD117 (receptor tirosina-quinase c-KIT) (70), CD105 (endogлина), CD34 (71), CD36 (receptor de colágeno tipo 1), CD71 (receptor de transferrina)(83), CD235a (Glicoforina A - GPA), band3 (CD233) e α -4-Integrina (CD49d) (59, 72).

No presente estudo, foi utilizado, para designar e quantificar a frequência dos precursores eritróides terminais, um painel de anticorpos com especificidade para os marcadores de superfície eritróide CD235a, CD233 e CD49d e negatividade para o marcador pan-leucocitário, o CD45, conforme estabelecido por Hu *et al*, 2013.

Avaliando a expressão diferencial destes marcadores, foi possível acompanhar as etapas de diferenciação das células terminais eritróides e quantificá-las quanto à frequência.

A GPA (CD235A), uma sialoglicoproteína transmembrana, representa cerca de 85% das glicoforinas encontradas na membrana das células eritróides e desempenha importante função estrutural nas células eritróides. A GPA é uma proteína restrita à linhagem eritróide, sendo expressa em pró-eritroblastos, eritroblastos basofílicos, policromáticos, ortocromáticos, reticulócitos e eritrócitos maduros, mas não na superfície de BFU-E e UFC-E, que são células mais indiferenciadas (73).

A proteína Band 3 (CD233), encontrada principalmente nos eritrócitos maduros, está envolvida no transporte de bicarbonato para o interior destas células e no efluxo do íon cloreto (74). A porção citoplasmática desta proteína compõe a estrutura dos eritrócitos maduros, participa da ancoragem do citoesqueleto do eritrócito, da ligação às enzimas glicolíticas e da interação com a desoxihemoglobina. Alterações dos níveis de hemoglobina causam estresse oxidativo na célula eritróide, levando à oligomerização de Band 3 na superfície celular, mecanismo que sinaliza para as células fagocitárias que o eritrócito está em senescente e deve ser depurado (74).

A Band 3 está envolvida no efluxo de esfingosina-1-fosfato (SP1), mediador lipídico responsável por desempenhar funções anti-apoptóticas, proliferação celular e quimioatração leucocitária (75). Alterações na distribuição de Band 3 na membrana plasmática das células eritróides estão associadas aos processos de inflamação, estresse oxidativo, citotoxicidade a drogas ou dislipidemia. Durante estas condições, ocorre a redistribuição dessa proteína pela membrana eritrocitária e posterior perda de elasticidade, resistência e forma dos eritrócitos, resultando em alterações morfológicas de importância para as atividades desempenhadas pela célula (76).

A α -4-integrina (CD49d), conhecida como antígeno tardio 4 (VLA-4), é expressa em leucócitos, monócitos e progenitores eritróides menos diferenciados, como pró-eritroblastos e eritroblastos basofílicos (77). Esta integrina atua promovendo a adesão à trombospondina e à fibronectina e se complementa com o receptor VCAM-1, expresso em macrófagos (78). Participa ainda do processo de adesão célula-célula e células-matriz extracelular, desempenha papéis fundamentais na resposta imune e está envolvida na patogênese da artrite reumatoide, asma, psoríase, rejeição aos transplantes e doença inflamatória crônica (79).

A interação de α 4-integrina com VCAM-1, proteína macrofágica, está ligada à diferenciação eritróide nos locais onde ocorre a eritropoese, como o fígado fetal e medula

óssea do adulto. Esta proteína está expressa em alta densidade nas células indiferenciadas e em baixa densidade nas células maduras da linhagem eritrocítica (80). A α -4-integrina participa do controle da proliferação e da dinâmica de migração de outras células hematopoéticas, como os linfócitos pre-B, na medula óssea (81).

Como citado anteriormente, estes marcadores celulares de diferenciação eritróide terminal (CD235a ou GPA, CD49d ou α -4-integrina e CD233 ou Band3) foram empregados, neste estudo, para imunofenotipar e quantificar os precursores terminais eritróides em PV, TE e MF.

A imunofenotipagem e a estratégia de *gates* para determinar a frequência dos precursores eritróides terminais por citometria de fluxo, estabelecida por Hu *et al*, 2013, se baseiam na expressão diferencial destes marcadores de superfície α -4-integrina, Band3 e GPA nestas células.

A expressão diferencial destes marcadores permite a demarcação do gradiente de expressão antigênica correspondente ao processo de diferenciação celular. Deste modo, à medida que ocorre a diminuição de α -4-integrina, presente nos progenitores eritróides terminais mais indiferenciados, ocorre o aumento da expressão de Band3, presente nas células eritróides terminais mais diferenciadas (59, 72).

Assim, a partir deste gradiente de expressão, tornou-se possível quantificar a frequência dos progenitores eritróides terminais da medula óssea e comparar estas subpopulações entre indivíduos saudáveis e pacientes com PV, TE e MF. (59,72).

A descrição das alterações da eritropoese terminal no contexto das doenças mieloproliferativas pode contribuir para melhor compreensão dos fenótipos destas doenças.

1.5 Alterações da eritropoese em doenças hematológicas

A eritropoese é o processo de diferenciação e modificações celulares da célula-tronco até o surgimento do eritrócito maduro na circulação sanguínea (62).

Em desordens hematológicas, quando há o comprometimento da linhagem eritróide, este pode se apresentar em pelo menos três situações diferentes: 1) anemia, 2) policitemia e/ou 3) displasia eritrocitária. Este texto será restrito ao relato das alterações em neoplasias hematológicas (87).

A PV tem como característica principal o aumento de eritrócitos maduros no sangue periférico, provavelmente resultante do estímulo incessante de ativação constitutiva da via JAK/STAT. A ativação desta via estimula outras vias de sinalização celular, como a

fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que estão diretamente relacionadas com proliferação, diferenciação e apoptose celular (82).

Foi relatado por Bruchova et al. (2009), em estudo *in vitro*, que a maturação de precursores terminais eritróides, em pacientes com PV, é acelerada. Outra característica observada foi a desregulação da expressão de microRNAs, como o miR150, miR451, miR222, miR155 e miR378, que foram associados à desregulação dos genes do receptor de eritropoetina (REPO) e no fator de transcrição *MYB* (95).

Laubach et al. (2009) desenvolveram estudos de diferenciação celular empregando as células CD34⁺ isoladas de pacientes com PV positivos para a mutação JAK2V617. Os precursores eritróides obtidos a partir das células CD34⁺ apresentaram resistência à apoptose e aumento de proliferação, características que foram associadas à ativação anormal das vias de sinalização celular RAS e PI3K e à hipersensibilidade à eritropoetina (EPO) (91).

Na TE, a anemia é pouco frequente e a literatura atual ainda não trouxe informações sobre anomalias da eritropoese no contexto desta doença. Por outro lado, na MF, o quadro de anemia está presente e a eritropoese é ineficaz (92).

Nas síndromes mielodisplásicas (SMD), pôde ser observado que a diferenciação terminal eritróide está desregulada, principalmente quanto às frequências de subpopulações de precursores terminais eritróides. Além disso, foram encontrados nos diferentes subtipos de SMD padrões distintos de frequências de precursores terminais eritróides (59).

Especula-se que as alterações na eritropoese na SMD estejam associadas ao perfil de metilação alterado do fator de transcrição GATA-1. Com a hipermetilação de GATA-1, a diminuição de sua expressão leva à interrupção da diferenciação eritróide. GATA-1 é o fator de transcrição mais importante para a diferenciação eritróide, e, portanto, acredita-se que pode ser a razão pela qual a eritropoese é ineficiente na SMD (84).

Na MF, a deficiência de GATA-1 também parece ser um dos fatores responsáveis pela alteração da eritropoese. A deficiência deste fator de transcrição, descrita nas células mieloides de pacientes com MF, seria responsável pelo aumento de megacariócitos imaturos, característica frequentemente observada nesses pacientes e diretamente associada à diminuição da diferenciação de precursores eritróides (85).

Apesar dos conhecimentos sobre a fisiopatologia da PV, TE e MF, não foram descritas as alterações na dinâmica do processo de eritropoese nestas doenças. Os perfis imunofenotípicos e as frequências dos precursores eritróides, nas NMP, são desconhecidos.

Portanto o presente trabalho padronizou o protocolo de marcação e isolamento das subpopulações de precursores terminais eritróides das NMP tendo como base a metodologia estabelecida por Hu e colaboradores (2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Padronizar o protocolo de separação das subpopulações de precursores terminais eritróides e quantificar a frequência destes progenitores na medula óssea de indivíduos saudáveis e pacientes com PV, TE e MF.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o protocolo de separação, criopreservação e descongelamento das células mononucleares da medula óssea (MO);
- Padronizar a estratégia de *gates* para realização do *sorting* celular e *cytospin* dos progenitores eritróides terminais;
- Imunofenotipar os precursores eritróides terminais da MO de indivíduos saudáveis (controles) e de pacientes com PV, TE e MF, utilizando os marcadores Band 3, Glicoforina A (GLA) e α 4-Integrina;
- Quantificar a frequência dos precursores eritróides terminais (pró-eritroblasto, basofílico, policromático e ortocromático) da MO de controles e pacientes com PV, TE e MF;
- Realizar agrupamentos e clusterizações *in silico* da expressão de α 4-Integrina e Band3 nas populações de progenitores eritróides terminais das MO de controles e pacientes com PV, TE e MF, para melhorar a visualização da separação pelo *sorting* celular.

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Os pacientes estudados foram diagnosticados e selecionados pelo serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), coordenado pela Profa. Dra. Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes, médica hematologista e docente responsável pelo ambulatório de Neoplasias Mieloproliferativas. O diagnóstico das NMP baseou-se nos critérios da OMS, descritos no item Introdução.

Foram estudados os aspirados de medula óssea (MO) de pacientes adultos ao diagnóstico com PV (n= 5), TE (n=4) e MF (n=3).

O grupo controle foi composto por doadores saudáveis de MO (n=6), selecionados pela equipe de transplante de medula óssea (TMO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP).

Os dados demográficos e clínico-laboratoriais das amostras utilizadas neste trabalho podem ser encontrados nas tabelas 6 e 7, do item 4.1 dos Resultados.

Todos os indivíduos selecionados consentiram sobre a participação neste estudo por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FCFRP-USP (CAAE 29030620.9.0000.5403) e HCFMRP-USP (CAAE 29030620.9.3001.5440).

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), 4 ml de medula óssea foram colhidos pelos médicos hematologistas durante a biopsia de rotina e coleta da MO para o transplante em tubo com EDTA e as amostras foram submetidas à imunofenotipagem e isolamento dos precursores eritróides por citometria de fluxo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Isolamento das células mononucleares da medula óssea (BMMC) por gradiente de Ficoll-Hypaque, criopreservação celular e descongelamento

3.2.1.1 Separação de células mononucleares pelo gradiente de Ficoll-paque

Foram testados dois protocolos de separação celular com Ficoll-paque:

- 1) Utilizou-se 4 ml de MO, que foi diluída três vezes em tampão salino fosfato (PBS) com BSA 0,5%. A medula óssea diluída foi adicionada à superfície de três ml de Ficoll-paque (GE-Healthcare, Alemanha) presente no fundo de um falcon de 15 ml. O tubo falcon foi então centrifugado por 30 minutos, em velocidade de 400 x g a 20° C, sem freio e sem aceleração.

2) Utilizou-se 4 ml de MO, que foi diluída três vezes em tampão salino fosfato (PBS) com BSA 0,5%. A medula óssea diluída foi adicionada à superfície de três ml de Ficoll-paque (GE-Healthcare, Alemanha) presente no fundo de um falcon de 15 ml. O tubo falcon foi então centrifugado por 40 minutos, em velocidade de $400 \times g$ a 20°C , sem freio e sem aceleração.

Na etapa final de centrifugação, nos dois métodos empregados, o anel de células mononucleares formado foi coletado com pipeta Pasteur e lavado com PBS suplementado com 0,5% de BSA e centrifugado por 10 minutos a $500 \times g$ a 4°C . O *pellet* celular foi ressuspensão em um ml de PBS e as células foram contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico utilizando o corante de viabilidade *Trypan Blue* (Gibco, Estados Unidos).

3.2.1.2 Congelamento das medulas ósseas dos controles e de pacientes

Foram produzidas e testadas duas soluções de criopreservação de células mononucleares da medula óssea: 1) solução de criopreservação com 90% de soro bovino fetal inativado (SFI) (Gibco, Estados Unidos) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Alemanha). Esta solução recebeu o nome de solução de congelamento simples; 2) solução de criopreservação com 40% de soro bovino fetal inativado (SFI) (Gibco, Estados Unidos), 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Alemanha), 40% de solução comercial de hidroxietilamido (Voluven 6%, Fresenius Kabi, Brasil) e 10% de solução comercial anticoagulante de ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose (ACD-A, Sigma-Aldrich, Alemanha).

A esta última solução (número 2), foi dado o nome de coquetel criopreservante. As duas soluções foram preparadas antes da utilização e mantidas sob refrigeração a 4°C . Durante a realização dos testes, foi utilizado o recipiente de congelamento “Mr. Frosty” (Nalgene® Cryo 1°C Freezing Containers, Thermo Scientific) (teste 2 e 4).

Foram testados quatro protocolos de congelamento de células mononucleares de medula óssea isoladas pelo gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque:

1) Congelamento com soro bovino fetal Inativado e DMSO (solução 1), sem usar o Mr. Frosty

Foram utilizadas 1×10^7 células mononucleares de medula óssea (BMMC), as quais foram centrifugadas e ressuspensas em um ml da solução 1. Em seguida, a solução contendo

as células foi colocada em criotubo e incubada por 20 minutos em freezer -20°C. Após este tempo, o tubo foi colocado no freezer -80°C por 24 horas e armazenado em nitrogênio líquido até o momento do descongelamento. Todas as etapas deste procedimento, bem como o transporte do criotubo foram realizadas em gelo.

2) Congelamento com soro bovino fetal e DMSO (solução 1) com uso do Mr. Frosty

Foram utilizadas 1×10^7 células BMMC, as quais foram centrifugadas, ressuspensas em um ml da solução 1 e colocadas em criotubo diretamente no recipiente Mr. frosty e no freezer -80°C por 2 horas. Posteriormente, o criotubo foi armazenado em nitrogênio líquido até o momento do descongelamento. Todas as etapas do teste, bem como o transporte do criotubo, foram realizadas em gelo.

3) Congelamento com soro bovino fetal Inativado, DMSO, Voluven 6% e ACD-A (solução 2) sem Mr. Frosty

Foram utilizadas 1×10^7 células BMMC, as quais foram centrifugadas, ressuspensas em um ml da solução de congelamento 2 e colocadas em criotubo. O criotubo com a suspensão celular foi colocado por 20 minutos no freezer -20°C, seguido do congelamento no freezer -80°C. Ao final de 24 horas o criotubo foi armazenado em nitrogênio líquido até o momento do descongelamento. Todas as etapas do teste, bem como o transporte do criotubo, foram realizadas em gelo.

4) Congelamento com Soro Fetal Inativado, DMSO, Voluven (6%) e ACD-A (solução 2), com Mr. Frosty

Foram utilizadas 1×10^7 células BMMC, as quais foram centrifugadas, ressuspensas em um ml da solução de congelamento 2 e colocadas em criotubo. O criotubo foi colocado no recipiente mr. frosty e levado imediatamente para o freezer -80°C. Ao final de 2 horas, o criotubo contendo a suspensão celular foi armazenado em nitrogênio líquido até o momento de seu descongelamento. Todas as etapas do teste, bem como o transporte do criotubo, foram realizadas em gelo.

No momento da imunofenotipagem das células eritróides, os criotubos foram descongelados, as células lavadas com PBS suplementado com 0,5% de BSA e contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico, utilizando o corante de viabilidade *Trypan Blue*.

Posteriormente, as células de cada teste foram incubadas com os anticorpos – 1µl anti-CD45 (PECy7), 2µl anti-CD235a (BB515) – por 20 minutos em geladeira. Em seguida, as células foram lavadas com PBS suplementado com 0,5% de BSA e centrifugadas por três minutos a 500 x g em temperatura ambiente.

Para avaliação da apoptose por meio da anexina V-Cy5, por citometria de fluxo, foi utilizado o kit Annexin V Apoptosis Detection (BD Biosciences, Estados Unidos). O tampão de ligação foi diluído conforme recomendação do fabricante e utilizado durante as marcações das células. As células marcadas na etapa posterior foram lavadas com o tampão de ligação do kit e incubadas com 5µl de anexina V (Cy5) em 100µl do mesmo tampão por 20 minutos a temperatura ambiente, em ambiente protegido de luz. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão de ligação e centrifugadas por três minutos a 500 x g e ressuspensas em 200 µl de tampão de ligação. Antes da aquisição, foi adicionado 5µl do marcador de viabilidade 7AAD ao tubo contendo as células. Ao final desta etapa, as células foram imunofenotipadas em citômetro de fluxo. As referências dos materiais e anticorpos utilizados estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Reagentes e anticorpos utilizados nos testes de criopreservação celular e quantificação da apoptose.

Reagentes / Anticorpos	Empresa	Referência	Lote
Soro fetal	Gibco	12657	210585K
DMSO	Sigma-Aldrich	D5879	SHBL1941
Volugen (6%)	Free Flex	1400391FFA	20000545V03
ACD-A	Zimmer Biomet	9350-25	8013-89
<i>Trypan Blue</i> Solution 0,4%	Gibco	15250061	2101677
Anti-CD45 (PEcy7)	BD Biosciences	557748	9024662
Anti-CD234a (BB515)	BD Biosciences	565234	0014619
Anti-anexinaV (Cy5)	BD Biosciences	559447	9000244
7AAD (PerCP-Cy-5,5)	BD Biosciences	559925	0244338

DMSO: Dimetilsulfóxido, Volugen: Solução comercial de hidroxietilamido, ACD-A: Ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose, PEcy7: Ficoeritrina-Cy7, BB515: Brillant Blue 515, 7AAD: 7-aminoactinomicina D, PerCP-Cy-5,5: Peridina clorofila proteína-Cy5.5.

3.2.1.3 Descongelamento das amostras de células mononucleares das medulas ósseas

Foram testados três processos de descongelamento das células de MO:

1) Descongelamento Rápido

Foram utilizadas 1×10^7 células de BMDC que estavam criopreservadas em nitrogênio líquido. O criotubo contendo a suspensão celular foi mantido em banho-maria a 37°C até o descongelamento parcial das células. As células parcialmente descongeladas do criotubo foram transferidas diretamente para um tubo falcon de 50 ml contendo 15 ml da solução de descongelamento. O tubo falcon foi agitado uma vez a cada minuto por 5 minutos em banho de gelo. As células descongeladas foram lavadas com PBS suplementado com 0,5% de BSA e EDTA e centrifugadas por 10 minutos a $500 \times g$ a 4°C . Ao final desta etapa de centrifugação, a suspensão celular foi imediatamente marcada com $5\mu\text{l}$ do corante vital 7AAD e adquiridas no citômetro de fluxo.

2) Descongelamento por gotejamento de meio

Foram utilizadas 1×10^7 células de BMDC criopreservadas em nitrogênio. As células foram descongeladas parcialmente no banho-maria a 37°C . Quando o *pellet* de células desgrudou do criotubo, foi adicionado ao fundo de um tubo falcon de 50 ml e sobre ele foi gotejado lentamente, sob agitação, 20 ml da solução de descongelamento contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal inativado e $10\mu\text{l}$ de DNase. As células foram centrifugadas por 10 minutos a $500 \times g$ a 4°C . Ao final, o sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* de células foi adicionado novamente 10 ml da solução de descongelamento em banho de gelo por 10 minutos. Ao final deste período, as células foram lavadas em PBS suplementado com 0,5% de BSA e centrifugadas por 10 minutos a $500 \times g$ a 4°C . Ao final desta etapa de centrifugação, as células foram marcadas com $5\mu\text{l}$ do corante vital 7AAD e adquiridas no citômetro de fluxo.

3) Descongelamento com estabilização celular em estufa a 37°C

Foram utilizadas 1×10^7 células de BMDC que estavam criopreservadas em nitrogênio líquido. As células foram descongeladas totalmente em banho-maria e a suspensão celular transferida para um falcon de 50 ml. Sobre as células, foram gotejados lentamente e sob agitação 20 ml da solução de descongelamento. As células ressuspensas

nos 20 ml da solução de descongelamento foram centrifugadas por 10 minutos a 500 x g e a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de células recebeu 1 ml de solução de descongelamento e 10µl de DNase. As células foram mantidas em banho de gelo por 10 minutos e ao final foram lavadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal inativado. A seguir, as células foram novamente centrifugadas por 10 minutos, 500 x g a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 30 ml de RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado. Estas células foram colocadas em garrafa de cultura celular e incubadas numa estufa de 5% de CO₂ a 37 °C, por 24 horas.

Após as 24 horas de incubação na estufa, as células foram retiradas da garrafa e lavadas em PBS com BSA 0,5% e centrifugadas por 10 minutos a 4 °C. Ao final desta etapa, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 200 µl PBS com BSA 0,5% e marcadas com 5µl do corante vital 7AAD para aquisição em citômetro de fluxo. As referências dos reagentes utilizados estão listadas na tabela 2.

Tabela 2. Referências dos reagentes utilizados nos testes de descongelamento.

Reagente	Empresa	Referência	Lote
RPMI Medium 1640	Gibco	2340-021	1690042
Soro bovino fetal	Gibco	12657	210585K
DNase	Thermo Fisher Scientific	EN0521	01268963
7AAD (PerCP-Cy-5,5)	BD Biosciences	559925	0244338

DNase: Desoxirribonuclease, 7AAD: 7-aminoactinomicina D, PerCP-Cy-5,5: Peridina clorofila proteína-Cy5.5.

3.3. Titulação dos anticorpos para marcação das células eritróides terminais das medulas ósseas de pacientes e controles

A concentração de anticorpos empregada para marcar as células foi determinada por meio da titulação destes anticorpos nas células mononucleares de medula óssea. Assim sendo, diferentes concentrações (0,5 µl, 1 µl, 2 µl e 5 µl) foram utilizadas para marcar células numa concentração fixa. Foi estabelecido que a concentração de células mononucleares para análise deve estar entre 1 a 10 milhões de células no volume de 100µl de tampão PBS suplementado com 0,5% de BSA. As concentrações ideais dos anticorpos foram àquelas que permitiram a

melhor marcação e discriminação dos precursores eritróides terminais com a maior mediana de fluorescência.

As informações sobre os volumes dos anticorpos e do marcador de viabilidade celular (7AAD) usados na imunofenotipagem de precursores eritróides terminais, bem como os fluorocromos, clones e concentrações estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Referência dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem de precursores eritróides terminais.

Anticorpo	Clone	Concentração	Fluorocromo	Volume utilizado para marcação	Lote
Anti-Glicoforina A (CD235a) (BD Biosciences #565234)	GA-R2 (HIR2)	0,5 mg/ml	BB515	2 µL	0014619
Anti-CD45 (BD Biosciences #557748)	HI30	0,2 mg/ml	PE-Cy 7	1 µL	9024662
Anti-α integrina 4 (CD49d) (BD Biosciences #559881)	6F10	0,5 mg/ml	APC	5 µL	0009337
Anti-Banda 3 (IBGRL #9439)	BRIC 6	1 mg/ml	PE	2 µL	3114L
7AAD – marcador de viabilidade (BD Biosciences #559925)	-	0,25 mg/ml	PerCP-Cy-5,5	5 µL	0244338

CD: Cluster of differentiation, BB515: Brilliant Blue 515, PEcy7: Ficoeritrina-Cy7, APC: Aloficocianina, PE: Ficoeritrina, 7AAD: 7-aminoactinomicina D, PerCP-Cy-5,5: Peridinina clorofila proteína-Cy5.5.

3.4 Calibração do citômetro de fluxo

A calibração do equipamento FACS Aria III (Fusion), que foi empregado nas análises, foi realizada por meio de ajustes de voltagem usando células de medula óssea não marcadas com anticorpos (controle negativo).

Para a compensação de fluorescência, foram utilizadas *beads* (CompBeads Plus, BD Biosciences, Estados Unidos) com a finalidade de ajustar as flutuações nas fluorescências das amostras e evitar sobreposição das fluorescências. As *beads* foram incubadas com os anticorpos seguindo as especificações do fabricante.

Os dados de calibração e compensação foram armazenados no equipamento e a cada novo experimento a matriz de compensação pôde ser acessada e aplicada nos experimentos subsequentes.

3.5 Caracterização imunofenotípica e padronização do isolamento das subpopulações dos precursores eritróides terminais

3.5.1 Caracterização imunofenotípica das subpopulações dos precursores eritróides terminais

A caracterização imunofenotípica e a determinação da frequência dos precursores eritróides terminais foi realizada por citometria de fluxo utilizando o citômetro BD FACSAria® Fusion (BD, Biosciences) no Hemocentro de Ribeirão Preto.

As células mononucleares da medula óssea das amostras de pacientes e de doadores saudáveis foram diluídas em 100µl de tampão fosfato salina (PBS) contendo 0,5% de soro albumina bovina (BSA). Cem microlitros desta suspensão de células foram incubados com os anticorpos anti-glicoforina A BB515, anti-banda 3 PE, anti- $\alpha 4$ integrina APC e CD45 Pe-Cy7, por 30 minutos a 4°C no escuro. Após a marcação com anticorpos e lavagem das células, o *pellet* celular foi marcado com 7AAD para detecção da viabilidade celular. Após a marcação, as células foram analisadas no citômetro conforme o protocolo descrito por Hu *et al.* (2013) (59) e que foi adaptado para suprir as necessidades do presente estudo. Foram adquiridos 1.000.000 de eventos das amostras de células mononucleares das MO obtidas.

Para a imunofenotipagem e realização do *sorting* dos precursores eritróides terminais, foi utilizada a estratégia de *gates* em *dot-plot*, levando-se em consideração as expressões de GPA, $\alpha 4$ integrina e Band3. Após a imunofenotipagem, os resultados foram analisados no software BD FlowJo V10 para delimitação das subpopulações de precursores terminais eritróides, como mostra a ilustração adaptada de Hu *et al.* (2013) (figura 6). Conforme a expressão destes marcadores, as subpopulações dos precursores eritróides terminais foram demarcadas em I, II, III, IV, V e VI (figura 6). Destas populações, os precursores pró-eritroblasto (I), eritroblasto basofílico (II e III), policromático (IV), ortocromático (V) e reticulócitos (VI) foram isolados para determinação da frequência celular e confirmação da morfologia celular pela análise da lâmina corada, após realização do *cytospin*.

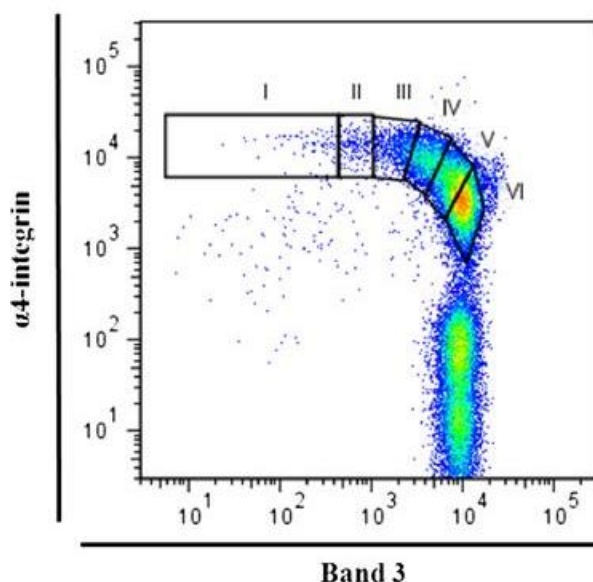


Figura 6. Dot-plot dos precursores eritróides terminais da medula óssea de indivíduo saudável. Análise realizada por meio da expressão dos marcadores $\alpha 4$ - integrina (CD49d) e Band3 (CD233). Populações: I pró-eritroblastos, II e III eritroblastos basofílicos, IV policromático, V ortocromático e VI reticulócitos da medula óssea de indivíduos normais. Imagem adaptada de Hu *et al.* (2013).

As frequências celulares de subpopulações de precursores eritróides da medula óssea de indivíduos saudáveis foram delimitadas a partir do desenho das *gates* no software FACSDiva do citômetro FACSFusionAria. As *gates* e as frequências de células GPA⁺ encontradas por HU *et al.* (2013) estão relatadas na tabela 4. As células, que se encontravam dentro das respectivas *gates*, foram sorteadas e tiveram sua morfologia e estágio de diferenciação confirmados por visualização das células nas lâminas após o *cytospin*.

Este foi o procedimento preconizado para obtenção das frequências de cada subpopulação de precursores terminais eritróides, bem como para a determinação da pureza do *sorting*. Tal análise permitiu a realização de ajustes finos nas *gates* e parâmetros usados, para melhorar o estabelecimento das frequências celulares.

Tabela 4. Frequências das subpopulações de precursores terminais eritróides oriundos da *gate* GPA⁺.

Gate GPA	92,8%
Gate PRO	1,44%
Gate BASO I	3,17%
Gate BASO II	6,17%
Gate POLI	13,6%
Gate ORTO	25,8%

GPA: glicoforina, Pro = pró-eritroblastos, Baso I e II = eritroblastos basofílicos precoce e tardio, Poli = eritroblasto policromático, Orto = eritroblasto ortocromático.

3.5.2 Padronização do *sorting* celular e pureza das populações de precursores eritróides

Foram testadas diversas estratégias de *gate* para a realização do *sorting* celular visando a melhor separação e pureza celular. As *gates* por gráfico *dot-plot* de $\alpha 4$ integrina e Band3 foram criadas manualmente com base nos resultados da ferramenta *heatmap* do software BD FlowJo V10 e da análise morfológica das lâminas de *cyto spin* confeccionadas após a realização do *sorting*.

A voltagem do *sorting* foi ajustada em 1500 volts para a separação das quatro subpopulações, concomitantemente. Após o ajuste das *gates*, foram realizados os *sortings* das quatro subpopulações celulares de progenitores eritróides. As células de cada subpopulação foram recolhidas em eppendorfs de 1,5ml contendo previamente 200 μ l de meio RPMI.

Os eppendorfs contendo as células sorteadas foram centrifugados a 450 x *g* por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido cuidadosamente com auxílio de uma pipeta automática e o pellet foi ressuspensionado em 30 μ l de PBS suplementado com 0,5% de BSA. Os eppendorfs foram mantidos refrigerados a 4°C até o momento da realização do *cyto spin*.

Após a realização do *sorting*, parte das células foi fenotipada para análise da pureza, que consistiu em avaliar se as células se encontravam dentro das respectivas *gates* em que haviam sido sorteadas.

3.6 Padronização do *cyto spin*, coloração das lâminas e análise da morfologia das subpopulações eritróides isoladas por *sorting*

3.6.1 Padronização do *cyto spin*

Uma alíquota de cada suspensão dos precursores eritróides terminais foi separada pelo *sorting* e submetida ao processo de *cyto spin*. O método de *cyto spin* (citocentrifugação) foi padronizado na centrífuga *Cytocentrifuge, Thermo Scientific*, utilizando-se as células obtidas por *sorting* das medulas ósseas controles (MOC) e medula óssea de paciente (MOP). No *cyto spin*, as lâminas silanizadas com dimensões de 26 x 76 x 1,0 (Knittel, Alemanha) continham 30 μ l da suspensão de amostras provenientes do *sorting*, as quais foram centrifugadas nas seguintes variações de velocidade e tempo:

- 1) Velocidade de 600 rpm por seis minutos;
- 2) Velocidade de 500 rpm por cinco minutos;

- 3) Velocidade de 400 rpm por quatro minutos;
- 4) Velocidade de 300 rpm por três minutos;
- 5) Velocidade de 200 rpm por dois minutos.

Estes testes possibilitaram a obtenção dos melhores parâmetros para visualizar os precursores eritróides terminais íntegros nas lâminas de *cyto spin*.

3.6.2 Padronização da coloração das células eritróides das lâminas geradas pelo *cyto spin*

Foram testadas duas colorações: 1- coloração de Leishman, 2- May-Grunwald-Giemsa (MGG). As referências das colorações foram citadas na tabela 5.

- 1) A coloração de Leishman foi feita seguindo o protocolo do fabricante, que indicava a utilização de 7-10 gotas do corante de Leishman sobre a células da lâmina. O corante foi colocado sobre a lâmina e as células foram fixadas por 6 minutos. Em seguida, cerca de 20 gotas de água destilada foram colocadas sobre o corante proporcionando a coloração das células por 12 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas na vertical, em apoio apropriado. Quando secas, as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico nos aumento de 40 x e 100 x (com imersão).

- 2) A técnica de coloração por MGG foi realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Inicialmente, as lâminas foram mergulhadas em cuba de coloração histológica contendo o corante May-Grunwald concentrado por 5 minutos. Após este tempo, as lâminas foram transferidas para a cuba contendo May-Grunwald diluído em água destilada (1:2) e ficaram imersas por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram imersas no corante Giemsa diluído em água destilada (1:10), por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos e foram secas na vertical, em apoio apropriado. Quando secas, as lamínulas foram colocadas sobre as células e 24 horas depois, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico nos aumentos de 40x e 100x (com imersão).

Tabela 5. Corantes utilizados nos testes de coloração das células das lâminas do *cytospin*

Colorações	Empresa	Referências	Lote
Leishman	NewProv	PA209	26422
May-Grunwald	Sigma	63590	BCBR1428V
Giemsa	Gibco	10092-013	1356260

3.6.3 Análise morfológica das subpopulações de células eritróides isoladas por *sorting*

A avaliação morfológica das células foi realizada em microscópio óptico comum. Como exemplo de análise realizada, a figura 7 ilustra um dos resultados obtidos.

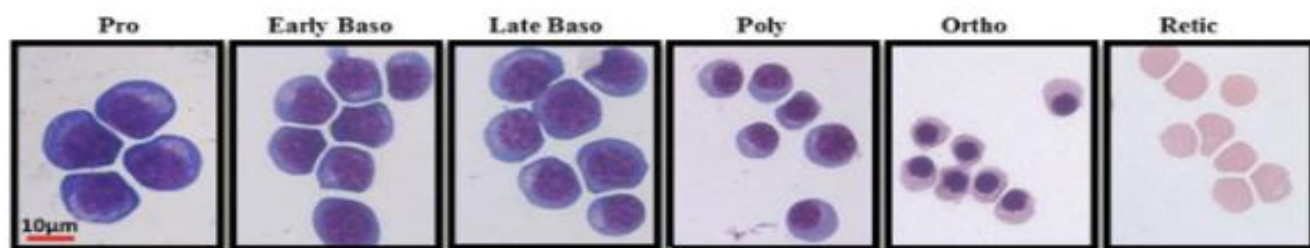


Figura 7. Morfologia dos precursores eritróides da medula óssea. Células da MO submetidas ao cytopsin e coradas com May-Grunwald-Giemsa. Pro = pró-eritroblastos, *Early* e *late* Baso = eritroblastos basofílicos precoce e tardio, Poly = eritroblasto policromático, Ortho = eritroblasto ortocromático; Retic = reticulócitos. Imagem adaptada de Hu *et al.* (2013).

Para a execução do protocolo de isolamento das subpopulações de precursores terminais eritróides e citometria de fluxo (análise e *sorting*), foi necessário realizar modificações e adaptações no protocolo original, estabelecido por HU *et al.* (2013). Foi necessário, também, padronizar técnicas de criopreservação e descongelamento das amostras, uma vez que o recebimento das medulas ósseas era esporádico e fora do horário de expediente da “facility” de citometria de fluxo (metodologias citadas anteriormente, nos itens 3.2.1, 3.3, 3.5 e 3.6).

3.7 Análise estatística

A comparação dos dados das frequências de subpopulações de precursores terminais eritróides entre os diferentes grupos de pacientes com NMP e controle foi realizada pelo teste estatístico de Mann-Whitney. As diferenças dos valores entre os grupos analisados, foram consideradas significativas para valores de p menores que 0,05. Para a realização dos testes estatísticos, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.0.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas e controles

O grupo controle foi composto por seis amostras, com faixa etária de 5 a 58 anos, mediana de 25 anos, composto por quatro indivíduos do sexo feminino e dois do sexo masculino. Quanto a cor da pele, foram analisadas cinco amostras de doadores de cor branca e de um doador de cor parda (tabela 6).

As amostras de medula óssea de pacientes diagnosticados como Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MF) foram obtidas no ambulatório do serviço de Hematologia do HCFMRP-USP. Os controles foram obtidos de amostras provenientes de medulas ósseas de doadores de transplante de medula óssea do HCFMRP-USP.

Foram avaliadas as amostras de medula óssea de cinco pacientes com PV, com faixa etária de 27 a 76 anos, mediana de 53 anos, sendo um do sexo feminino e quatro do sexo masculino, quatro indivíduos eram brancos e um pardo. Quatro amostras de medula óssea de pacientes com TE, com faixa etária de 34 a 83 anos, mediana de 69 anos, sendo um do sexo feminino e três do sexo masculino, três indivíduos eram brancos e um negro. Três amostras de medula óssea de paciente com MF, brancos, com faixa etária de 51 a 66 anos, mediana de 66 anos, sendo um indivíduo do sexo feminino e dois do sexo masculino (tabela 7).

As medulas ósseas dos controles (MOC) foram utilizadas nos experimentos de titulação de anticorpos (CD45, CD235a, CD49d e Band3), calibração do citômetro, padronização da estratégia de *gates*, *sorting* celular, padronização do *cyto spin*, estabelecimento das frequências dos progenitores eritróides terminais, avaliação da intensidade de fluorescência (CD49d, BAND3 e CD235a) nos progenitores eritróides terminais e experimentos de clusterização das subpopulações de progenitores eritróides em análises *in silico*.

As medulas de pacientes com NMP (MOP) foram utilizadas para os experimentos de padronização, analisadas por imunofenotipagem para o estabelecimento das frequências dos precursores eritróides terminais, determinação da intensidade de fluorescência dos marcadores, *sorting* das subpopulações dos progenitores terminais eritróides para análise morfológica com o *cyto spin* seguido de coloração e nas análises *in silico*.

Tabela 6. Características demográficas dos controles.

Amostra de medula óssea	Idade (anos)	Gênero
MOC 107	43	F
MOC 114	26	F
MOC 115	24	F
MOC 116	58	M
MOC 117	18	M
MOC 119	5	F

MOC: medula óssea controle; F: feminino; M: masculino;

Tabela 7. Características demográficas e clínico-laboratoriais dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas.

Amostra de medula óssea	Doença	Idade (anos)	Gênero	Status Mutacional
MOP 71	PV	66	F	JAK2+
MOP 87	PV	53	M	JAK2-
MOP 89	PV	31	M	JAK2-
MOP 91	PV	27	M	JAK2-
MOP 93	PV	76	M	ND
MOP 72	TE	69	M	JAK2+
MOP 73	TE	34	M	JAK2-
MOP 75	TE	69	F	JAK2-
MOP 81	TE	83	M	JAK2-
MOP 88	MF	66	F	ND
MOP 94	MF	66	M	ND
MOP 104	MF	51	M	ND

MOP: Medula Óssea de Paciente; PV: Policitemia Vera; TE:Trombocitemia Essencial; MF: mielofibrose; F: Feminino, M: Masculino, JAK2: Mutação Janus Kinase V617F; ND: Parâmetro Clínico-Laboratorial ainda não determinado

4.2 Isolamento das células mononucleares da medula óssea (BMNC) por gradiente de Ficoll-Hypaque

Conforme descrito no item 3.2.1.1 dos material e métodos, dois métodos de isolamento das células mononucleares da medula óssea foram testados.

O método 1 permitiu a obtenção de $2,5 \times 10^7$ células mononucleares por ml com viabilidade celular de 98%. O método 2 proporcionou obtenção de $3,7 \times 10^7$ células mononucleares com viabilidade de 98%. Portanto, devido ao melhor rendimento celular, o presente trabalho utilizou o método 2 para realizar a separação das células mononucleares das medulas ósseas dos controles e dos pacientes com NMP.

4.3 Criopreservação das células mononucleares da medula óssea (BMNC)

Conforme descrito no item 3.2.1.2 da seção material e métodos, quatro métodos de criopreservação das células mononucleares da medula óssea foram testados.

O método A consistiu na utilização da solução criopreservante simples (DMSO com SFI) sem a utilização do recipiente de congelamento gradual (Mr. Frosty), o método B utilizou a solução de criopreservação simples (DMSO com SFI) com o recipiente de congelamento gradual (Mr. Frosty), o método C fez uso do coquetel criopreservante (DMSO com SFI, ACD-A e Voluven 6%) sem o recipiente de congelamento gradual (Mr. Frosty) e o método D utilizou o coquetel criopreservante (DMSO com SFI, ACD-A e Voluven 6%) com o recipiente de congelamento gradual (Mr. Frosty).

A marcação das células de MO pelo 7AAD proporcionou a mensuração da viabilidade celular das células mononucleares frente aos métodos de criopreservação testados. A porcentagem de células mortas nas amostras analisadas variou de 6,20% a 10,40%. Foi possível verificar que os métodos que utilizaram o recipiente de congelamento gradual (Mr. Frosty) foram os que apresentaram a menor porcentagem de morte, independente da solução de criopreservação utilizada (figura 8).

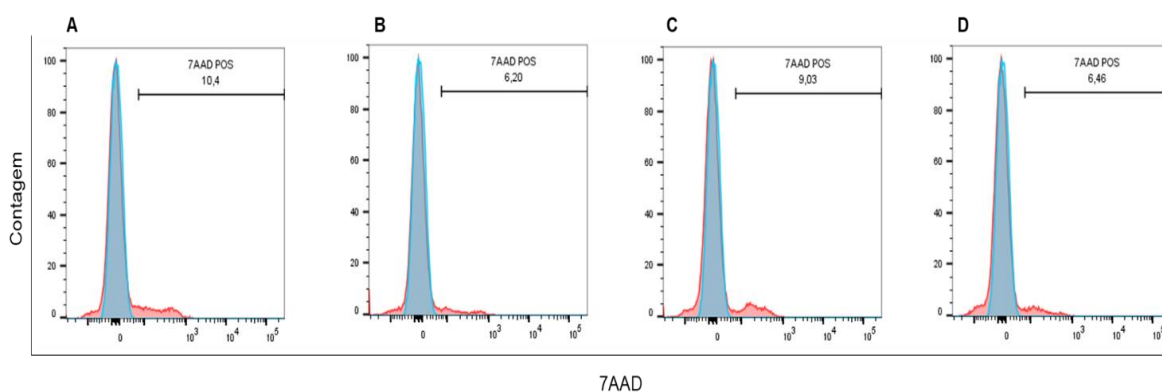


Figura 8. Histogramas de fluorescência do marcador de viabilidade 7AAD demonstrando a porcentagem de células mortas nos quatro testes de congelamentos realizados. A - Teste de congelamento com soro fetal inativado e DMSO sem mister frosty. B - Teste de congelamento com soro fetal inativado e DMSO com mister frosty. C - Teste de congelamento com soro fetal inativado, DMSO, Voluven 6% e ACD-A sem mister frosty. D - Teste de congelamento com soro fetal inativado, DMSO, Voluven (6%) e ACD-A, com mister frosty. O histograma em azul representa o controle negativo de marcação para o 7AAD; O histograma vermelho representa as células marcadas com 7AAD, células mortas.

A porcentagem de morte celular foi de 10,40% para o ensaio A, 6,40% para o ensaio B, 9,03% para o ensaio C e 6,46% para o ensaio D.

A viabilidade das células criopreservadas variou de 90,80% a 92,85% entre os métodos de congelamento utilizados (figura 9).

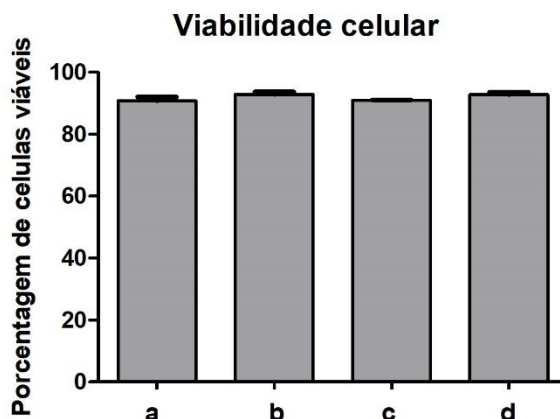


Figura 9. Porcentagem de viabilidade celular obtida nos quatro testes de congelamento que foram realizados. a - Teste de congelamento com soro fetal inativado e DMSO sem mister frosty. b - Teste de congelamento com soro fetal inativado e DMSO com mister frosty. c - Teste de congelamento com soro fetal inativado, DMSO, Voluven 6% e ACD-A sem mister frosty. d - Teste de congelamento com soro fetal inativado, DMSO, Voluven (6%) e ACD-A, com mister frosty.

Foram obtidas as porcentagens de apoptose para a população GPA positiva presentes nas células mononucleares das MO por meio da marcação de anexina V (quadrante Q1). As células foram conjuntamente marcadas com 7AAD, sendo possível observar a porcentagem de células mortas (quadrante Q2) (figura 10). As células GPA positivas viáveis e não apoptóticas podem ser observadas no quadrante Q4 (figura 10).

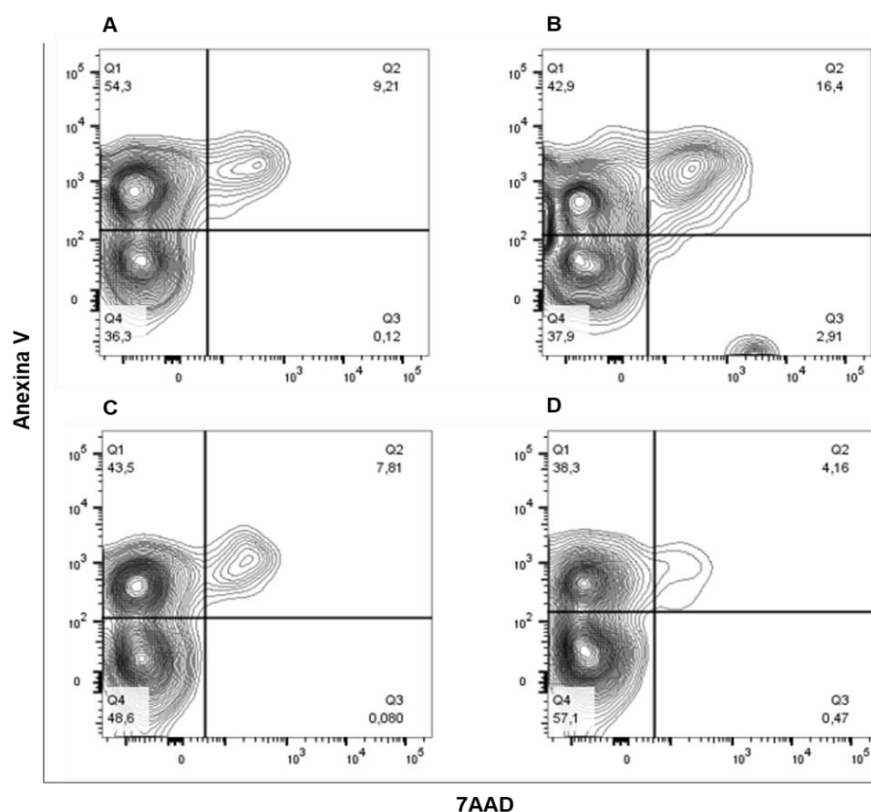


Figura 10. Dot-plots da análise de Anexina V por 7AAD mostrando a porcentagem de células em processo de apoptose nos quatro testes de congelamento que foram realizados. A - Teste de congelamento com soro fetal inativado e DMSO sem mister frosty. B - Teste de congelamento com soro fetal inativado e DMSO com mister frosty. C - Teste de congelamento com soro fetal inativado, DMSO, Voluven 6% e ACD-A sem mister frosty. D - Teste de congelamento com soro fetal inativado, DMSO, Voluven (6%) e ACD-A, com mister frosty. O quadrante Q1 representa a porcentagem de células eritróides que estão em processo de apoptose. O quadrante Q2 representa a porcentagem de células eritróides que estão em processo de morte celular. O quadrante Q3 representa a porcentagem de células com baixa viabilidade. No quadrante Q4 é possível notar a porcentagem de células eritróides e que não estão em processo de apoptose e nem mortas.

A solução de criopreservação 1 (DMSO com SFI) utilizada no ensaio A e B (item 3.2.1.2, material e métodos) foi a que apresentou a maior porcentagem de apoptose na linhagem eritróide, independente da utilização do recipiente de congelamento gradual, visto que as porcentagens de células anexina V positivas foram de 54,30% para A e 42,90% para B, além da porcentagem de células mortas, 9,21% e 16,40%, respectivamente para os métodos A e B. A porcentagem de células GPA⁺ viáveis e não apoptóticas foi de, respectivamente, 36,30% e 37,90% para os métodos A e B (figura 10).

Com a utilização da solução de criopreservação 2 (DMSO com SFI, ACD-A e Voluven 6%), como descrito no item 3.2.1.2 dos Materiais e Métodos, obteve-se nos ensaios C e D porcentagens mais elevadas de células GPA positivas viáveis e não apoptóticas, sendo respectivamente 48,6% e 57,10% para os ensaios C e D. Neste

último ensaio, a utilização do recipiente de congelamento gradual ajudou a melhorar a viabilidade e a diminuir a apoptose nas células eritróides (GPA+) (figura 10).

A média da porcentagem de apoptose para a população GPA+ das MO foi: 54,30%, 42,90%, 43,50% e 38,30%, respectivamente para os ensaios A, B, C e D (figura 11).

Porcentagem de apoptose na população GPA+

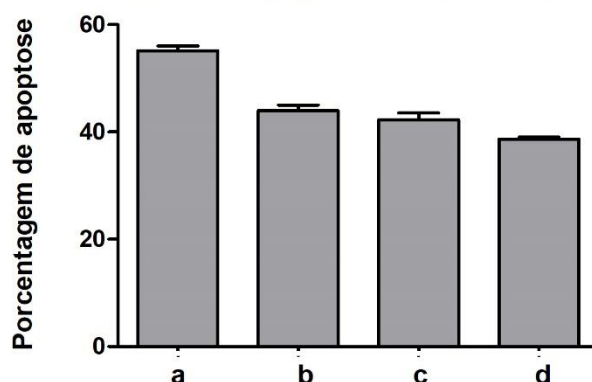


Figura 11. Porcentagem de apoptose na população GPA positiva nos quatro testes de congelamento que foram realizados. a - Teste de congelamento com soro fetal inativado e DMSO sem mister frosty. b - Teste de congelamento com soro fetal inativado e DMSO com mister frosty. c - Teste de congelamento com soro fetal inativado, DMSO, Voluven 6% e ACD-A sem mister frosty. d - Teste de congelamento com soro fetal inativado, DMSO, Voluven (6%) e ACD-A, com mister frosty.

O método D, que consistia na utilização da solução de criopreservação (DMSO com SFI, ACD-A e Voluven 6%) e Mr. Frosty foi o escolhido para a criopreservação das MO de doadores saudáveis e dos pacientes com NMP do presente estudo, pois apresentou os melhores resultados de viabilidade, bem como a menor porcentagem de apoptose das células dos precursores eritróides terminais.

Em conclusão, após padronização, o presente trabalho empregou o método D de criopreservação.

4.4 Descongelamento das células mononucleares da medula óssea (BMMC)

Como descrito anteriormente no item 3.2.1.3 da seção Material e Métodos, foram realizados três testes de descongelamento, nomeados de método 1, 2 e 3. O método 1 se baseava no descongelamento rápido das amostras de BMMC, o método 2 na utilização do gotejamento gradual de meio RPMI sobre as células e, no método 3, as células foram descongeladas e mantidas em estufa por 24 horas.

As células de MO descongeladas após os diferentes procedimentos foram incubadas com 7AAD, marcador de viabilidade. A análise com este marcador tornou possível obter a porcentagem de células viáveis após o final de cada método de descongelamento (figura 12).

As porcentagens de morte celular para os métodos 1, 2 e 3 foram de 9,12%, 6,90% e 16,20%, respectivamente (figura 12). Sendo assim, o método 2, que consistia no descongelamento por gotejamento de meio RPMI, foi o que obteve a maior viabilidade celular. Portanto, foi o método eleito para o descongelamento das amostras de MO dos controles saudáveis e dos pacientes com NMP no presente trabalho.

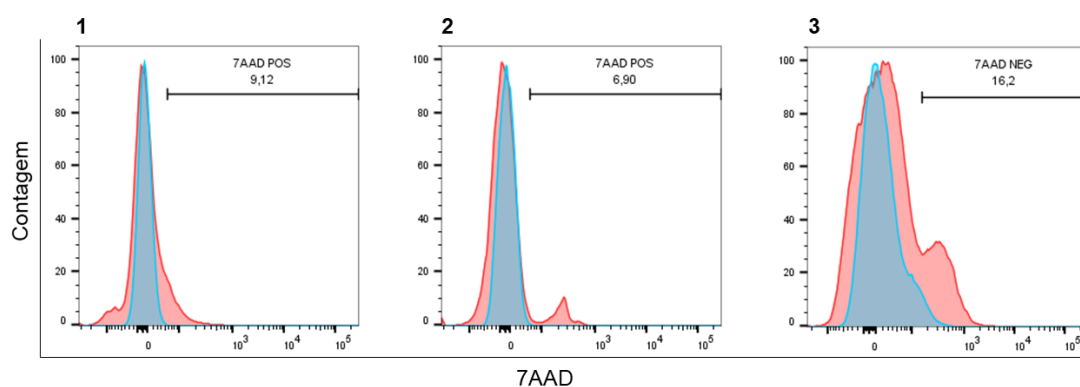


Figura 12. Histogramas de fluorescência do marcador de viabilidade 7AAD mostrando a porcentagem de células mortas nos três testes de descongelamento realizados. 1- Descongelamento rápido. 2 – Descongelamento por gotejamento de meio RPMI. 3 - Descongelamento com estabilização celular em estufa a 37 °C . O histograma em azul representa o controle negativo de marcação para o 7AAD, enquanto o histograma vermelho representa as células marcadas positivas para 7AAD.

4.5 Cytospin e coloração das lâmina do *sorting* dos precursores terminais eritróides

O *cytospin* foi padronizado com as subpopulações de precursores eritróides obtidos das *gates* do *sorting*. Foram testadas variações na velocidade e no tempo do *cytospin*, como descrito no item 3.6.1 da seção Material e Métodos.

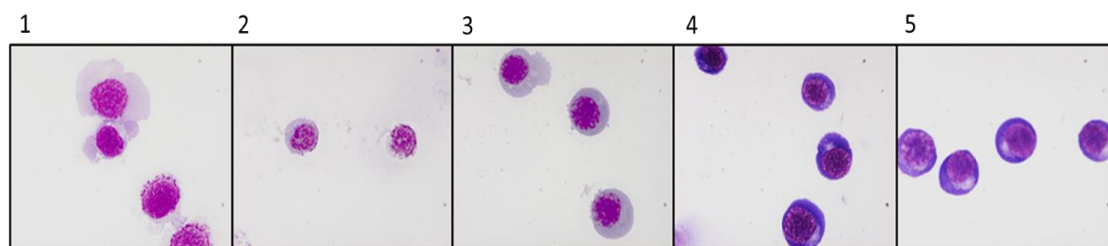


Figura 13. Micrografia das subpopulações terminais eritróides obtidas após teste de diferentes velocidades e tempos empregadas na padronização do *cytopsin*. 1- velocidade de 600 rpm por 6 minutos. 2- velocidade de 500 rpm por 5 minutos. 3- velocidade de 400 rpm por 4 minutos. 4- velocidade de 300 rpm por 3 minutos. 5- velocidade de 200 rpm por 2 minutos.

Os menores valores dos parâmetros de velocidade de centrifugação e tempo empregados no *cytopsin* conduziram aos melhores protocolos de análise morfológica das células eritróides nas lâminas (figura 13).

Nas rotações mais elevadas, como em 600 rpm, 500 rpm e 400 rpm, as células apresentaram aspectos de compressão, rompimento celular, espalhamento do citoplasma e do núcleo (figura 13– 1,2 e 3). Nas velocidades de 300 rpm e 200 rpm, pôde ser observado que as células não apresentavam aspecto de compressão (figura 13 - 4 e 5). Na rotação de 300 rpm, as células ficaram mais difusas na lâmina, o que não ocorreu na rotação de 200 rpm.

Assim sendo, para a metodologia de *cytopsin* ideal, a velocidade e tempo escolhidos para fixar as células dos precursores terminais eritróides nas lâminas foi aquela cujos parâmetros de velocidade e tempo foram de 200 rpm por 2 minutos.

Foram testadas duas colorações distintas para corar os precursores terminais eritróides fixados nas lâminas do *cytopsin*, como descrito no item 3.6.2 da seção Material e Métodos (figura 14).

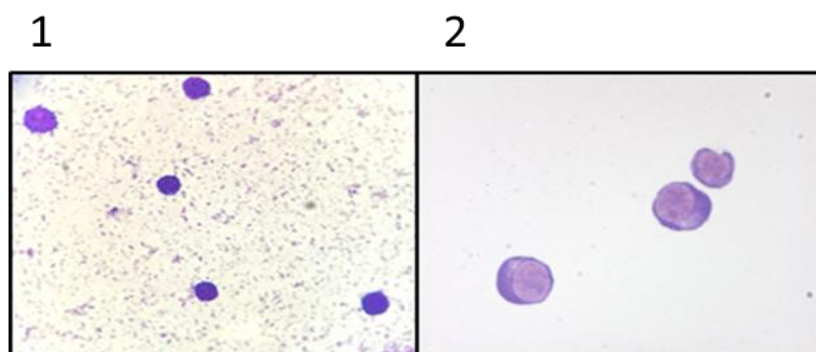


Figura 14. Micrografias das subpopulações terminais eritróides nas diferentes colorações testadas. 1-Micrografia das subpopulações terminais eritróides coradas com o corante de Leishman. 2- Micrografia das subpopulações de precursores eritróides coradas com a coloração de May-Grunwald-Giemsa.

A coloração de Leishman proporcionou cor mais acentuada das células e grande *background*, o que prejudicou a distinção da delimitação entre o núcleo e o citoplasma. Este artefato impossibilitou a caracterização morfológica correta dos precursores terminais eritróides (figura 14, número 1).

A coloração de May-Grunwald-Giemsa (MGG) promoveu a melhor coloração celular, permitindo a identificação e o estadiamento das subpopulações eritróides terminais (figura 14, número 2). Portanto, neste trabalho, a coloração MGG foi a escolhida para corar as lâminas de *cytospin* das subpopulações de precursores eritróides terminais.

4.6 Imunofenotipagem e *sorting* dos precursores eritróides terminais nas medulas ósseas controle

4.6.1 Controle de qualidade das amostras de citometria de fluxo

O controle de qualidade das amostras analisadas por de citometria de fluxo foi realizado utilizando o *plugin* FlowAI do software FlowJo v10.

O FlowAI gera relatórios de controle de qualidade que indicam a qualidade da amostra que foi adquirida, revelando os eventos que estão dentro do primeiro desvio padrão para os parâmetros avaliados, como tamanho, complexidade e fluorescência das amostras (98) (figura 15).

O relatório separa os eventos adquiridos em cinza (eventos de boa qualidade) e vermelho (eventos de qualidade ruim) (figura 15A). Os parâmetros analisados (FSC, SSC e fluorescência) são plotados em gráficos individuais mostrando o comportamento do sinal de cada parâmetro (figura 15B). Os eventos são considerados como bons quando estiverem dentro da faixa amarela. Outro parâmetro que pode ser analisado é o fluxo de eventos adquiridos por segundo (figura 15C), no qual observa-se que os eventos ruins estão marcados por círculos verdes, sinalizando que estão fora da faixa de normalidade (*outliers*) e não devem ser considerados na análise (98).

A aplicação do *plugin* foi feita no estágio inicial da análise de dados e, a partir destes dados (relatórios), apenas os eventos de alta qualidade foram analisados.

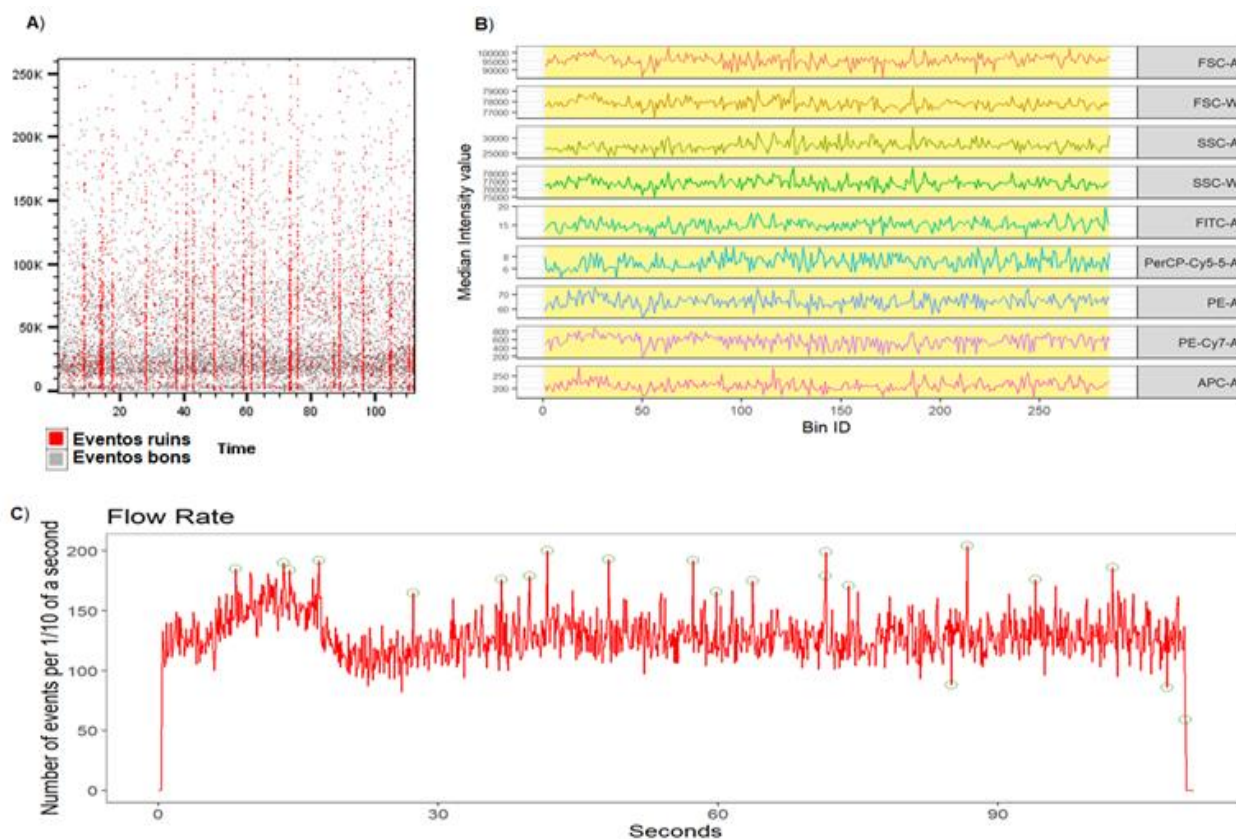


Figura 15. Relatório disponibilizado pelo *plugin* FlowAI após a realização do controle de qualidade automático dos arquivos de citometria de fluxo. A - *Dot-plot* de SSC-A por Tempo, mostrando os eventos bons e ruins da análise. B - Detecção dos pontos de mudança de intensidade de sinal ao longo do tempo. As regiões destacadas em amarelo são as que apresentam a maior estabilidade e, portanto, são classificadas como de alta qualidade para as análises. Neste caso, todos os parâmetros estavam dentro da região de estabilidade. C - Flutuações de fluxo do experimento. As anomalias estão destacadas pelos círculos verdes e são correspondentes as regiões que aparecem em vermelho na imagem A.

4.6.2 Normalização do número de eventos das amostras de citometria de fluxo

A normalização do número de eventos das amostras de MOC foi realizada em virtude da variabilidade da celularidade nas amostras de medulas ósseas que foram analisadas, pois em algumas amostras não foi possível adquirir 1.000.000 de eventos. Para normalizar o número de células analisadas nas amostras de MOC, foi utilizado o *plugin DownSample* do software FlowJo v10, o qual permitiu a seleção de 50.000 eventos (*gate* SSC por FSC) de cada tubo das amostras de MOC. Este número de 50.000 eventos é o máximo que o *plugin DownSample* permite selecionar. Portanto para a análise realizada, foram utilizados 50.000 eventos da população total de células das BMMC.

4.6.3 Estratégia de *gates* utilizada para obtenção do gradiente de diferenciação terminal dos precursores eritróides nas medulas ósseas controle

A estratégia de *gates* para a imunofenotipagem dos progenitores terminais eritróides foi estabelecida conforme o protocolo descrito por Hu *et al.* (2013) (59).

Inicialmente, foi confeccionada a *gate* delimitando a região na qual as células eritróides diferenciadas e indiferenciadas deveriam estar no *dot-plot*, obtido pela análise das células por *side scatter-area* (SSC-A) e *forward scatter-area* (FSC-A, figura 16A). Em seguida, foi feita a exclusão de *doublets*, que são células justapostas ou agregadas que podem ser consideradas como um único evento pelo citômetro no *dot-plot* gerado com análise do *forward scatter-weight* (FSC-W) e *forward scatter-area* (FSC-A) (figura 16B).

Após a exclusão dos *doublets*, foram selecionadas as células viáveis (negativas para o 7AAD, figura 14C) e, na sequência, no *dot plot* SSC-A por CD45 (figura 16D), foi selecionada a população celular negativa para CD45 (marcador pan-leucocitário). Posteriormente, no gráfico SSC-A por glicoforina (GPA), foi selecionada a população positiva para o marcador GPA (figura 16E). As células positivas para GPA e negativas para CD45 (marcador de leucócitos) são designadas como população eritróide e foram analisadas quanto a positividade para CD49d por Band3 em *dot plot* (figura 16F), que representa a população de progenitores eritróides terminais das amostras de MOC e MOP. Este processo de demarcação das *gates* supracitadas está apresentado, passo a passo, na figura 16.

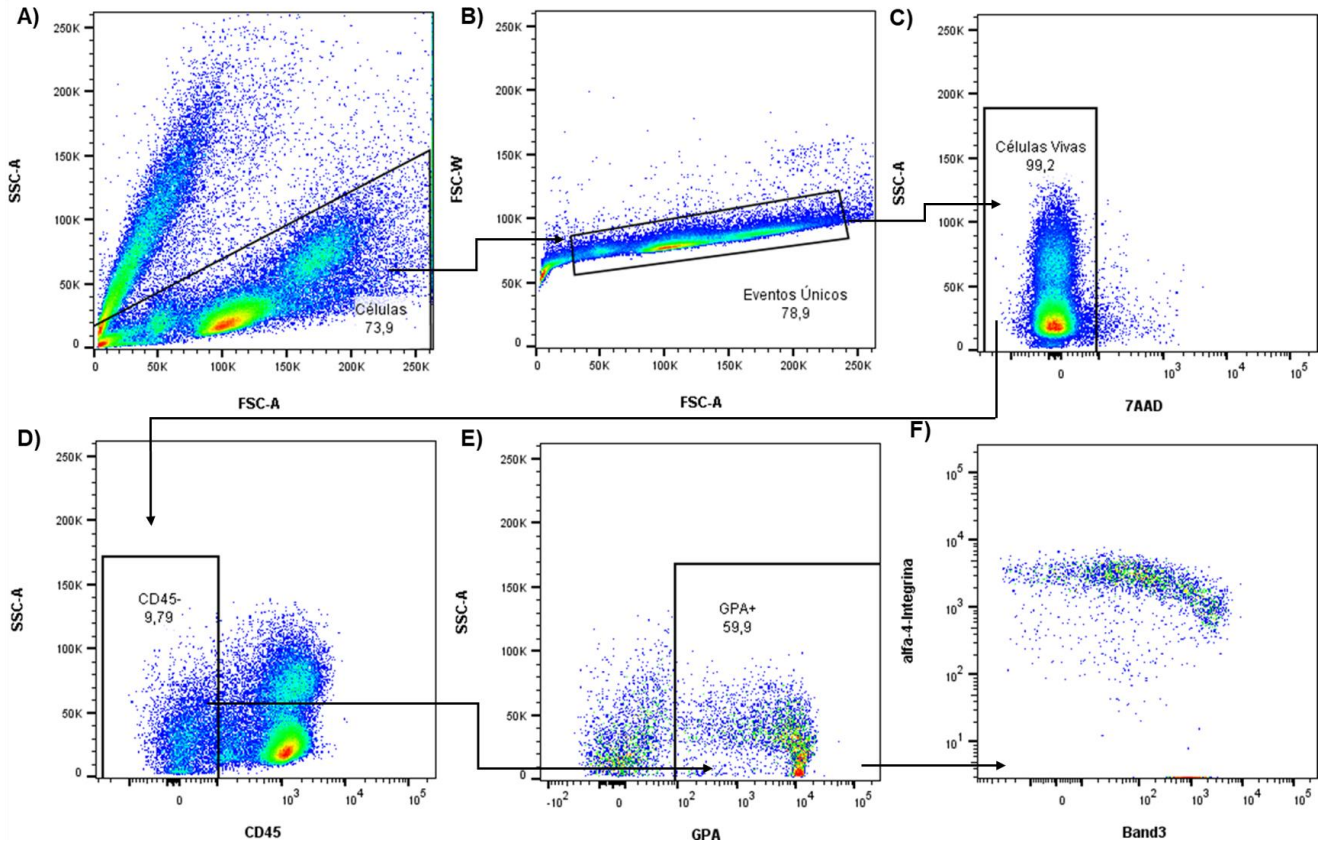


Figura 16. Estratégia de *gates* empregada para a análise imunofenotípica e quantificação da frequência das células progenitoras eritróides terminais nas medulas ósseas. **A** – *Gate* das células da medula óssea, delimitando no dot-plot a região de células eritróides em SSC-A por FSC-A. **B** - *Gate* de eventos únicos no dot-plot obtido pela análise dos parâmetros FSC-W por FSC-A. **C** - *Gate* de células viáveis. **D** - *Gate* de células negativas para CD45 no dot-plot obtido pela análise das células por SSC-A por CD45. **E** - *Gate* em células GPA positivas, representando toda população eritróide terminal no dot-plot obtido por análise dos parâmetros SSC-A por GPA, **F** – *dot-plot* dos progenitores eritróides terminais CD49d por Band3. As setas em preto mostram a sequência das células analisadas (eventos), desde a seleção das células por SSC por FSC até a obtenção do gradiente de diferenciação terminal eritróide, conhecido como *waterfall*.

4.6.4 Perfil imunofenotípico dos marcadores CD49d e Band3 nas medulas ósseas dos controles

O perfil imunofenotípico das MOC foi obtido pela confecção do *dot-plot* de CD49d por Band3. A média das frequências celulares encontradas nos *dot-plots* CD49d por Band3 das amostras de MOC foi de 2800 eventos em 50.000 eventos de BMMC. O perfil imunofenotípico foi semelhante para todas as MOC fenotipadas (figura 17).

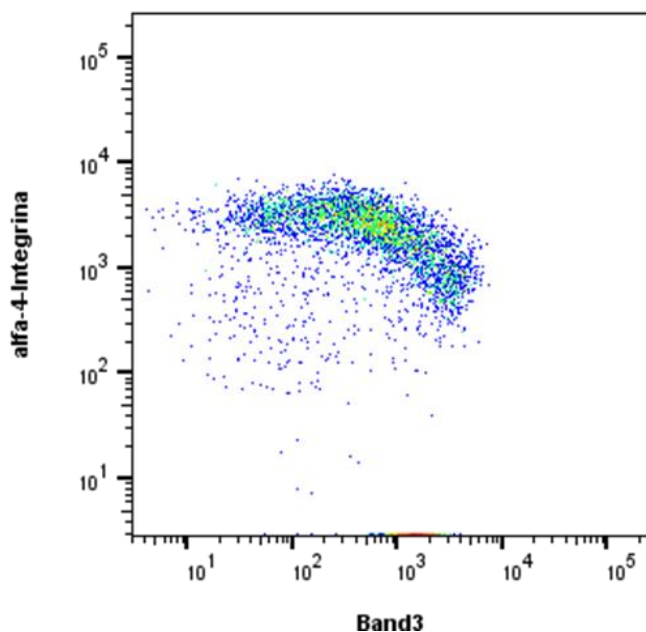


Figura 17 – Perfil imunofenotípico dos progenitores eritróides terminais de medula óssea de um controle, empregando os marcadores CD49d e Band3. Esta figura representa o resultado de um perfil imunofenotípico de amostra de medula óssea de controle.

Para confirmar a origem das células no *dot-plot* CD49d por Band3, ou seja, se correspondiam aos progenitores terminais eritróides, foi utilizada a “ferramenta” “*backgating*” do software FlowJo v10. Esta ferramenta permitiu a localização exata dos progenitores terminais eritróides em todos os *dot-plots* da análise (figura 17). Assim, é possível notar que o gradiente de diferenciação terminal eritróide (CD49d por Band3) está presente em toda a *gate* de células GPA+, na *gate* de células CD45 negativas e as células estão totalmente dentro da *gate* de células viáveis (figura 17).

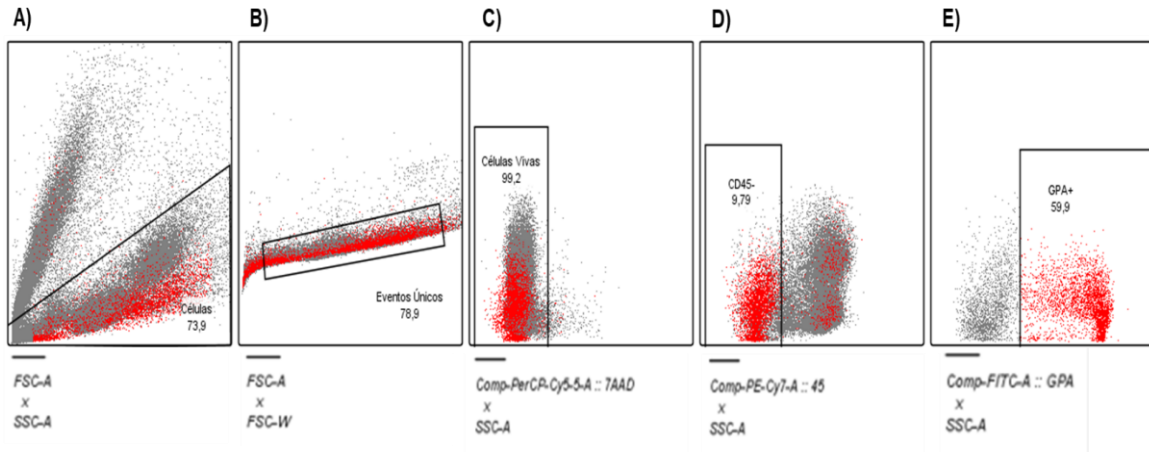


Figura 18. Estratégia de *backgating* utilizada para identificar e localizar as células eritróides terminais nos *dot-plots*. Em vermelho, destacam-se as células eritróides nos *dot-plots*. **A** – Células eritróides analisadas e destacadas no *dot-plot* de SSC-A por FSC-A. **B** - Células eritróides analisadas e destacadas no *dot-plot* de FSC-W por FSC-A para exclusão de doublets. **C** - Células eritróides analisadas e destacadas no *dot-plot* de SSC-A por 7AAD. **D** - *Dot-plot* da *gate* de células negativas para CD45, SSC-A por CD45. **E** - Células eritróides analisadas e destacadas no *dot-plot* das células GPA positivas.

Após a confirmação do tipo celular pela estratégia de *backgating*, foram avaliadas as expressões dos marcadores GPA, CD49d e Band3 por *heatmap* no software FlowJo v10 a partir do *dot-plot* CD49d por Band3. Esta ferramenta auxiliou na demarcação do gradiente de diferenciação terminal eritróide e permitiu a criação das *gates* para a realização do *sorting*, auxiliando no estabelecimento das frequências dos progenitores eritróides nas MOC e MOP (figura 19).

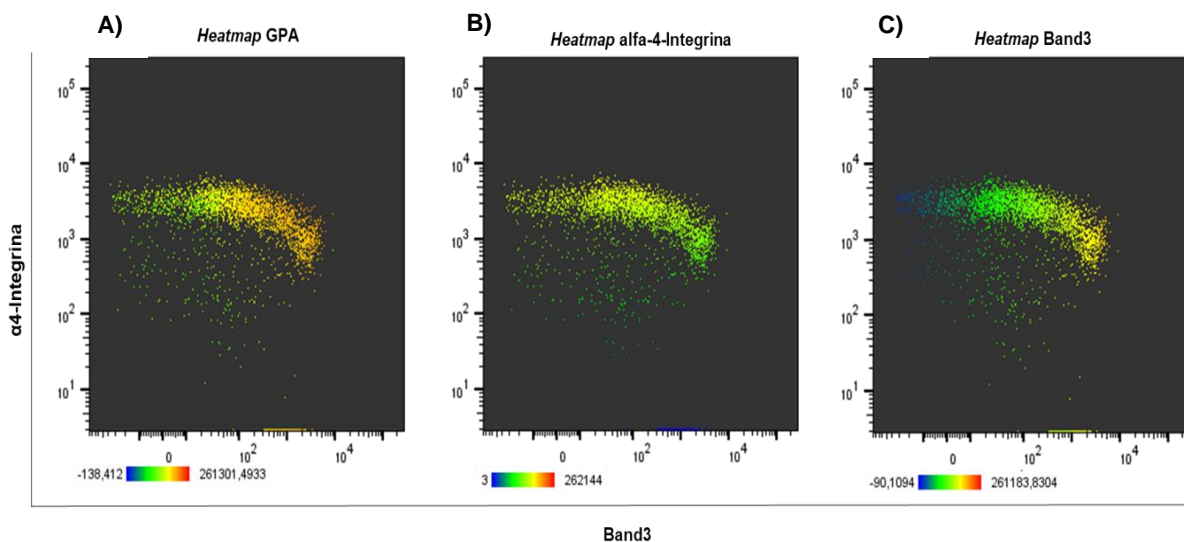


Figura 19. Heatmaps da expressão dos marcadores da linhagem eritróide utilizados para realizar a imunofenotipagem e o *sorting* das populações de progenitores eritróides terminais. **A** - *Heatmap* de GPA na população de progenitores eritróides terminais. **B** - *Heatmap* de Band3 na população de progenitores eritróides terminais. **C** - *Heatmap* de $\alpha 4$ -Integrina na população de progenitores eritróides terminais.

No *heatmap* da expressão de GPA, na população de progenitores terminais eritróides (figura 19A), observa-se que a expressão de GPA, na população positiva para CD49d (alfa 4-integrina) é baixa (verde), caracterizando as populações de pro-eritroblastos e eritroblastos basofílicos. Conforme a diferenciação eritróide acontece, observa-se o aumento na expressão de Band3 e GPA (alaranjada) nas células mais diferenciadas, caracterizando os eritroblastos policromáticos e ortocromáticos.

No *heatmap* de CD49d (alfa 4-integrina) pode ser notada a elevada expressão deste marcador (amarelo) na população inicial do gradiente maturativo, uma vez que a população em questão é a população CD49d positiva. Conforme ocorrem a maturação e o aumento da expressão de Band3, a expressão de CD49d diminui (verde) nas subpopulações mais diferenciadas (figura 19B).

Por fim, no *heatmap* de Band3, considerado o mais importante da análise por separar as subpopulações eritróides terminais, foram estabelecidas as estratégias de *gate* do *sorting* das células eritróides terminais. Assim sendo, neste *heatmap*, na população positiva para CD49d, observa-se expressão muito baixa de Band3 (azul), indicando que nesta região está presente a subpopulação de pro-eritroblastos. Conforme ocorre a diferenciação, os progenitores eritróides terminais passam a apresentar aumento de Band3, delimitando a região na qual estão os eritroblastos basofílicos compreendidos nas regiões em verde escuro e verde claro. O aumento da expressão de Band3 (amarelo esverdeado) acompanha as etapas de maturação eritróide, ou seja, quanto maior marcação de banda 3, maior é a maturação celular. Desta forma, a região onde se inicia a coloração amarela está presente a subpopulação de eritroblastos policromáticos. Por fim, no gradiente de diferenciação terminal (amarelo escuro) fica delimitada a população de eritroblastos ortocromáticos (figura 19C).

4.6.5 Isolamento das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos controles

O isolamento das subpopulações por citometria de fluxo foi realizado com o objetivo de quantificar as frequências destas células de progenitores eritróides nas medulas ósseas de pacientes e controles. As estratégias de *gate* foram ajustadas manualmente durante a avaliação dos *heatmaps* de Band3 (figura 20). Este ajuste foi realizado para todas as medulas ósseas deste estudo antes da realização do *sorting*.

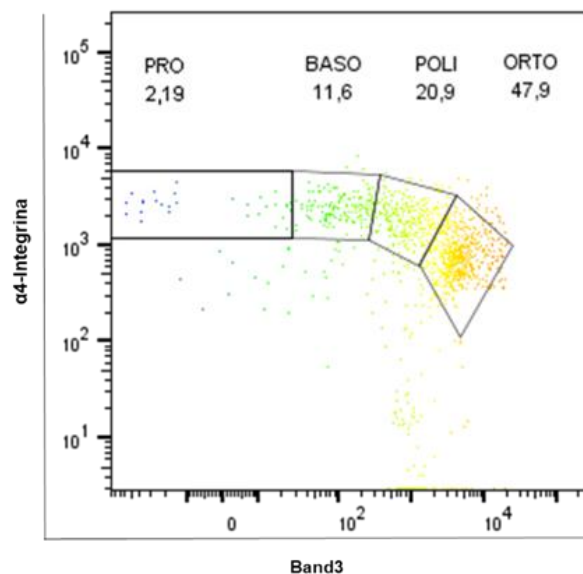


Figura 20. Exemplo de ajuste manual das *gates* para realização do *sorting* das populações de progenitores eritróides terminais das medulas ósseas. A) *Heatmap* de medula óssea com as *gates* ajustadas manualmente antes da realização do *sorting* e quantificação da frequência dos progenitores eritróides terminais, *dot-plot* dos parâmetros CD49d por Band3 em pseudocolor da análise de medula óssea com a delimitação das subpopulações e frequências. PRO–pró-eritroblasto, BASO–eritroblasto basofílico I e II, POLI–eritroblasto policromático e ORTO – eritroblasto ortocromático. Os números abaixo do nome da população celular indicam as percentagens de células de cada subpopulação analisada.

Foram isoladas por citometria de fluxo quatro populações dos progenitores eritróides terminais, correspondendo a PRO, BASO (I e II), POLI e ORTO. Os eritroblastos basofílicos I e II foram acondicionados na mesma *gate*, visto que o citômetro FACS Aria Fusion realiza, simultaneamente, apenas o isolamento de no máximo quatro subpopulações.

As populações dos progenitores eritróides terminais foram fixadas em lâminas silanizadas por meio do método de *cytospin* e coradas com May-Grunwald-Giemsa (MGG) para análise morfológica em microscópio óptico, com a finalidade de estabelecer a qualidade e eficácia da separação das subpopulações de precursores terminais eritróides em cada amostra.

Os progenitores terminais eritróides nas lâminas foram fotografados durante a visualização em microscópio óptico no aumento de 100X com óleo de imersão. A figura 21 ilustra exemplos de resultados de análises obtidos das amostras de medulas ósseas dos controles, indicando que as *gates* para determinação das frequências celulares são adequadas para separar as células e quantificar as frequências de cada subpopulação nos controles e pacientes.

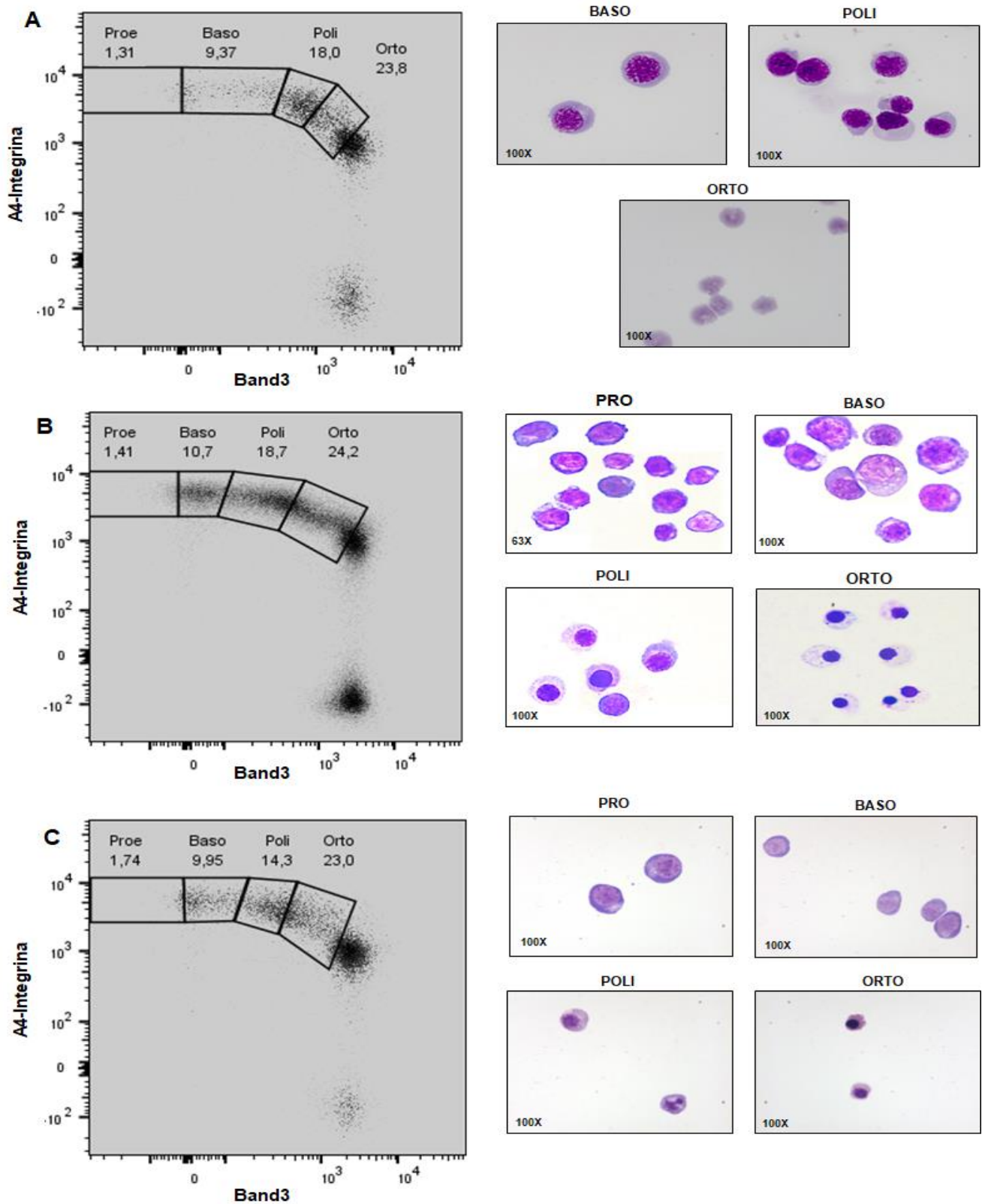


Figura 21. Dot-plots da análise dos parâmetros CD49d e Band3 com as *gates* utilizadas para realização do *sorting* celular e documentação das células eritróides por cytopsin. A - Medula óssea com as *gates* ajustadas para realização do *sorting*. Não foram encontrados pró-eritroblastos na microscopia. B - Medula óssea com as *gates* ajustadas para realização do *sorting*. C - Medula óssea com as *gates* ajustadas para realização do *sorting* PRO/PROE - pró-eritroblasto, BASO- eritroblasto basofílico, POLI- eritroblasto policromático, ORTO- eritroblasto ortocromático. Os números abaixo do nome da população celular indicam as percentagens de células de cada subpopulação analisada.

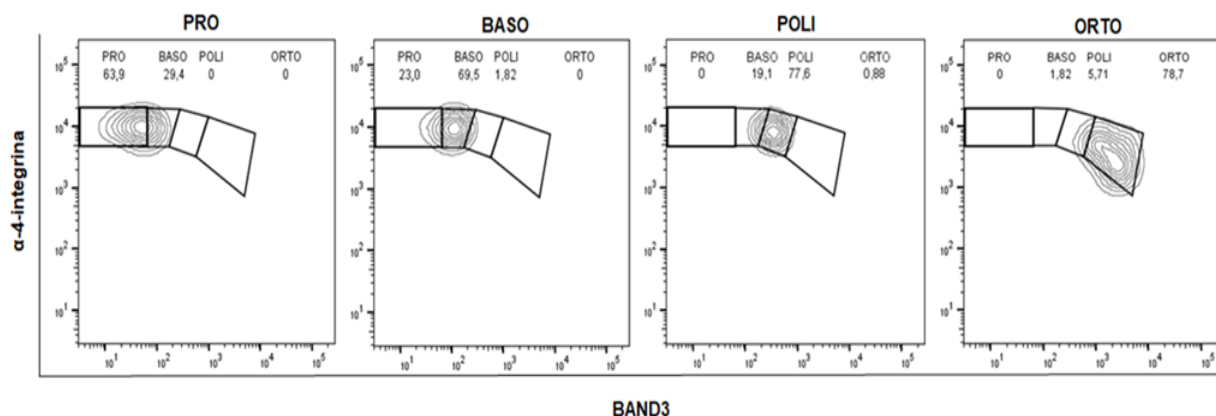
Nas figuras 21A a 21C, observa-se a evolução das estratégias de *gate* utilizadas para o isolamento das populações celulares, neste estudo. Na figura 21A, é possível observar, no *dot-plot* do *sorting*, que foi encontrada uma porcentagem de células na *gate* dos pro eritroblastos (1,31 %). Porém, não foram encontradas células na lâmina de *cytopsin* correspondente a esta *gate*. Na lâmina de *cytopsin* proveniente da *gate* BASO, nota-se a presença de pro-eritroblastos e a ausência de eritroblastos basofílicos. Na lâmina de *cytopsin* confeccionada a partir da *gate* POLI, verifica-se elevada diversidade celular, uma vez que são visualizados pro-eritroblastos, eritroblastos basofílicos e policromáticos. Na lâmina de *cytopsin* proveniente da *gate* ORTO, foram encontrados apenas reticulócitos. Assim, foi necessário realizar novos ajustes em todas as *gates* para realização do *sorting* e quantificação das frequências.

Em 21B, nota-se aumento na quantidade de subpopulações celulares, fato que pode ser observado nas lâminas do *cytopsin*. O número de células para realização do *sorting* foi duplicado, passando de 1×10^7 células para 2×10^7 células. A *gate* PRO (PROE) foi expandida e ajustada, sendo possível, desta maneira, encontrar células da população de pro-eritroblastos, como mostra a lâmina do *cytopsin*, que excepcionalmente foi fotografada em aumento de 63X. Foram também encontradas células basofílicas nesta *gate*. A lâmina de *cytopsin* da *gate* BASO apresenta células basofílicas (iniciais e tardias) e notam-se também pro-eritroblastos. Na *gate* POLI, foram encontradas células policromáticas e algumas células basofílicas, não sendo encontradas células ortocromáticas, que foram confirmadas observando-se a micrografia do *cytopsin* da *gate* POLI. Quando a *gate* ORTO foi avaliada por meio da lâmina de *cytopsin*, notou-se a presença majoritária de células ortocromáticas, não sendo encontrados reticulócitos. Mesmo assim, a separação celular não estava ideal, o que conduziu à realização de novos ajustes nas *gates*.

Por fim, a estratégia de *gate* ideal para isolar os progenitores eritróides terminais foi obtida e está representada na figura 21C. Assim sendo, esta foi a estratégia de *gate* mantida, durante todo o trabalho, para isolar os progenitores eritróides das MOC e MOP.

Em algumas amostras de MOP foi necessário realizar ajustes manuais pequenos nas demarcações das subpopulações, porém estes ajustes não influenciaram as frequências, pois foram realizados em conjunto com a análise do *cytopsin*. O *cytopsin* auxiliou a padronizar a melhor estratégia de *gate* para isolar as subpopulações terminais

eritróide das MO do presente estudo. Além de analisar a pureza celular das quatro populações celulares isoladas por meio das micrografias do *cytospin*, cada população foi



reanalisada por imunofenotipagem para determinar a pureza (figura 22).

Figura 22. Avaliação da pureza das populações celulares de progenitores eritróides terminais por imunofenotipagem. Os quatro *dot-plots* na figura representam as populações que foram fenotipadas após o *sorting* para avaliar a porcentagem de contaminação em cada uma das *gates*. Os eventos que estavam fora das *gates* da respectiva população não foram considerados na análise. PRO – pro-eritroblasto, BASO - eritroblasto basofílico, POLI - eritroblasto policromático, ORTO - eritroblasto ortocromático.

A pureza de cada subpopulação de progenitores terminais eritróides nas medulas ósseas controle utilizadas para a realização do *sorting* foi: PRO 63,9%, BASO 70%, POLI 77,8%, ORTO 78,7%. As porcentagens da pureza das populações estão apresentadas na figura 23.

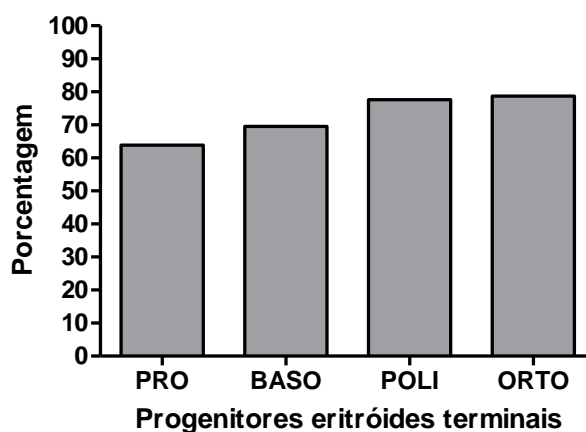


Figura 23. Porcentagem de pureza dos progenitores eritróides terminais, após as células serem sorteadas. O gráfico traz a porcentagem de pureza dos precursores terminais eritróides nas medulas ósseas controle do *sorting* em cada um dos progenitores eritróides terminais após o *sorting*. PRO – pró-eritroblasto, BASO- basofílico, POLI-policromático, ORTO-ortocromático.

4.6.6 Frequência dos progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas controle conforme expressão de CD49d e Band3

As frequências de progenitores eritróides terminais foi determinada por meio da seleção das *gates* conforme descrito no item 4.6.3, além da confirmação morfológica por *cytospin* e análise da expressão de Band3 analisada pelos *heatmaps*. A tabela 8 traz os valores de frequência para cada subpopulação de precursores terminais eritróides nas MOC.

Tabela 8. Frequência de subpopulações de progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas controle.

Amostras	PRO (%)	BASO (%)	POLI (%)	ORTO (%)
MOC 107	2,19	11,60	20,90	47,90
MOC115	3,04	17,60	35,40	25,30
MOC116	1,52	16,10	21,00	30,50
MOC117	2,89	14,30	23,20	41,50
MOC118	2,30	15,10	26,40	41,00
MOC119	2,00	7,02	14,70	45,80

MOC – Medula Óssea Controle; PRO – Pro-eritroblastos; BASO – Eritroblastos basofílicos; POLI – Eritroblastos Policromáticos; ORTO – Eritroblastos Ortocromáticos.

Os valores de frequências dos progenitores eritróides terminais das MOC foram obtidos da *gate* de células GPA+. As médias das frequências de cada subpopulação foram: PRO 2,32%, BASO 13,62%, POLI 23,60% e ORTO 38,66 (figura 24).

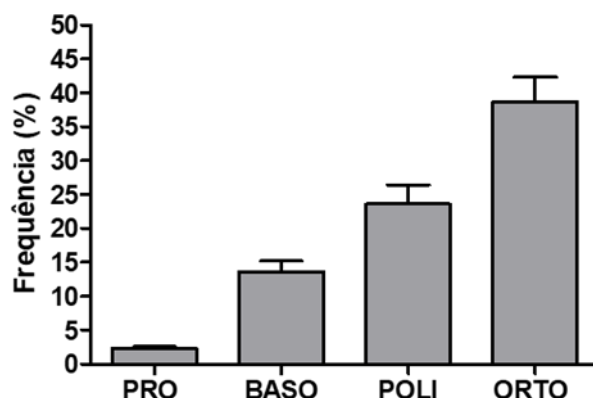


Figura 24 Média da frequência dos progenitores terminais eritróides nas medulas ósseas controle. Valores das medias frequências das subpopulações terminais eritróides das seis medulas dos controles. PRO: Pró-eritroblasto; BASO: Eritroblasto basófilo; POLI: Eritroblasto policromático e ORTO: Eritroblasto ortocromático.

4.7 Estratégia de *gates*, imunofenotipagem e *sorting* dos precursores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com NMP

4.7.1 Controle de qualidade e normalização dos dados de citometria de fluxo dos precursores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes

O controle de qualidade das amostras de MOP analisadas por citometria de fluxo foi realizado utilizando o *plugin* FlowAI do software FlowJo v10. Os eventos de boa qualidade foram selecionados para as análises, conforme descrito no item 4.6.1. Para a normalização do número de eventos, foi utilizado o *plugin* DownSample do software FlowJo v10, que permitiu a seleção de 50.000 eventos (*gate* SSC por FSC) de cada tubo das amostras de MOP. Para as análises realizadas, foram utilizados 50.000 eventos da população total de células das MOP, como descrito no item 4.6.2.

4.7.2 Estratégia de *gates* utilizada para detecção dos precursores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes

A estratégia de *gates* empregadas nos experimentos de imunofenotipagem para obtenção dos precursores eritróides terminais foi realizada conforme a metodologia descrita para analisar as medulas ósseas dos controles, como descrito no item 4.6.3.

Portanto, na análise, foi selecionada no *dot-plot* FSC-A por SSC-A a provável região das células eritróides, foram excluídos os *doublets* (*dot-plot* FSC - A por FSC-W), selecionadas as viáveis células negativas para 7AAD (*dot-plot* SSC-A por 7AAD) e negativas para CD45 (*dot-plot* SSC-A por CD45).

A partir da população de células CD45 negativas, foram selecionadas as células GPA positivas (*dot-plot* SSC-A por GPA) e, por fim, foi criado o gradiente de diferenciação terminal eritróide dos pacientes com PV, TE e MF com o *dot-plot* CD49d por Band3 (figura 25).

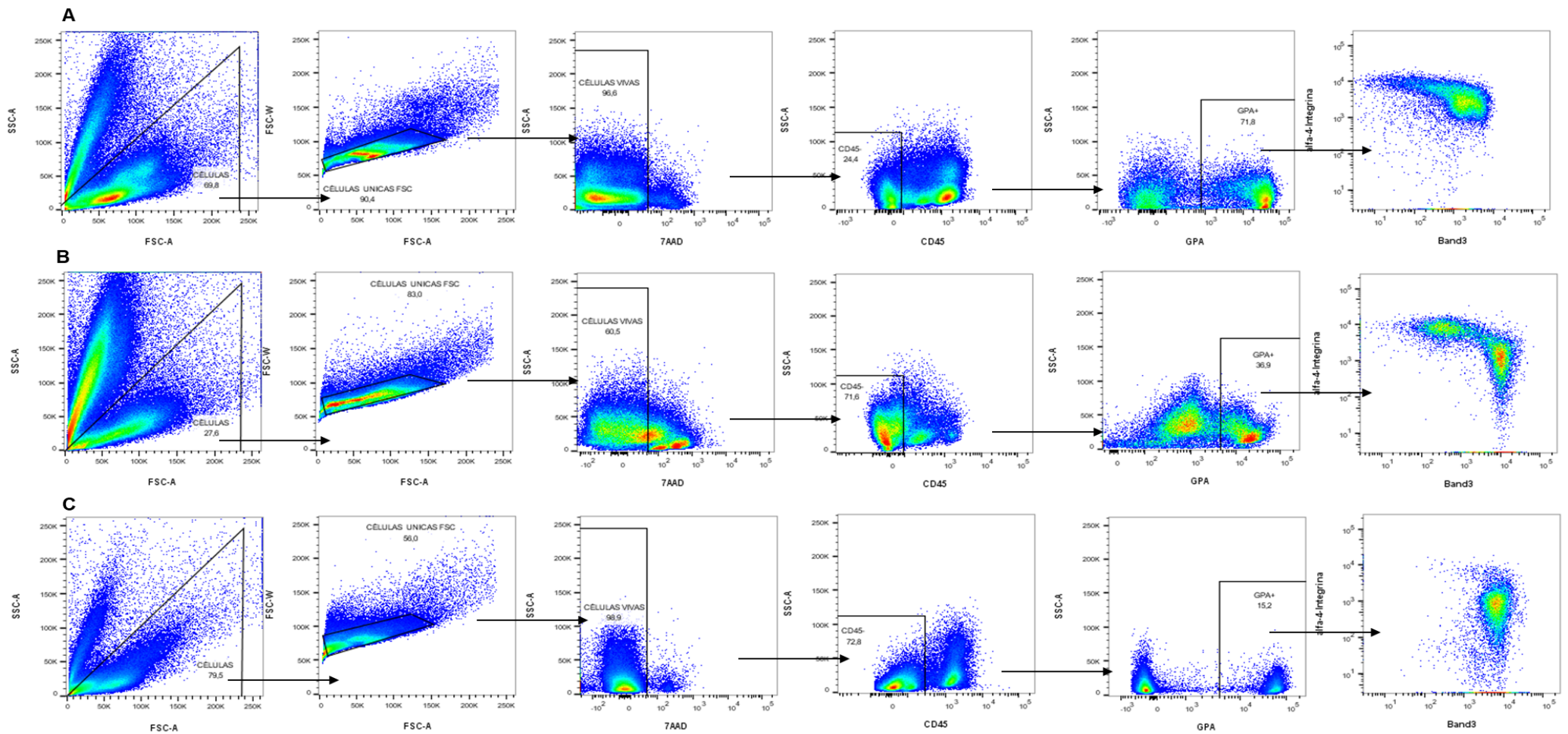


Figura 25. Estratégia de *gates* empregada para a análise imunofenotípica e quantificação da frequência das células progenitoras eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com NMP. A- estratégia de *gates* das MOP PV. B- estratégia de *gates* das MOP TE, C- estratégia de *gates* das MOP MF. As setas em preto indicam a sequência da análise desde a seleção das células em SSC por FSC, até a obtenção do gradiente de diferenciação terminal eritróide.

4.7.3 Perfil imunofenotípico dos marcadores CD49d e Band3 nas medulas ósseas dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas

O perfil imunofenotípico das MOP de PV, TE e MF foi obtido pela confecção do *dot-plot* de CD49d por Band3 (figura 26 A a C, respectivamente). A média das frequências celulares encontradas nos *dot-plots* CD49d por Band3 das amostras de MOP foi de 3000 eventos em 50.000 eventos de BMBC. O perfil imunofenotípico não foi semelhante entre as doenças: na MF, não houve a formação do gradiente de diferenciação terminal eritróide (figura 26C) nos três pacientes analisados.

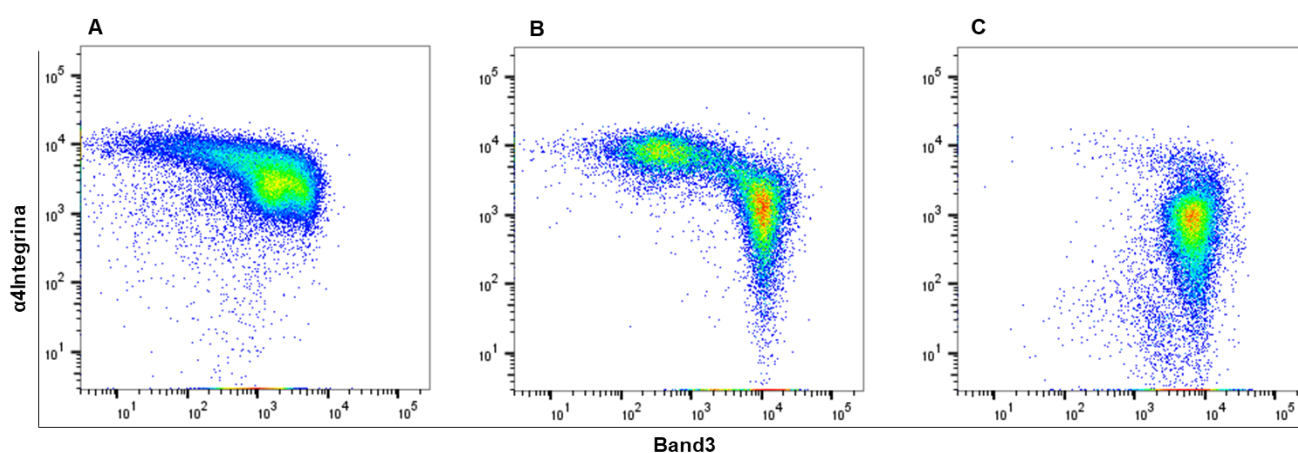


Figura 26 - Perfil imunofenotípico dos precursores eritróides terminais das medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária segundo a expressão dos marcadores CD49d por Band3. Nesta figura está apresentado um exemplo de perfil imunofenotípico encontrado nas medulas ósseas de pacientes com PV, TE e MF que foram analisadas. A - Medula óssea de paciente com PV, B - Medula óssea de paciente com TE, C - Medula óssea de paciente com MF.

A confirmação dos tipos das células presentes nos gradientes de diferenciação eritróide dos pacientes com PV, TE e MF foi realizada de forma similar às MOC, utilizando a ferramenta *backgating* do software FlowJo v10. Esta ferramenta permitiu a confirmação dos tipos de precursores terminais eritróides nos *dot-plots* e ratificou a estratégia de *gates* das amostras de pacientes com PV, TE e MF utilizando os parâmetros CD49d por Band3 (figura 27).

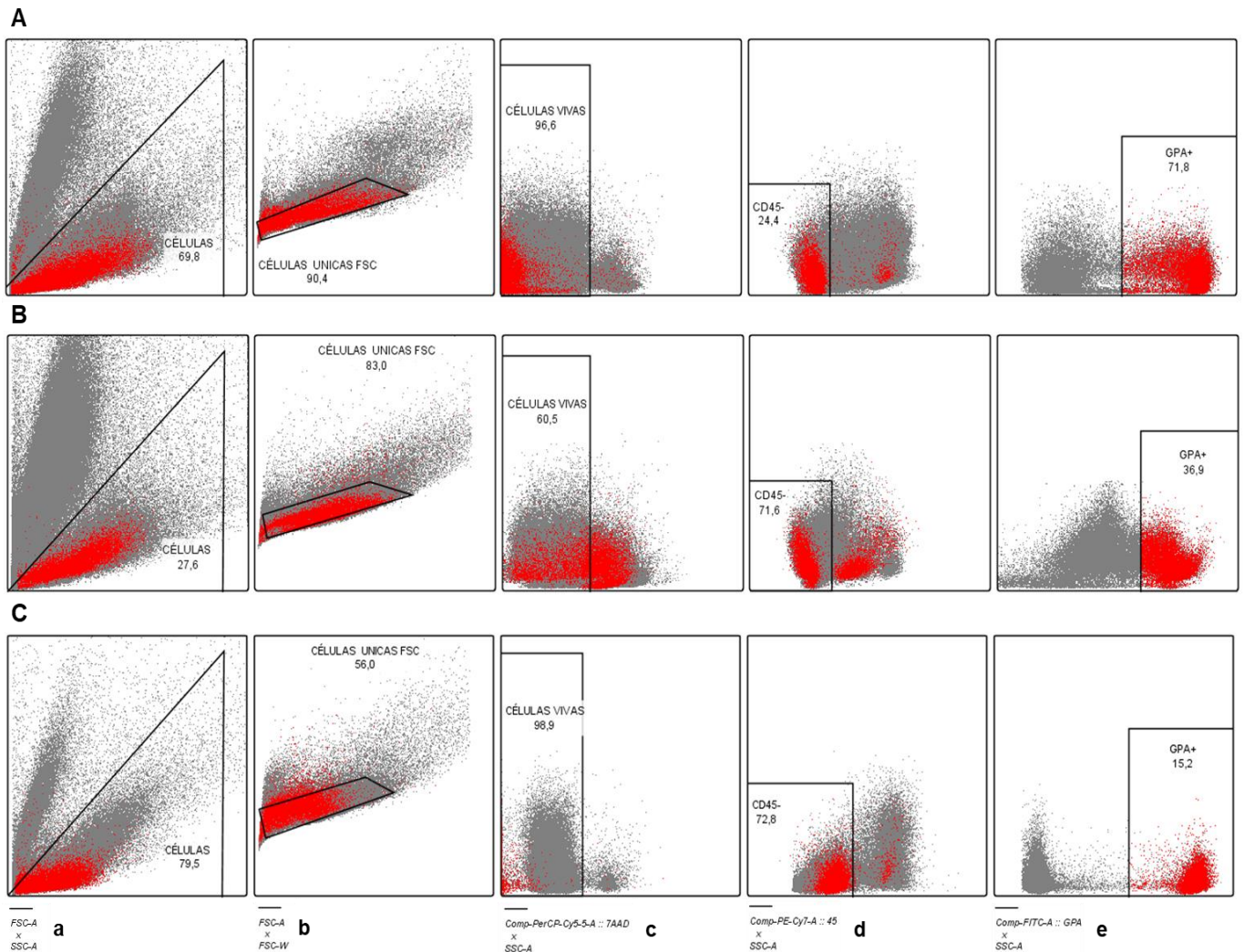


Figura 27. Backgating utilizada para identificar a localização das células eritróides nos dot-plots que são utilizados para a estratégia de gate dos pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária. Em vermelho, destacam-se as células eritróides presentes em cada dot-plot. **A** - Backgating realizada na estratégia de gates das amostras de pacientes com Policitemia Vera; **a** - dot-plot da região de células eritróides SSC-A x FSC-A. **b** - dot-plot de eventos únicos FSC-W x FSC-A. **c** - dot-plot de células viáveis SSC-A x 7AAD. **d** - dot-plot da gate de células negativas para CD45, SSC-A x CD45. **e** - dot-plot das células GPA positivas. **B** - backgating realizada na estratégia de gates das amostras de pacientes com Trombocitemia Essencial; **a** - dot-plot da região de células eritróides SSC-A x FSC-A. **b** - dot-plot de eventos únicos FSC-W x FSC-A. **c** - dot-plot de células viáveis SSC-A x 7AAD. **d** - dot-plot da gate de células negativas para CD45, SSC-A x CD45. **e** - dot-plot das células GPA positivas. **C** - Backgating realizada na estratégia de gates das amostras de pacientes com Mielofibrose; **a** - dot-plot da região de células eritróides SSC-A x FSC-A. **b** - dot-plot de eventos únicos FSC-W x FSC-A. **c** - dot-plot de células viáveis SSC-A x 7AAD. **d** - dot-plot da gate de células negativas para CD45, SSC-A x CD45. **e** - dot-plot das células GPA positivas.

A partir do estabelecimento e confirmação da estratégia de gates nas amostras de pacientes com NMP, foi feita a análise dos marcadores GPA, CD49d e Band3 nos gradientes de diferenciação terminal eritróide de pacientes com PV (figura 28), TE (figura 29) e MF (figura 30) por meio de heatmap confeccionado com o software FlowJo v10.

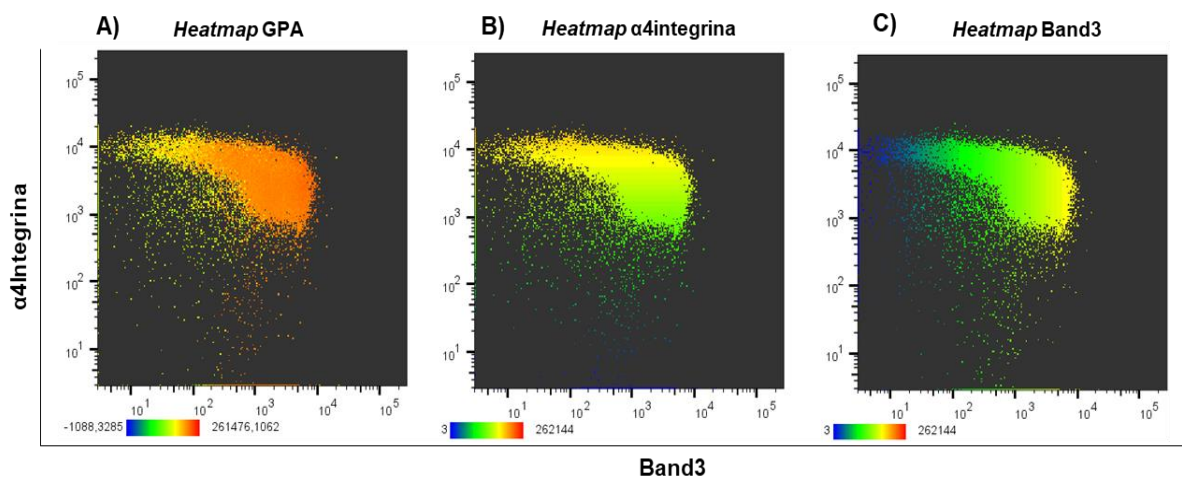


Figura 28. *Heatmaps* da expressão dos marcadores da linhagem eritróide utilizados para delimitar as subpopulações por imunofenotipagem e auxiliar no *sorting* das populações de progenitores eritróides terminais das amostras de pacientes com Policitemia Vera. **A** - *Heatmap* de GPA na população de progenitores eritróides terminais. **B** - *Heatmap* de α 4-Integrina na população de progenitores eritróides terminais. **C** - *Heatmap* de Band3 na população de progenitores eritróides terminais.

A expressão de GPA em pacientes com PV é menor nas células indiferenciadas como os pro-eritroblastos e eritroblastos basofílicos (cor amarela), mas durante a diferenciação, ocorre aumento na expressão deste marcador nas células mais diferenciadas (eritroblastos policromáticos e ortocromáticos, alaranjado), como era esperado a partir das observações em todas as amostras dos controles (figura 28A).

Com relação a α -4-Integrina (CD49d), na PV pôde ser observado, assim como nos controles, que a expressão deste marcador é elevada no início da diferenciação, em pro-eritroblastos e eritroblastos basofílicos (amarelo), e diminui com a diferenciação celular (verde) (figura 28B).

Para o marcador Band3, a dinâmica de expressão na PV também seguiu àquela verificada nos controles. No início da diferenciação terminal eritróide, a expressão de Band3 é muito baixa, caracterizando a população de pro-eritroblastos (azul), mas durante a diferenciação das células terminais eritróides ocorre aumento na expressão de Band3, caracterizando a população de eritroblastos basofílicos (verde escuro e verde claro), seguida de uma expressão moderada que corresponde à população de eritroblastos policromáticos (amarelo esverdeado). No final da diferenciação, a maior expressão de Band3 delimita a população de eritroblastos ortocromáticos (amarelo) (figura 28C).

Nas amostras de pacientes com TE, foram observadas as mesmas características de expressão de GPA, CD49d e Band3 que foram encontradas para as amostras de pacientes com PV e controles (figura 29).

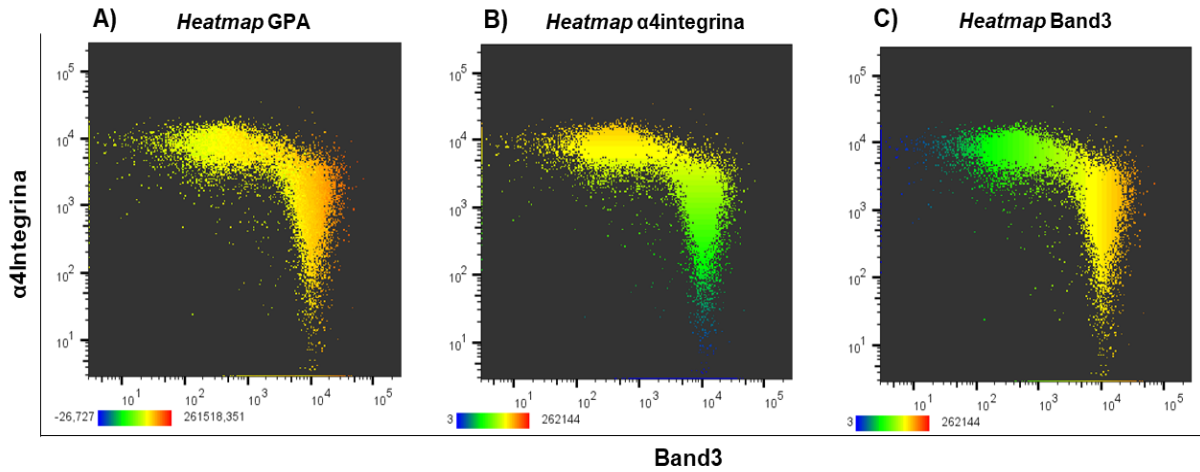


Figura 29. Heatmaps da expressão dos marcadores da linhagem eritróide utilizados para delimitar as subpopulações por imunofenotipagem e auxiliar no *sorting* das populações de progenitores eritróides terminais das amostras de pacientes com Trombocitemia Essencial. **A** - Heatmap de GPA na população de progenitores eritróides terminais. **B** - Heatmap de $\alpha 4$ -Integrina na população de progenitores eritróides terminais. **C** - Heatmap de Band3 na população de progenitores eritróides terminais.

Nas amostras de MF, foi observado perfil imunofenotípico diferente das medulas ósseas de controles, PV e TE. Nos heatmaps de CD49d por Band3, foram observadas apenas as células mais diferenciadas do gradiente de diferenciação eritróide terminal (figura 30), não sendo possível separar adequadamente as subpopulações nesta doença.

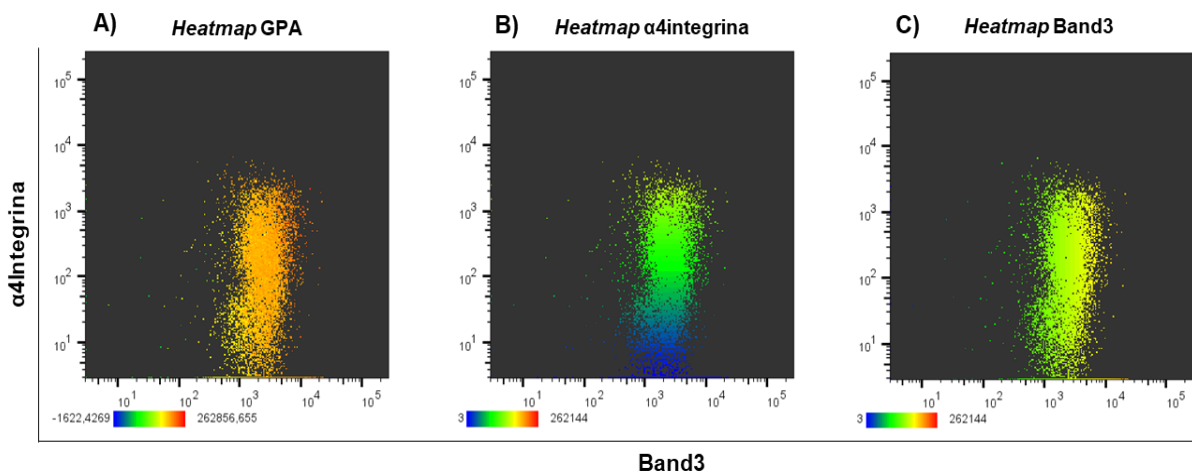


Figura 30. Heatmaps da expressão dos marcadores da linhagem eritróide utilizados para delimitar as subpopulações por imunofenotipagem e auxiliar no *sorting* das populações de progenitores eritróides terminais das amostras de pacientes com Mielofibrose. **A** - Heatmap de GPA na população de progenitores eritróides terminais. **B** - Heatmap de $\alpha 4$ -Integrina na população de progenitores eritróides terminais. **C** - Heatmap de Band3 na população de progenitores eritróides terminais.

Na avaliação dos *heatmaps* de MF, pôde ser observado, na expressão de GPA a presença de células mais diferenciadas, caracterizadas pela alta expressão deste marcador (cor laranja, figura 30A).

No *heatmap* de expressão de α -4-Integrina (CD49d), nota-se a presença poucas células expressando este marcador (cor amarela). Nas demais células (cores verde e azul) a expressão de CD49d é baixa ou ausente, respectivamente (figura 30B).

Referente a expressão de Band3, nota-se a presença de duas regiões, sendo a primeira caracterizada por baixa expressão de Band3 (cor verde) e a segunda região apresentando alta expressão de Band3 (cor amarela). Nos pacientes com MF, o *heatmap* de Band3 não foi útil na separação celular, pois não houve formação do gradiente de diferenciação terminal eritróide nestas amostras (figura 30C).

4.7.4 Isolamento das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas

4.7.4.1 Isolamento e pureza do *sorting* das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos pacientes com Policitemia Vera

Para quantificar as frequências de precursores eritróides terminais encontrados nas *gates* que correspondiam às células de interesse, foram realizadas as *gates* avaliando os parâmetros CD49d por Band3 e o *sorting* das quatro populações de precursores (pró-eritroblastos, eritroblastos basofílicos, policromáticos e ortocromáticos), assim como foi feito para as amostras dos controles (figura 20, do item 4.6.5).

Após a realização do *sorting*, foram confeccionadas as lâminas para realizar o *cytopsin* para cada uma das populações celulares coletadas nas *gates* apresentadas. As lâminas foram coradas pela coloração (MGG) e fotografadas em microscópio óptico.

Foram obtidos precursores terminais eritróides em todas as *gates* do *sorting*, bem como nas lâminas de *cytopsin*. Na figura apresentada como exemplo (figura 31), nota-se a frequência de 7,81% para a subpopulação de PRO e a respectiva lâmina (PRO), que confirma que se tratava desta população. A subpopulação BASO foi encontrada com frequência de 14,4% e foi confirmada morfológicamente por meio da morfologia celular verificada na lâmina do *cytopsin*.

Para a subpopulação POLI, a frequência foi de 21,4% e a análise da micrografia confirmou o tipo celular. Por fim, a subpopulação ORTO foi encontrada com frequência de 26,1% e pôde ser confirmada pela visualização da lâmina confeccionada a partir desta *gate* (figura 31).

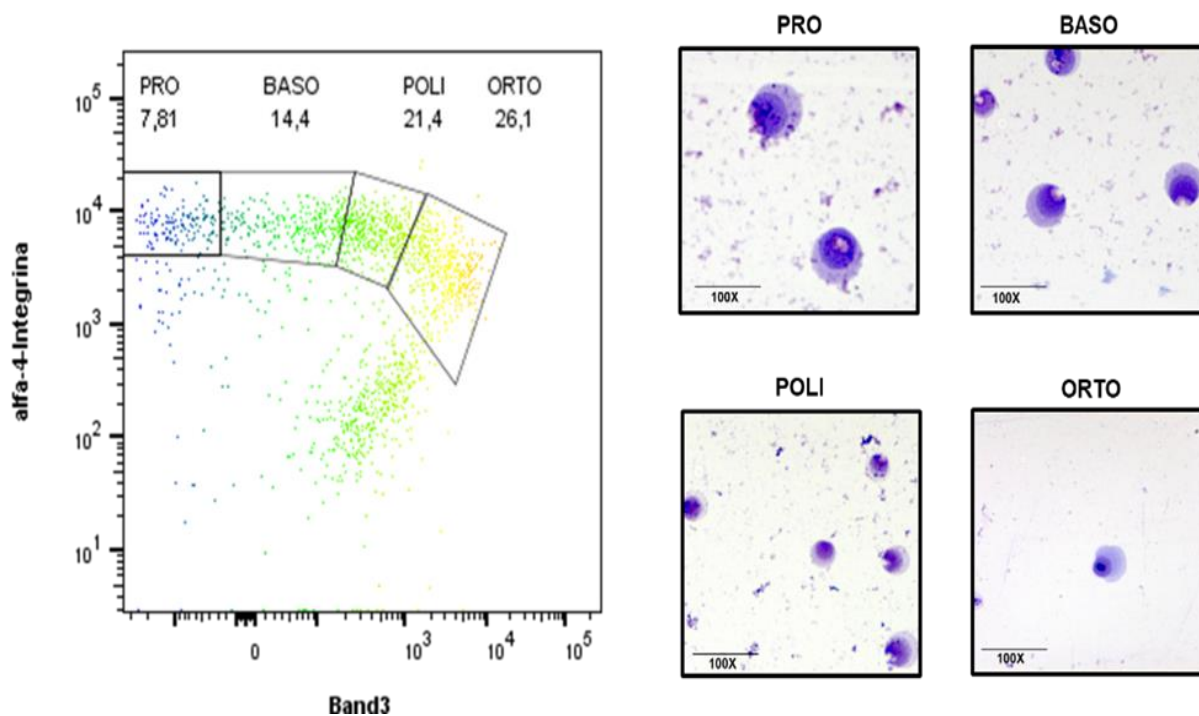


Figura 31. *Dot-plot* das células eritróides terminais conforme os parâmetros de expressão de α -4-Integrina (CD49d) e Band3 de pacientes com Policitemia Vera. Estratégia de *gates* utilizadas para formação do gradiente de diferenciação terminal eritróide e realização do *sorting* celular e micrografia das células eritróides obtidas por meio desta estratégias de *gate*. PRO – pró-eritroblasto, BASO-eritroblasto basofílico, POLI- eritroblasto policromático, ORTO- eritroblasto ortocromático.

No *sorting* realizado para a padronização das *gates* dos pacientes com PV, parte das células foi utilizada para a confecção da lâmina de *cytospin* e a outra metade foi reanalisada por imunofenotipagem para o estabelecimento da pureza das *gates* de isolamento das subpopulações de precursores terminais (figura 32). Os valores de pureza celular variaram de 74,6% a 95,2%. A pureza do *sorting* para as subpopulações foi: para PRO 84,2%, BASO 74,6%, POLI 95,2% e ORTO 81,6% (figura 33).

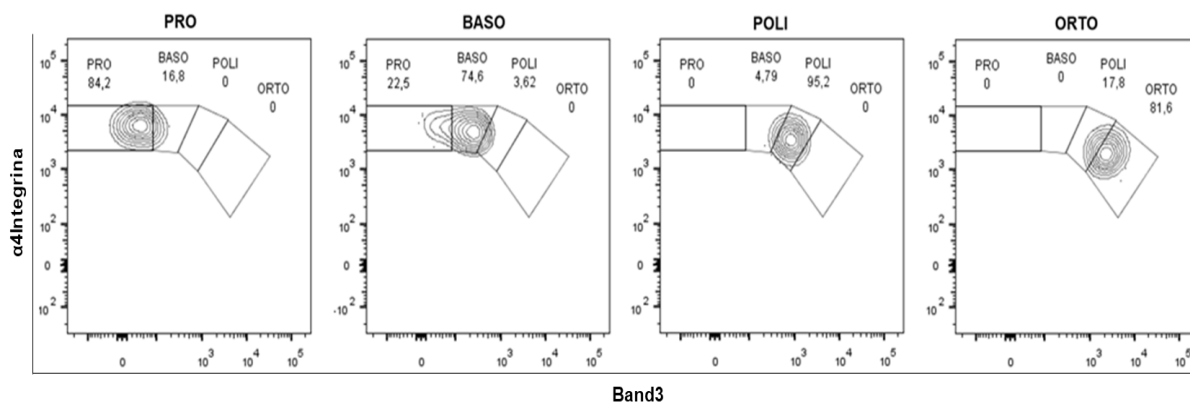


Figura 32. Avaliação da pureza do *sorting* das subpopulações celulares de progenitores eritróides terminais por imunofenotipagem das medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera. Os quatro *dot-plots* na figura representam as populações que foram fenotipadas após o *sorting* para avaliação da porcentagem de pureza de cada subpopulação celular presente nas *gates*. Os eventos que estavam fora das *gates* da respectiva população não eram considerados na análise. PRO – pró-eritroblasto, BASO-eritroblasto basofílico, POLI- eritroblasto policromático, ORTO- eritroblasto ortocromático.

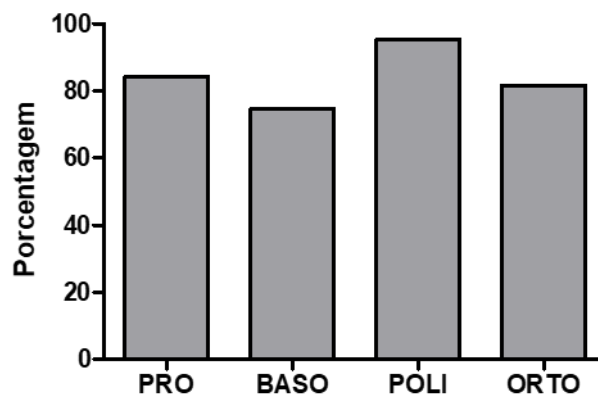


Figura 33. Média da porcentagem de pureza dos progenitores eritróides terminais das amostras de medula óssea de pacientes com Policitemia Vera, após as células serem isoladas por “*sorting*”. O gráfico traz a média da porcentagem de pureza de cada progenitor eritróide terminal após o *sorting*. PRO – pró-eritroblasto, BASO - eritroblasto basofílico, POLI - eritroblasto policromático, ORTO - eritroblasto ortocromático.

4.7.4.2 Isolamento e pureza do *sorting* das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos pacientes com Trombocitemia Essencial

Foram estabelecidas as frequências das subpopulações de precursores eritróides das medulas ósseas de TE. Essas frequências foram confirmadas com a realização de *sorting* celular a partir das *gates* desenhadas para delimitar as subpopulações de precursores terminais eritróides (figura 34).

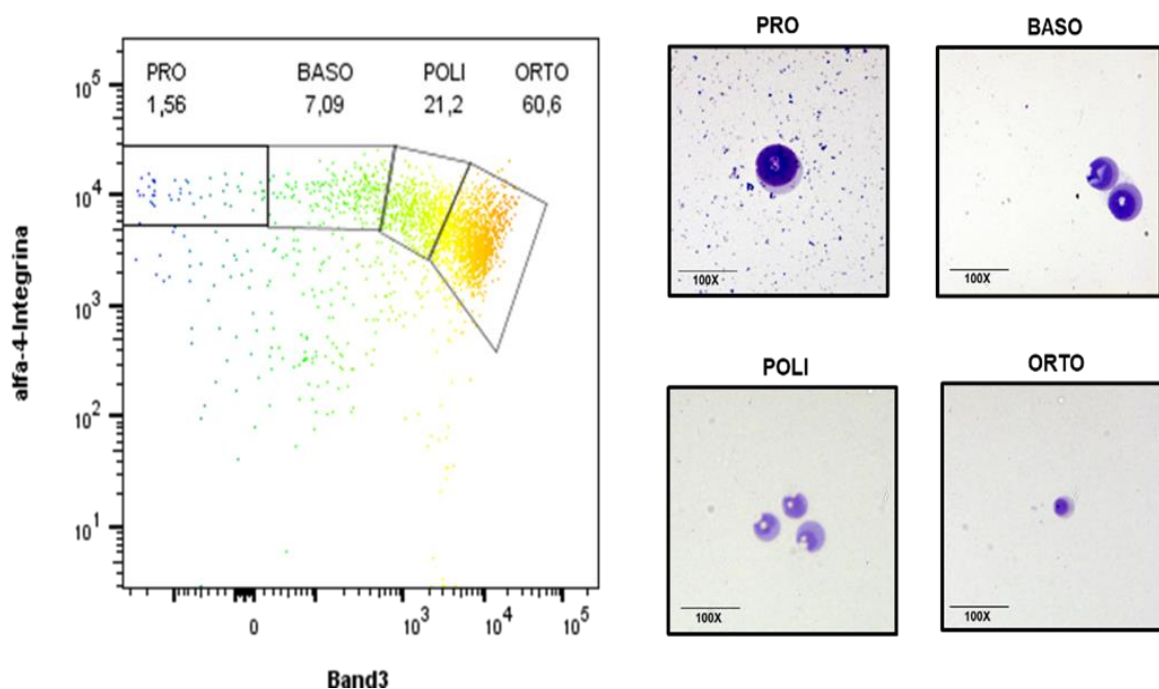


Figura 34. Dot-plot das células eritróides terminais conforme os parâmetros de expressão de α -4-Integrina (CD49d) e Band3 de pacientes com Trombocitemia essencial. Estratégia de *gates* utilizadas para formação do gradiente de diferenciação terminal eritróide e realização do *sorting* celular e micrografia das células eritróides obtidas por meio desta estratégias de *gate*. PRO – pró-eritroblasto, BASO- eritroblasto basofílico, POLI - eritroblasto policromático, ORTO - eritroblasto ortocromático.

As medulas ósseas de pacientes com TE apresentaram perfil imunofenotípico de células eritróides terminais semelhante ao observado no *sorting* das medulas dos pacientes com PV. Neste exemplo (figura 34), foram encontradas células em todas as *gates* do gradiente de diferenciação eritróide. A subpopulação PRO apresentou frequência celular de 1,56% e a micrografia confirmou morfologicamente se tratar de pro-eritroblastos. Com relação à subpopulação BASO, a frequência encontrada foi de 7,09% e foi confirmada a presença de células basofílicas na micrografia (figura 34). A subpopulação POLI foi encontrada com frequência de 21,2%; na micrografia foram encontradas células policromáticas, confirmando a presença dessa população. Por fim, a subpopulação ORTO obteve a frequência de 60,6%, que confirmada por meio da micrografia (figura 34).

Assim como nos pacientes com PV e controles, parte das células sorteadas foram utilizadas para confecção das lâminas de *cytospin* para a padronização das *gates* do *sorting* dos pacientes com TE, e a outra metade foi reanalisada por imunofenotipagem

para determinação da pureza pós-isolamento das subpopulações de precursores terminais eritróides (figura 35).

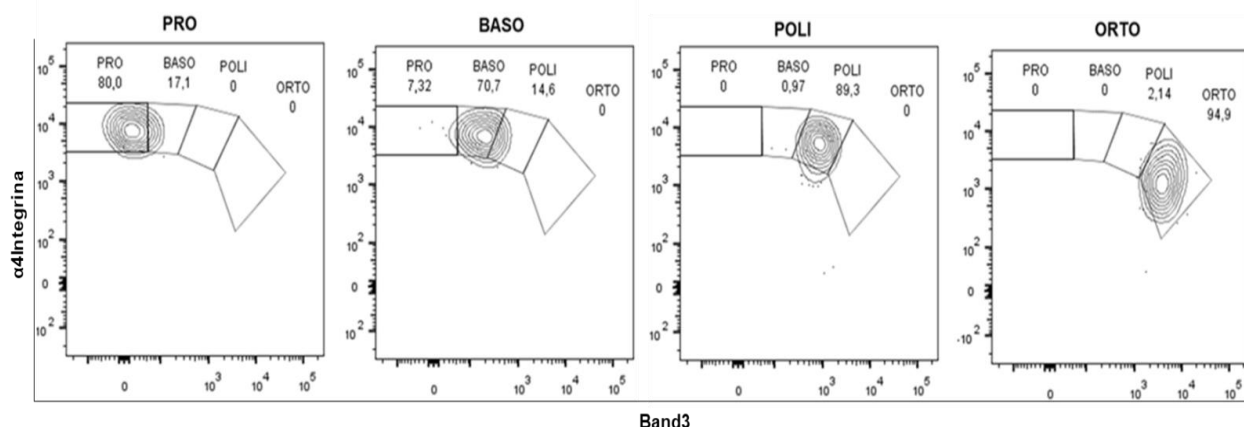


Figura 35. Avaliação da pureza do sorting das subpopulações celulares de progenitores eritróides terminais por imunofenotipagem das medulas ósseas de pacientes com Trombocitemia Essencial. Os quatro dot-plots na figura representam as populações que foram fenotipadas após o *sorting* para avaliarmos a porcentagem de contaminação em cada uma das *gates*. Os eventos que estavam fora das *gates* da respectiva população não foram considerados na análise. PRO – pro-eritroblasto, BASO-eritroblasto basofílico, POLI- eritroblasto policromático, ORTO- eritroblasto ortocromático.

A pureza dos precursores terminais eritróides nos pacientes de TE variou de 70,7% a 94,9%. A porcentagem de pureza das subpopulações de precursores terminais eritróides, isoladas pelo *sorting*, foi de 80%, para o PRO, 70,7% para BASO, 89,3% POLI e 94,9% para o ORTO (figura 36).

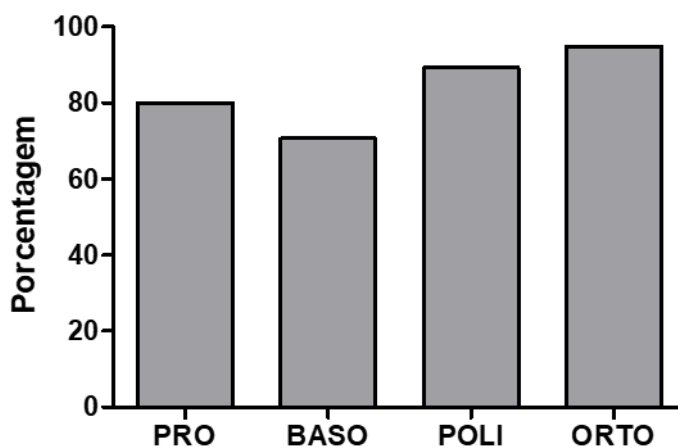
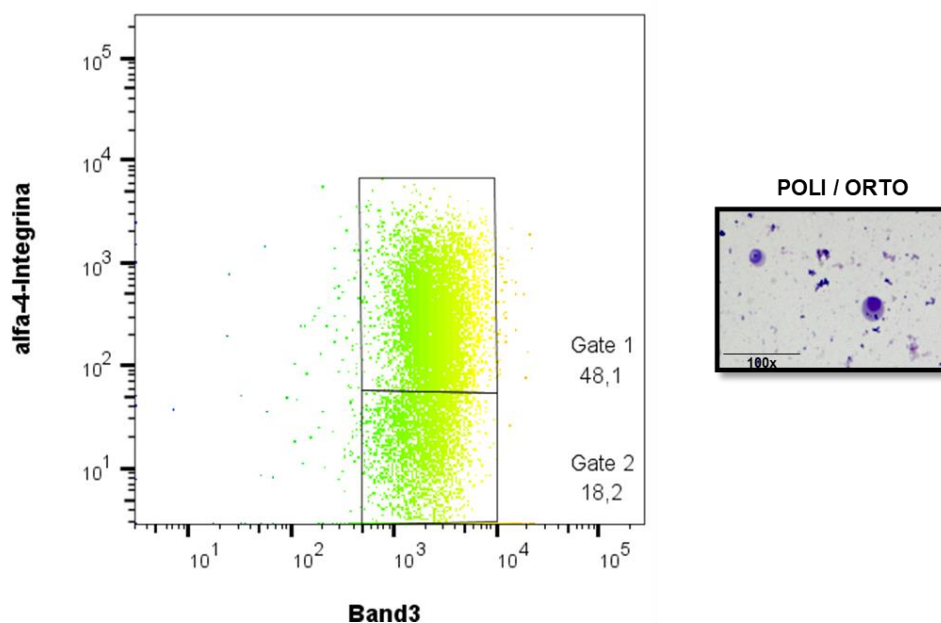


Figura 36. Porcentagem de pureza dos progenitores eritróides terminais das amostras de medula óssea de pacientes com Trombocitemia Essencial. PRO – pró-eritroblasto, BASO - eritroblasto basofílico, POLI - eritroblasto policromático, ORTO - eritroblasto ortocromático.

4.7.4.3 Isolamento das subpopulações de progenitores eritróides nas medulas ósseas dos pacientes com Mielofibrose

As medulas de MF não apresentaram formação do gradiente terminal eritróide, e, por este motivo, não foi possível realizar o *sorting* das subpopulações de precursores eritróides terminais. Desta forma, o *sorting* foi realizado nas duas populações celulares que foram observadas no *heatmap* de expressão de Band3 no *dot-plot* de α -4-Integrina por



Band3 (figura 37)

Figura 37. Dot-plot das células eritróides terminais conforme os parâmetros de expressão de α -4-Integrina (CD49d) e Band3 de pacientes com Mielofibrose. Estratégia de *gates* utilizadas para realização do *sorting* celular e micrografia das células eritróides obtidas por meio destas estratégias de *gate*. POLI – eritroblasto policromático, ORTO – eritroblasto ortocromático.

Foram estabelecidas duas *gates* distintas para o *sorting* das amostras de MF, nomeadas de *gate* 1 e 2. Apenas na *gate* 1 foi possível obter células íntegras nas lâminas do *cytospin*. A *gate* 1 apresentou contaminação celular e células morfológicamente compatíveis com os eritroblastos policromáticos e ortocromáticos. Na *gate* 2, não foram encontradas células nas lâminas de *cytospin* (figura 37). Para as amostras de MF, não foi realizada análise de pureza no *sorting*.

4.7.5 Frequência dos progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas conforme expressão de CD49d e Band3

4.7.5.1 Frequência dos progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera

Foram determinadas as frequências das subpopulações de precursores eritróides terminais nas MO de pacientes com PV utilizando a mesma estratégia de *gate* do *sorting*, como descrito no item 4.6.5 dos resultados. Os valores de frequência para cada uma das subpopulações de progenitores terminais eritróides podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9. Frequência de subpopulações de precursores terminais eritróides nas medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera

Amostras	PRO (%)	BASO (%)	POLI (%)	ORTO (%)
MOP 71	7,89	14,80	21,40	26,10
MOP 87	9,03	13,40	22,80	38,10
MOP 89	4,82	7,94	16,20	49,80
MOP 91	6,15	9,21	14,90	28,40
MOP 93	3,07	5,37	18,20	41,00

MOP – Medula Óssea de Paciente; PRO – Pró-eritroblastos; BASO – Eritroblastos basofílicos; POLI – Eritroblastos Policromáticos; ORTO – Eritroblastos Ortocromáticos.

As médias de frequência para cada subpopulação de progenitores eritróides terminais nas MOP de PV foram: PRO 6,19%, BASO 10,14%, POLI 18,70% e ORTO 36,68% (figura 38).

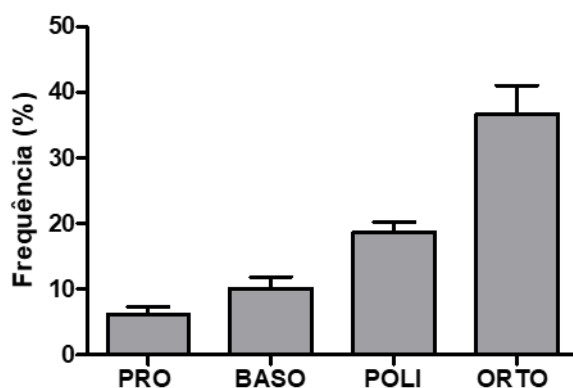


Figura 38. Frequência das subpopulações de progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Policitemia Vera. O gráfico apresenta os valores das medias das frequências das subpopulações terminais eritróides de pacientes com PV (n=5). PRO - pró-eritroblasto, BASO - eritroblasto basófilo, POLI - eritroblasto policromático, ORTO - eritroblasto ortocromático.

Na PV, foi observado que a subpopulação PRO apresenta frequência maior do que a estabelecida nas medulas ósseas dos controles, enquanto que as demais subpopulações se mantiveram dentro dos valores de frequência considerados como normais.

4.7.5.2 Frequência dos progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Trombocitemia Essencial

As frequências das subpopulações de precursores eritróides terminais nas MO de pacientes com TE foram determinadas utilizando a mesma estratégia de *gate* do *sorting*, como descrito no item 4.6.5 dos resultados. As frequências de cada subpopulação de progenitores terminais eritróides estão representadas na tabela 10.

Tabela 10. Frequência de subpopulações de precursores terminais eritróides nas medulas ósseas de pacientes com Trombocitemia Essencial.

Amostras	PRO	BASO	POLI	ORTO
MOP 72	1,97	10,50	22,80	44,20
MOP73	1,95	8,40	25,80	57,20
MOP 75	1,56	7,08	21,20	60,60
MOP 81	3,04	6,79	5,43	52,30

MOP – Medula Óssea de Paciente; PRO – Pró-eritroblastos, BASO – Eritroblastos basofílicos; POLI – Eritroblastos Policromáticos; ORTO – Eritroblastos Ortocromáticos.

As médias de frequências das subpopulações de progenitores eritróides terminais nos pacientes com TE foram: PRO 2,13%, BASO 8,19%, POLI 18,80% e ORTO 53,57% (figura 39).

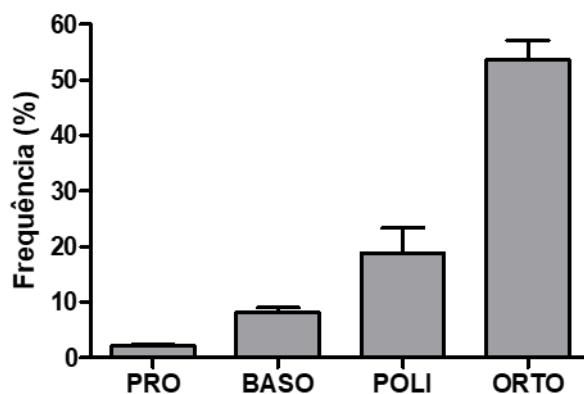


Figura 39. Frequência das subpopulações de progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas de pacientes com Trombocitemia Essencial. O gráfico apresenta os valores das médias das frequências

das subpopulações terminais eritróides das quatro MOP de pacientes com TE. PRO - pro-eritroblasto, BASO - eritroblasto basófilo, POLI - eritroblasto policromático, ORTO - eritroblasto ortocromático.

Na TE, foi observado que a subpopulação ORTO apresenta frequência maior do que a estabelecida nas medulas ósseas controle, enquanto que as demais subpopulações se mantiveram dentro dos valores de frequência considerados normais.

4.8 Análise *in silico* das subpopulações de precursores eritróides terminais nas medulas ósseas de doadores e de pacientes com NMP

As análises *in silico* foram realizadas com o objetivo de tornar a estratégia de isolamento das subpopulações de precursores terminais eritróides menos empírica. Primeiramente, foi realizado o controle de qualidade das amostras, como descrito no item 4.6.1 dos Resultados. Posteriormente, foi criada a estratégia de *gates* estabelecida no item 4.6.5 dos resultados. Com a criação das *gates* e obtenção do *dot-plot* de CD49d por Band3, foi utilizado o *plugin* FlowSOM do software FlowJo V10 no respectivo *dot-plot*. Este *plugin* permite a visualização e agrupamento dos dados de citometria de fluxo (99). Por meio desta ferramenta, foi possível agrupar as células do gradiente eritróide segundo a expressão de α -4-Integrina (CD49d) e Band3 (figura 40).

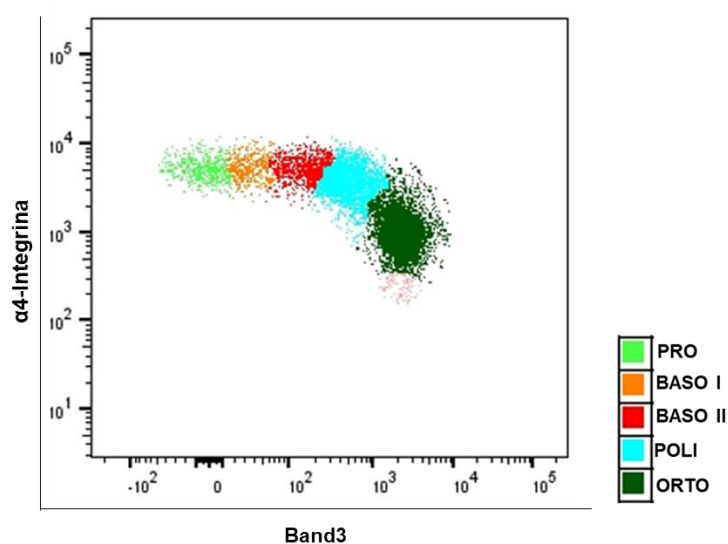


Figura 40. Exemplo de uso do *plugin* FlowSOM no *dot-plot* de α -4-Integrina (CD49d) e Band3, mostrando as subpopulações de progenitores eritróides terminais das medulas ósseas. *Dot-plot* dos parâmetros CD49d x Band3, com a subpopulações de precursores terminais eritróides agrupados segundo o algoritmo do *plugin* FlowSOM. PRO – pró-eritroblasto (verde claro), BASO – eritroblasto basofílico I (laranja) e II (vermelho), POLI – eritroblasto policromático (azul claro) e ORTO – eritroblasto ortocromático (verde escuro).

Assim, após a obtenção do agrupamento das células do gradiente terminal eritróide, podem ser criadas *gates* nas regiões das células de interesse e o arquivo do software FlowJo pode ser exportado ao software FACSDiva para a realização do *sorting* celular das subpopulações de precursores terminais eritróides.

Com a aplicação desta técnica, é possível estabelecer *gates* de *sorting* mais precisas e determinar com maior facilidade as células das subpopulações de progenitores terminais eritróides. Desta forma, o *sorting* pode ser realizado com maior precisão e pureza. A aplicação desta estratégia torna a análise individualizada e menos influenciada pelas diferenças intrínsecas presentes em cada amostra.

4.9 Comparação das frequências de subpopulações de progenitores eritróides terminais entre controles e pacientes com Policitemia Vera (PV) e Trombocitemia Essencial (TE)

A frequência das subpopulações de precursores terminais eritróides de pacientes com PV, quando comparada com a frequência de subpopulações das MOC, apresentou aumento da subpopulação PRO ($p=0,0043$). Para as subpopulações BASO, POLI e ORTO, não foram identificadas diferenças entre pacientes com PV e as MOC (figura 41).

Nota-se que nas medulas de PV as subpopulações BASO, POLI e ORTO dos precursores terminais eritróides possuem frequências semelhantes às encontradas para essas subpopulações nas MOC, enquanto que a subpopulação PRO é maior do que os controles (figura 41).

As frequências de subpopulações de progenitores eritróides terminais das medulas ósseas dos pacientes com TE foram analisadas em comparação às MOC. Nas medulas ósseas de pacientes com TE, foi observado que as frequências das subpopulações de progenitores eritróides terminais PRO, BASO e POLI eram semelhantes às frequências encontradas para as subpopulações das MOC; porém, há aumento da subpopulação ORTO ($p=0,0381$) em relação as MOC (figura 41).

As frequências de BASO e POLI nos pacientes com TE foi similar às verificadas nos pacientes com PV (figura 41).

As frequências das subpopulações PRO e ORTO dos pacientes com PV e TE foi diferente: observou-se que em pacientes com PV há aumento da subpopulação PRO ($p=0,0159$) quando comparadas com TE. Em pacientes com TE, há aumento da

subpopulação de ORTO ($p= 0,0317$) em relação as medulas de pacientes com PV (figura 41).

As amostras de MF não fizeram parte destas análises de frequência, visto que nenhuma das três amostras analisadas apresentou a formação do gradiente eritróide terminal.

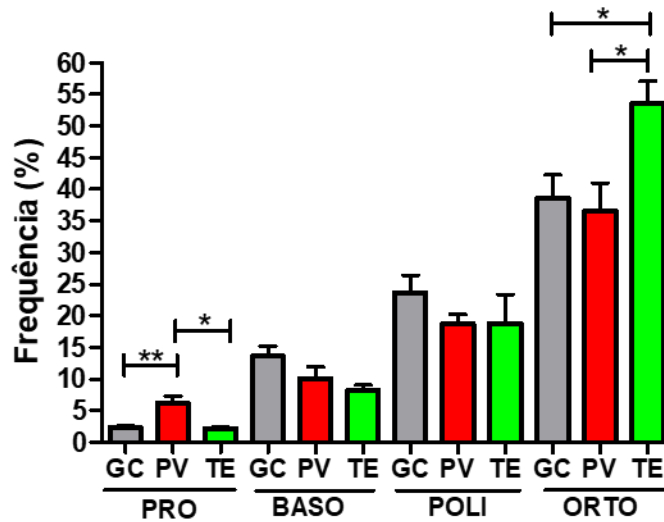


Figura 41. Comparação entre as frequências das subpopulações de progenitores eritróides terminais das medulas ósseas controle com as medulas de pacientes com Policitemia Vera e Trombocitemia Essencial. As barras apresentam os valores das medias das frequências das subpopulações de progenitores eritróides terminais nas medulas ósseas controle (cinza) e nas medulas ósseas de pacientes com PV (vermelho) e TE (verde). As análises foram realizadas pelo teste estatístico de Mann-Whitney. Grupo controle (GC) n= 6, PV n= 5 e TE n=4. * e ** representam diferença estatística $p<0,05$ e $p< 0,01$, respectivamente. GC – grupo controle; PV – Policitemia Vera; TE – trombocitemia essencial; PRO – pró-eritroblasto; BASO - eritroblasto basófilo; POLI - eritroblasto policromático; ORTO – eritroblasto ortocromático.

5. DISCUSSÃO

5.1. Isolamento, congelamento e imunofenotipagem dos precursores eritróides terminais da medula óssea

No curso do presente trabalho, foram selecionados e realizados diversos protocolos laboratoriais de separação celular por gradiente de Ficoll, criopreservação de amostras biológicas, descongelamento celular, *sorting* celular, fixação celular por *cytospin* e coloração de lâminas.

Os referidos protocolos foram selecionados e testados nas amostras de MOC e MOP para a padronização do melhor protocolo, de modo a escolher aquele que pudesse ser utilizado de forma eficiente no isolamento das subpopulações de precursores terminais eritróides de pacientes com PV, TE e MF.

Assim, foram realizados experimentos para testarmos o melhor método de isolamento das células mononucleares pelo gradiente de Ficoll.

Ficoll-Paque é uma solução de polissacarose com diatrizoato de sódio que possui como característica essencial a densidade de 1.077 g/ml a 20°C. As células mononucleares da medula óssea foram separadas devido à diferença de densidade frente aos outros elementos constituintes da medula óssea.

O método escolhido para separar as células mononucleares foi o de maior tempo de centrifugação, ou seja, o método 2 (item 3.2.1.1, da metodologia), pois com ele obteve-se maior rendimento celular quando comparado com o método 1 (menor tempo de centrifugação), tanto para as células de MOP quanto para as de MOC. O maior tempo de centrifugação melhorou a separação das células mononucleares das medulas ósseas (BMMC), diminuindo a contaminação por granulócitos, hemácias e plaquetas.

A presença ou ausência de granulócitos e outras células puderam ser observadas no gráfico de *dot plot* de tamanho e complexidade do citômetro de fluxo (FSC por SSC).

No ensaio de separação pelo gradiente de Ficoll-Paque, a viabilidade das células pós-isolamento foi avaliada por meio de marcação com 7AAD e o resultado foi similar em ambos os métodos.

Como não foi possível utilizar as medulas ósseas à fresco devido ao longo tempo de processamento, marcação e disponibilidade do *sorting*, fez-se necessário testar protocolos de criopreservação, descongelamento e armazenamento para obter a melhor

condição do estudo das células eritróides terminais sem prejuízo da celularidade e da imunofenotipagem.

A criopreservação celular é um processo crucial para a manutenção das características fisiológicas de células e produtos terapêuticos derivados de células. Faz-se necessário padronizar uma faixa de tempo de congelamento a uma dada temperatura, buscando armazenar e preservar os produtos ou amostras biológicas da melhor forma.

Para cada situação experimental, tipo celular e objetivo de análise, existe o protocolo de criopreservação adequado (100). As técnicas de criopreservação variam conforme os protocolos de execução no que diz respeito aos segmentos terapêuticos e na utilização em pesquisa. Há protocolos específicos para os diversos tipos de células, tecidos e órgãos, de origem humana e animal (101, 102). Assim, é necessário escolher e testar o protocolo que mais se adequa ao produto a ser criopreservado.

A discussão deste tema se faz de grande relevância pelo fato de que amostras criopreservadas de maneira indevida podem sofrer danos celulares irreversíveis. Essas lesões celulares podem ser potencialmente deletérias à amostra, proporcionando mudanças na morfologia (coloração, marcadores superficiais e estruturas celulares), na função celular e alteração em atividades metabólicas das células, relacionadas com os processos de crescimento, senescência, diferenciação, etc (103, 104).

Outro aspecto importante a ser discutido é a possibilidade de ocorrência da formação de microcristais durante o congelamento, fato diretamente envolvido na lise celular, sendo esta uma das principais causas de morte celular (104,105).

Neste contexto, as células eritróides são especialmente sensíveis às estas variações, uma vez que a membrana eritróide desempenha funções específicas de grande importância, tais como transporte de moléculas e atividade antigênica (68).

Durante este trabalho, foram escolhidos alguns criopreservantes para realizar os testes de congelamento. O primeiro e mais utilizado é o dimetilsulfóxido (DMSO), que permeia as células progenitoras eritróides e evita a formação de cristais de água, além de apresentar bons resultados no processo de descongelamento. Outro criopreservante que pode ser utilizado é a solução comercial de hidroxietilamido (Voluven 6%), polímero de alto peso molecular que se caracteriza como uma mistura de polissacarídeos (amilose e amilopectina) que atua revestindo o exterior celular e auxilia na regulação da pressão osmótica celular (106).

O soro bovino fetal inativado (SFI), usado amplamente para realizar a suplementação de meios, é empregado nas soluções de congelamento e

descongelamento para dar condições mais adequadas de nutrição e proteção às células, principalmente no momento do descongelamento (102).

Foi utilizado, neste estudo, o anticoagulante ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose (ACD-A) (109). Este anticoagulante foi empregado visando à prevenção da formação dos grumos celulares que favorecem a morte das células, visto que a célula morta libera enzimas que podem lisar outras células.

As soluções com soro bovino fetal inativado (SFI), dimetilsulfóxido (DMSO), solução comercial de hidroxietilamido (Voluven 6%), solução comercial de anticoagulante ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose (ACD-A) foram as escolhidas por agregarem características que permitem o congelamento e descongelamento ideal. Assim, o coquetel criogênico foi elaborado com os criopreservantes DMSO, Voluven 6%, o anticoagulante ACD-A e SFI.

Ressalta-se ainda o papel do recipiente de congelamento da Thermo Scientific, denominado “Mr. Frosty”. O *Nalgene® Mr. Frosty®*, recipiente comercial que leva em seu interior álcool isopropílico (AIP) a 100%, auxiliou na redução da temperatura de congelamento celular em cerca de -1°C por minuto, garantindo melhores condições de congelamento celular e adequando as células às modificações de temperatura lentamente (108), evitando mudanças drásticas e morte celular.

Assim, neste trabalho, o melhor método para congelamento das células mononucleares da medula óssea foi àquele que empregou o coquetel criogênico e o recipiente comercial de congelamento gradual Mr. Frosty.

O processo de descongelamento também impacta na viabilidade celular das amostras ou de produtos criopreservados. Três fatores influenciam o processo de descongelamento: 1) o tempo de ar, que é referente ao tempo em que a amostra é retirada do nitrogênio líquido ou do freezer -80°C até o momento do processamento; 2) a taxa de descongelamento, referente a velocidade de descongelamento e 3) a agitação contínua, que reduz o gradiente térmico e melhora a distribuição do calor por toda a amostra e impede a formação de grumos (102).

Foi concluído, neste estudo, que o descongelamento com gotejamento de meio (método 2, descrito no item 3.2.1.3 de Materiais e Métodos) foi o melhor processo para recuperar as células mononucleares da medula óssea que estavam congeladas.

A viabilidade das células, com a utilização deste método, se manteve elevada e com taxa de apoptose baixa.

A determinação dos protocolos de criopreservação, descongelamento e armazenamento das células de BMNC de pacientes com NMP viabilizou a criação de um biobanco, que pudesse ser reprodutível e aplicável, não apenas ao nosso grupo de pesquisa, mas também para outros grupos que investigam precursores terminais eritróides nas NMP.

Finalizado o ajuste dos protocolos de congelamento e descongelamento, fez-se necessário adequar as quantidades celulares que seriam utilizadas no *sorting*, determinação das concentrações de anticorpos e calibração dos equipamentos (citômetro de fluxo e *cytospin*).

O número ideal de células para realização do *sorting* foi de 10^6 a 10^7 células contidas em 100 μ l de tampão no momento da marcação com os anticorpos. Os testes de titulação serviram para determinar a menor e melhor concentração de anticorpos para 10^6 a 10^7 células.

A padronização do número celular foi necessária devido ao fato de que flutuações nos números celulares (abaixo de 10^6 ou acima de 10^7 células) ou no volume de tampão levam a marcação inadequada das células de MOC e MOP, refletindo no imunofenótipo dos progenitores terminais eritróides, como aumento ou diminuição da fluorescência das células e mudança na densidade celular das populações eritróides.

A estratégia de *gates* do presente trabalho foi padronizada para obter os gradientes de diferenciação eritróides pelo *dot-plot* de CD49d (α -4-integrina) por Band3. A origem das células foi confirmada pela ferramenta de *backgating* do software FlowJo V10. Com sua aplicação, foi possível checar se todas as células da diferenciação terminal eritróide estavam dentro da *gate* de células viáveis e se eram células negativas para o marcador panleucocitário (CD45).

Após a confirmação da origem celular e obtenção do gradiente terminal eritróide, deu-se início a etapa de realização dos *sortings* das subpopulações de precursores terminais eritróides.

A padronização do *sorting* foi a que demandou mais adaptações de protocolo, pois as frequências de progenitores eritróides terminais deveriam ser corretamente estabelecidas pela análise das MOC e comprovadas por meio da avaliação da pureza e das micrografias de *cytospin*.

O estabelecimento da criação de *gates* para o *sorting* foi realizado com o uso da ferramenta computacional *heatmap* presente no software FlowJo v10. A utilização do *heatmap* proporcionou a visualização mais precisa do gradiente de diferenciação

terminal eritróide nas amostras de MOC e MOP, visto que foi possível obter as intensidades de fluorescência de Band3 no *dot-plot* de CD49d (α -4-integrina) por Band3. O *heatmap* de Band3 norteou a confecção manual das *gates* para o *sorting*, auxiliando na separação das subpopulações de precursores terminais eritróides das amostras de MOC e MOP.

Os resultados de cada *sorting* foram avaliados por meio pela observação das células separadas, fixadas e coradas nas lâminas de *cytospin*. Estas análises morfológicas das células separadas auxiliaram no estabelecimento e melhoramento das *gates* do *sorting*.

O presente trabalho explorou as novas ferramentas computacionais presentes no software FlowJo V10 para separar as subpopulações de precursores terminais eritróides. As análises *in silico* foram geradas para melhorar a realização do *sorting*, por meio de ferramentas de bioinformática incorporadas no software FlowJo v10. Foi possível realizar o agrupamento e clusterização das subpopulações de precursores terminais eritróides segundo a expressão celular de α -4-Integrina (CD49d) e Band3. Partindo do agrupamento realizado pelo *plugin* FlowSOM, puderam ser criadas *gates* mais em torno das subpopulações clusterizadas pelo FlowSOM para separar as subpopulações terminais eritróides de amostras de MO. Os experimentos gerados no FlowJo V10 podem ser exportados para o software FACSDiva, que é usado para adquirir os eventos na citometria de fluxo.

Houve, portanto, o uso de ferramenta computacional para realização da separação das subpopulações terminais eritróides *in silico*, o que pode tornar a separação destas subpopulações menos empírica, com menos tempo de ajuste nas *gates* do *sorting* e proporcionar maior pureza na obtenção das subpopulações de precursores terminais eritróides.

Por conta da escassez de amostras de MO e a necessidade de elevada celularidade para realização do *sorting*, não foi possível ainda validar os resultados obtidos com as análises *in silico*.

Pelo exposto, o presente trabalho padronizou os protocolos de separação, criopreservação, descongelamento das células mononucleares de medula óssea e estabeleceu método de citometria de fluxo capaz de determinar as frequências das subpopulações de precursores eritróides terminais em NMP.

5.2. Frequência e imunofenótipo dos precursores eritróides terminais da medula óssea em Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1-negativas*

A eritropoese, no indivíduo adulto, ocorre principalmente no microambiente da medula óssea, mais especificamente nas ilhas eritroblásticas, que estão aderidas à matriz extracelular medular. Essas ilhas são compostas por macrófagos centrais circundados por células eritróides imaturas e precursores eritróides terminais, que ocupam tal posição visando o amadurecimento e posterior ganho da circulação sanguínea, para assim, desempenhar suas funções (56).

As ilhas eritroblásticas são regiões dentro do nicho medular, nas quais as interações intracelulares entre macrófagos e progenitores eritróides terminais proporcionam a fina regulação da eritropoese. As interações célula-célula, célula-matriz extracelular e a sinalização de citocinas reguladoras regulam o processo de eritropoese, ou seja, a divisão e maturação dos precursores eritróides terminais (61, 88).

Nas medulas ósseas saudáveis, é esperado que ocorra a diferenciação exponencial do pro-eritroblasto (PRO) até o estágio de eritroblasto ortocromático (ORTO), por meio de mitoses sucessivas na qual um PRO dará origem a dois eritroblastos basofílicos iniciais (BASO I), os dois BASO I darão origem a quatro BASO II e assim sucessivamente até o estágio ORTO. A partir do eritroblasto ortocromático (ORTO), não é esperado que ocorram mitoses. Assim, no processo de maturação da linhagem eritróide, há um escalonamento no qual a soma dos eritroblastos policromáticos e ortocromáticos deve ser de 3 a 4 vezes a soma de pro-eritroblastos e eritroblasto basófilos (59, 63, 72).

Manter o balanço entre a divisão e diferenciação celular é importante para garantir a homeostasia da eritropoese. Alterações na frequência de progenitores eritróides podem induzir o desequilíbrio do processo de maturação da linhagem eritróide e, portanto, estão associadas à patogênese de doenças hematológicas, como as neoplasias mieloproliferativas (PV, TE e MF).

A avaliação da eritropoese por meio da análise de precursores eritróides terminais não é um procedimento simples, mas existem na literatura diferentes marcadores empregados para delimitar a maturação eritróide.

No presente estudo, foi empregado para quantificar as frequências dos precursores eritróides o método adaptado do trabalho de Hu e colaboradores (2013). Esta metodologia requer o uso de anticorpos anti-CD235a ou GPA, CD49d ou α -4-integrina

e CD233 ou Band3 e a análise especializada para interpretar as flutuações de frequência destas populações celulares por citometria de fluxo. Assim, foram desenvolvidos, neste estudo, protocolos de separação, criopreservação, descongelamento, marcação e clusterização *in silico* de amostras de medula óssea, bem como adaptações nas estratégias de *gate* para quantificar e isolar as subpopulações de progenitores eritróides da medula óssea.

A estratégia de Hu e colaboradores (2013) (59, 72) utiliza este pequeno painel de anticorpos capazes de detectar os marcadores de superfície CD235a ou GPA, CD49d ou α -4-integrina e CD233 ou Band3, possibilitando a obtenção dos precursores eritróides terminais com boa pureza e quantidade, permitindo a caracterização da eritropoese terminal normal (59).

Neste trabalho, foram utilizados os mesmos marcadores de superfície estabelecidos por Hu *et al.* (2013) para o isolamento e análises dos precursores terminais eritróides em controle e pacientes com NMP. Esta análise permitiu a avaliação da cinética e detecção de anormalidades nas frequências dos precursores eritróides em PV, TE e MF.

Com o uso desta estratégia, os precursores terminais eritróides no grupo controle, PV e TE foram separados com base nos gradientes de maturação dos marcadores CD49d (α -4-integrina) e Band3. Foram também obtidas as frequências das subpopulações envolvidas no processo de eritropoese dos pacientes com PV e TE. Nas amostras de MF, não foi possível visualizar a formação do gradiente de diferenciação terminal eritróide.

O presente trabalho foi pioneiro na investigação da diferenciação terminal eritróide em amostras de medula óssea de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas e permitiu estabelecer as frequências destas subpopulações celulares com base nos níveis de estadiamento do gradiente de diferenciação terminal eritróide.

Yan e colaboradores (2021), recentemente, refinaram a estratégia de isolamento de progenitores terminais eritróides. Estes autores introduziram novos marcadores de superfície para isolar com maior grau de pureza não só os precursores eritróides terminais, mas também os precursores mais precoces da eritropoese: BFU-E e CFU-E. Esta nova estratégia utiliza para imunofenotipar os precursores eritróides os marcadores CD34, CD36, CD71, CD117 e CD105. Neste método, como na estratégia anterior de Hu e colaboradores, forma-se o gradiente de diferenciação eritróide pelo qual podem ser

obtidos os progenitores terminais eritróides com alta pureza e determinar a frequência das células, além da possibilidade de isolamento de BFU-E e CFU-E (93).

Nossos resultados de frequência das subpopulações de precursores eritróides terminais no grupo controle foram semelhantes aos descritos no trabalho de Hu e colaboradores (2013). Em todas as amostras de MOC, foi possível estabelecer o gradiente maturativo e obter as respectivas frequências de cada subpopulação. Desta forma, os resultados foram validados.

O número amostral, infelizmente, foi pequeno devido às limitações da pandemia e escassez de amostras de indivíduos normais no período de 2020-2022, o que impediu que uma faixa de normalidade pudesse ser empregada com propriedade e difundida.

Na PV, a análise dos gradientes maturativos dos precursores terminais eritróides mostrou aumento de frequência na subpopulação de pró-eritroblastos (PRO) quando comparado com os controles e pacientes com TE. Embora ocorra aumento nesta subpopulação, não foi observado aumento de frequência das subpopulações subsequentes, o que nos mostra que o gradiente maturativo das demais subpopulações terminais eritróides (BASO, POLI e ORTO) aparentemente se mantém semelhante ao que foi observado para o grupo controle.

Sabe-se que pacientes com PV apresentam aumento da massa eritrocitária no sangue periférico (97), ou seja, nossos achados apontam que, mesmo havendo certa similaridade na dinâmica maturativa de diferenciação terminal na PV e nos controles, é possível observar aumento de eritrócitos maduros no sangue periférico. Nesse sentido, o aumento da frequência da subpopulação PRO pode ter impacto sobre a exacerbação da eritropoese presente na PV e, conseqüentemente, estar associada ao aumento de eritrócitos no sangue periférico destes pacientes. Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares que regulam esta dinâmica de exacerbação da eritropoese e a influência direta na frequência da subpopulação PRO precisam ser alvo de mais estudos.

Na TE, foi observado aumento na frequência da subpopulação ORTO em comparação com o grupo controle e pacientes com PV. Apesar da maior frequência da subpopulação ORTO, pacientes com TE não apresentam maior massa eritrocitária na MO ou sangue periférico. Na literatura, dados abordando a frequência e o perfil imunofenotípico da linhagem eritróide de pacientes com TE são inexistentes.

Na comparação entre os resultados obtidos para as frequências das subpopulações celulares na PV e TE, foi observado na PV que o aumento de frequência ocorre no início da diferenciação, enquanto que na TE ocorre na fase final da

diferenciação terminal eritróide. Estes achados indicam uma dinâmica distinta da eritropoese entre as NMP.

Na MF, foram observadas visualmente no *dot-plot* de α -4-integrina por Band3 apenas duas populações celulares, uma com expressão intermediária para α -4-integrina e elevada expressão de Band3 e outra que apresentava apenas elevada expressão de Band3. Estas observações foram confirmadas pela análise da expressão dos marcadores α -4-integrina e Band3 utilizando a ferramenta *heatmap* do software FlowJo V10.

Foram criadas duas *gates* nas populações celulares encontradas no *dot-plot* de α -4-integrina por Band3. Na primeira *gate*, foram observadas células correspondentes às subpopulações POLI e ORTO, mas não foram visualizadas células das subpopulações PRO e BASO. Nesta *gate* não foi possível estabelecer a frequência e nem a pureza de nenhuma destas subpopulações (POLI e ORTO). Na segunda *gate*, não foi observada a presença de células imaturas ou maduras correspondentes a linhagem, as lâminas de *cytospin* continham apenas restos celulares que não puderam ser identificados. Desta forma, não foi possível estabelecer a frequência dos precursores terminais eritróides na MF e nem compará-los com as frequências dos controles e com as dos pacientes com PV e TE.

Os resultados de MF precisam ser confirmados, pois foram analisadas apenas três amostras de pacientes. Faz-se necessário confirmar que as únicas subpopulações celulares da diferenciação eritróide terminal, POLI e ORTO, estão presentes na MO destes pacientes. Talvez a frequência de PRO e BASO na MO de pacientes com MF definitivamente sejam baixas, o que impossibilita a análise por esta metodologia. Pode-se ainda especular que a expressão dos marcadores empregados (α -4-integrina e Band3) para obter o gradiente maturativo não sejam os adequados para separar os precursores eritróides terminais em pacientes com MF, pelo fato de as células apresentarem expressão alterada destes marcadores. Pode-se supor ainda que a ausência de gradiente maturativo terminal eritróide, detectado por α -4-integrina e Band3, na MF, indica a desregulação na dinâmica maturativa das subpopulações eritróides.

Sabe-se que a eritropoese é um processo extremamente dinâmico e rápido, que em condições alteradas, pode se tornar ineficaz ou exacerbada. Ao desequilíbrio eritropoético é dado o nome de eritropoese de estresse, cujos mecanismos são dependentes de mudanças como nos níveis de eritropoetina, na expressão dos receptores de eritropoetina, nas vias de sinalização por meio da interação com as integrinas de membrana e na ativação do eixo JAK-STAT (89).

Em NMP, a literatura relata que na PV há eritropoese exacerbada e na MF a eritropoese é ineficaz, o que nos permite especular que as informações sobre as frequências destes precursores eritróides poderiam nos fornecer informações relevantes sobre a cinética das alterações da eritropoese nestes pacientes.

Nossos dados corroboram com a afirmação de que a PV apresenta eritropoese desregulada e exacerbada. Na TE não é esperado que exista exacerbção ou ineficiência da eritropoese, sendo a eritropoese, nesta doença, muito próxima da eritropoese fisiológica.

Com relação a PV, foi descrito pela literatura que os progenitores eritróides dos pacientes sofrem aceleração nos processos de proliferação e maturação celular *in vitro*, que dura 21 dias (95). Este estudo reportou alterações no ciclo celular em células eritróides de pacientes com PV. O tempo de duração da fase S do ciclo celular estava aumentado e as fases G0 e G1 reduzidas em comparação aos controles (95).

No que tange a MF, há relatos na literatura da provável alteração em fatores de transcrição fundamentais para a correta diferenciação eritróide, sendo um deles o GATA1. O GATA1 é um dos fatores responsáveis por comissionar as células tronco para a linhagem eritróide por meio da repressão de expressão de GATA2. O fator de transcrição GATA2, por sua vez, possui papel importante no comissionamento das células da linhagem mieloide, como os megacariócitos, mastócitos e monócitos. Nos monócitos, GATA2 é reprimido pelo fator de transcrição purina box 1 (PU.1). Em megacariócitos, GATA 1 e GATA2 regem a diferenciação dessas células conjuntamente (110).

Há relatos na literatura da possível utilização de GATA1 como um biomarcador na diferenciação entre TE e MF, visto que na TE e na PV há aumento da expressão deste fator de transcrição nos megacariócitos e na MF diminuição (111). Portanto, as possíveis alterações da dinâmica de maturação terminal eritróide nos pacientes com PV, TE e MF podem estar ligadas à desregulação na expressão de GATA1.

A expressão alterada do fator GATA1 parece ser um dos mecanismos envolvidos na mudança da dinâmica de diferenciação eritróide terminal nestas doenças.

Anormalidades da eritropoese foram relatadas em outras doenças hematológicas, como na beta-talassemia e SMD (82, 90), mas, até a presente data, o único trabalho da literatura que correlacionou a diferenciação terminal eritróide com a fisiopatologia de doenças hematológicas foi o de Ali e colaboradores (2018).

Ali e colaboradores (2018) aplicaram a estratégia de isolamento das subpopulações de precursores eritróides terminais desenvolvida por Hu *et al.* (2013) em amostras de medula óssea de 221 pacientes com SMD. Este estudo revelou que, com relação a diferenciação terminal eritróide, as SMD podem ser classificadas em dois grandes grupos: 1) grupo em que é possível visualizar a formação do gradiente de diferenciação eritróide terminal e 2) grupo no qual os gradientes de diferenciação não puderam ser quantificados nem visualizados (94), como no caso da MF.

O trabalho de Ali e colaboradores (2018) relatou que pacientes pertencentes ao grupo sem formação do gradiente maturativo eritropoético (α -4-integrina por Band3) apresentaram menor sobrevida quando comparado ao grupo de pacientes que apresentaram o gradiente de diferenciação terminal eritróide (94).

A ausência da formação do gradiente maturativo eritróide nos pacientes com SMD foi associada à menor sobrevida independente da pontuação do escore de risco determinado pelo sistema internacional de pontuação prognóstica revisada (IPSS-R) em que os pacientes estavam classificados. Os autores sugeriram que a ausência do gradiente maturativo pode, portanto, ser usada como um marcador de mal prognóstico nos pacientes com SMD (94).

Outro dado interessante que foi apresentado pelo trabalho de Ali e colaboradores (2018) diz respeito a anemia presente na SMD. Nestes casos, a anemia foi mais pronunciada nos pacientes pertencentes ao grupo sem a formação de gradiente terminal eritróide (94).

Os achados de Ali e colaboradores (2018) podem ser extrapolados para os resultados obtidos no presente trabalho. Na PV e TE foi observado em todas as amostras a formação do gradiente de diferenciação eritróide terminal, mas o mesmo não foi encontrado para nenhuma das amostras de MF.

Sabe-se que pacientes com MF apresentam anemia, pior prognóstico, menor expectativa de vida, inflamação e maior instabilidade genética dentre as NMP.

Até a presente data, o trabalho de Ali e colaboradores (2018) foi o único a correlacionar as subpopulações de precursores eritróides terminais com as mudanças na dinâmica da eritropoese. Assim sendo, esta área de investigação em Hematologia ainda é incipiente.

A literatura relacionada ao tema NMP e eritropoese é muito escassa e ainda carece de trabalhos que descrevam alterações na linhagem eritróide nestas doenças. A maior parte dos trabalhos pertinentes ao estudo da eritropoese em NMP é restrita a

estudos *in vitro* com maior foco na PV, sendo que poucos que abordam a diferenciação terminal da linhagem eritróide.

Os achados descritos no presente trabalho indicam a existência de alterações na cinética de diferenciação terminal eritróide em pacientes com NMP.

Neste sentido, faz-se necessária a realização de novos estudos que elucidem os mecanismos moleculares que possam explicar a ocorrência de alterações da dinâmica de diferenciação terminal eritróide em NMP.

6. CONCLUSÃO

- 1) Os marcadores CD49d (α -4-integrina) e Band3 podem ser usados para determinar a frequência e o imunofenótipo das subpopulações eritróides terminais da MO de indivíduos saudáveis e de pacientes com PV e TE;
- 2) Os marcadores CD49d (α -4-integrina) e Band3 não separam as subpopulações eritróides terminais dos pacientes com MF;
- 3) As ferramentas *backgating*, *heatmap* e FlowSOM são importantes para refinar as análises de imunofenotipagem e auxiliam na criação de *gates* para realização de *sorting* celular;
- 4) Na PV, há aumento da frequência da subpopulação de pró-eritroblastos na medula óssea;
- 5) Na TE, há aumento da frequência da subpopulação de eritroblastos ortocromáticos na medula óssea.

7. REFERÊNCIAS

1. CACEMIRO MDC, COMINAL JG, TOGNON R, et al. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms as disorders marked by cytokine modulation. **Hematol Transfus Cell Ther**, v. 40, p. 120–131, 2018.
2. SPIVAK JL. Myeloproliferative neoplasms. **New Engl J Med**, v. 376, p. 894-896, 2017.
3. LONGO DL, Myeloproliferative neoplasms. **New Engl J Med**, v. 376, p. 2168-2181, 2017.
4. TEFFERI A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. **Leukemia**, v. 22, p. 3-13, 2008.
5. DAMESHEK W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. **Blood**, v. 6, p. 372-375, 1951.
6. ARBER DA, ORAZI A, HASSERJIAN R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, p. 2391-2405, 2018.
7. FOWLKES S, MURRAY C, FULFORD A et al. Myeloproliferative neoplasms (MPNs)–Part 1: An overview of the diagnosis and treatment of the “classical” MPNs. **Can Oncol Nurs J**, v. 28, p. 262-268, 2018.
8. KLEIN A, VAN KESSEL AG, GROSVELD G et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 300, p. 765-767, 1982.
9. SPIVAK JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. **Blood**, v. 100, p. 4272-4290, 2002.
10. BARBUI T, THIELE J, GISSLINGER H et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. **Blood Cancer J**, v. 8, p. 1-11, 2018.
11. FISHER MJ, PRCHAL JF, PRCHAL JT et al. Anti-erythropoietin (EPO) receptor monoclonal antibodies distinguish EPO-dependent and EPO-independent erythroid progenitors in polycythemia vera. **Blood**, v. 84, p. 1982-1991, 1994.
12. VANNUCCHI AM, ANTONIOLI E, GUGLIELMELLI P et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2 V617F allele burden. **Leukemia**, v. 21, p. 1952-1959, 2007.
13. SPIVAK JL, CONSIDINE M, WILLIAMS DM et al. Two clinical phenotypes in polycythemia vera. **New Engl J Med**, v. 371, p. 808-817, 2014.
14. FINAZZI G & BARBUI T. Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Leukemia**, v. 22, p. 1494-1502, 2008.
15. TEFFERI A & BARBUI T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and management. **Am J Hematol**, v. 92, p. 94-108, 2017.
16. MOULARD O, MEHTA J, FRYZEK J et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. **Eur J Haematol**, v. 92, p. 289-297, 2014.

17. MITRA D, KAYE JA, PIECORO LT et al. Symptom burden and splenomegaly in patients with myelofibrosis in the United States: a retrospective medical record review. **Cancer Med**, v. 2, p. 889-898, 2013.
18. TEFFERI A, GUGLIEMELLI P, LARSON DR et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. **Blood**, v. 124, p. 2507-2513, 2014.
19. MASCARENHAS J. A concise update on risk factors, therapy, and outcome of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 16, S124-S129, 2016.
20. SCHIEBER M, CRISPINO JD, STEIN B. Myelofibrosis in 2019: moving beyond JAK2 inhibition. **Blood Cancer J**, v. 9, p. 1-11, 2019.
21. SANTOS FP, GETTA B, MASAROVA L et al. Prognostic impact of RAS-pathway mutations in patients with myelofibrosis. **Leukemia**, v. 34, p. 799-810, 2020.
22. GUGLIEMELLI P, LASHO TL, ROTUNNO G et al. MIPSS70: mutation enhanced international prognostic score system for transplantation age patients with primary myelofibrosis. **J Clin Oncol**, v. 36, p. 310-318, 2018.
23. PASSAMONTI F, CERVANTES F, VANNUCCHI AM et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). **Blood**, v. 115, p. 1703-1708, 2010.
24. RUMI E & CAZZOLA M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, p. 680-692, 2017.
25. MESA RA, VERSTOVSEK S, CERVANTES F et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). **Leuk Res**, v. 31, p. 737-740, 2007.
26. TEFFERI A, SKODA R, VARDIMAN JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 6, p. 627-637, 2009.
27. JAME C, UGO V, CASADEVALL N et al. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. **Trends Mol Med**, v. 11, p. 546-554, 2005.
28. TEFFERI A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. **Leukemia**, v. 24, p. 1128-1138, 2010.
29. PERCY MJ & McMULLIN MF. The V617F JAK2 mutation and the myeloproliferative disorders. **Hematol Oncol**, v. 23, p. 91-93, 2005.
30. QUELLE FW. Cytokine signaling to the cell cycle. **Immunol Res**, v. 39, p. 173-184, 2007.
31. VAINCHENKER W & KRALOVICS R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, p. 667-679, 2017.

32. JAMES C, UGO V, LE COUÉDIC J et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, p. 1144, 2005.
33. KILADJIAN JJ. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. **ASH Education Program Book**, p. 561-566, 2012.
34. BENCH AJ, WHITE HE, FORONI L et al. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK 2 V 617 F and other relevant mutations. **Br J Haematol**, v. 160, p. 25-34, 2013.
35. PIETRA D, LI S, BRISCI A et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 111, p. 1686-1689, 2008.
36. LANGABEER SE, ANDRIKOVICS H, ASP J et al. Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. **Eur J Haematol**, v. 95, p. 270-279, 2015.
37. MEAD AJ & MULLALLY A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. **Blood**, v. 129, p. 1607-1616, 2017.
38. KLAMPFL T, GISSLINGER H, HARUTYUNYAN AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **New Eng J Med**, v. 369, p. 2379-2390, 2013.
39. MASCARENHAS J, ROPER N, CHAURASIA P, HOFFMAN R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. **Clin Epigenet**, v. 2, p. 197, 2011.
40. GONG JZ, COOK JR, GREINER TC et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology. **J Mol Diagn**, v. 15, p. 733-744, 2013.
41. MICHIELS JJ. Myeloproliferative and thrombotic burden and treatment outcome of thrombocytopenia and polycythemia patients. **World J C Care Med**, v. 4, p. 230, 2015.
42. TEFFERY A, VAINCHENKER W. "Myeloproliferative Neoplasms: Molecular Pathophysiology, Essential Clinical Understanding, and Treatment Strategies". **J Clin Oncol**, v 29, p. 572-582, 2011.
43. KIM SY, BAE SH, BANG SM et al. The 2020 revision of the guidelines for the management of myeloproliferative neoplasms. **Korean J Intern Med**, v. 36, p. 45-62, 2021.
44. TEFFERY, A. Myeloproliferative neoplasms: a decade of discoveries and treatment advances. **Am J Hematol**, v. 91, p. 50-58, 2016.
45. ALVAREZ-LARRÁN A et al. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. **Brit J Haematol**, v. 146, p. 504-509, 2009.
46. NAZHA A & GERDS AT. Where to Turn for Second-Line Cytoreduction After Hydroxyurea in Polycythemia Vera? **Oncologist**, v. 21, p. 475-480, 2016.
47. CHESON BD & RUMMEL MJ. Bendamustine: rebirth of an old drug. **J Clin Oncol**, v. 27, p. 1492-1501, 2009.

48. TIBES R, BOGENBERGER JM, BENSON KL, MESA RA. Current outlook on molecular pathogenesis and treatment of myeloproliferative neoplasms. **Mol Diag Ther**, v. 16, p. 269-283, 2012.
49. BJÖRKHOLM M, DEROLF ÅR, HULTCRANTZ, M et al. Treatment-related risk factors for transformation to acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in myeloproliferative neoplasms. **J Clin Oncol**, v. 29, p. 2410-2415, 2011.
50. BALLENK K, SHRESTHA S, SOBOCINSKI KA et al. Outcome of transplantation for myelofibrosis. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 3, p. 358-367, 2010.
51. BADAR T, KANTARJIAN HM, RAVANDI F et al. Therapeutic benefit of decitabine, a hypomethylating agent, in patients with high-risk primary myelofibrosis and myeloproliferative neoplasm in accelerated or blastic/acute myeloid leukemia phase. **Leukemia Res**, v. 39, p. 950-956, 2018.
52. GUERRA VA, KANTARJIAN HM, CORTES JE et al. A Phase II Trial of Azacitidine (AZA) in Combination with Ruxolitinib (RUX) in Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Neoplasms (MDS/MPNs), **Blood**, Suplementar 134, 2019.
53. HOBBS GS, ROZELLE S, MULLALLY A. The development and use of Janus kinase 2 inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 31, p. 613-626, 2017.
54. MANWANI D & BIEKER JJ. The Erythroblastic Island. **Curr Top Dev Biol**, v. 82, p. 23-53, 2008.
55. RAMOS P, CASU C, GARDENGHI S et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in Polycythemia Vera and Beta-Thalassemia. **Nat Med**, v. 19, p. 437-445, 2013.
56. DZIERZAK E & PHILIPSEN S. Erythropoiesis: development and differentiation. **Cold Spring Harbor Perspec Med**, v. 3, a011601, 2013.
57. HU J, LIU J, XUE F et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. **Blood**, v. 121, p. 3246-3253, 2013.
58. DULMOVITS BM, HOM J, NARLA A et al. Characterization, regulation and targeting of erythroid progenitors in normal and disordered human erythropoiesis. **Curr Opin Hematol**, v. 24, p. 159-166, 2017.
59. HU J, LIU J, XUE F et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. **Blood**, v. 121, p. 3246-3253, 2013.
60. AN X, SCHULZ VP, LI J et al. Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. **Blood**, v. 123, p. 3466-3477, 2014.
61. LI W, GUO R, SONG Y, JIANG Z. Erythroblastic Island Macrophages Shape Normal Erythropoiesis and Drive Associated Disorders in Erythroid Hematopoietic Diseases. **Front Cell Dev Biol**, v. 8, p. 1858, 2021.
62. VALENT P, BÜSCHE G, THEURL I et al. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. **Haematol**, v. 103, p. 1593-1603, 2018.

63. OLIVEIRA RA, PEREIRA J, BEITLER B. Mielograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo em hematologia: prática e interpretação. Rio de Janeiro: **Roca**, 1ª edição, 2016.
64. NEMKOV T, REISZ JÁ, XIA Y et al. Red blood cells as an organ? How deep omics characterization of the most abundant cell in the human body highlights other systemic metabolic functions beyond oxygen transport. **Expert Rev Proteomics**, v. 15, p. 855-864, 2018.
65. HSU K. Exploring the Potential Roles of Band 3 and Aquaporin-1 in Blood CO₂ Transport—Inspired by Comparative Studies of Glycophorin BAB Hybrid Protein GP. **Mur. Front Physiol**, v. 9, p. 733, 2018.
66. FÖLLER M, HUBER SM, LANG F. Erythrocyte programmed cell death. **IUBMB Life**, v. 60, p. 661-668, 2008.
67. SOMERSALO E, OCCHIPINTI R, BORON WF, CALVETTI D. A reaction–diffusion model of CO₂ influx into an oocyte. **J Theor Biol**, v. 309, p. 185-203, 2012.
68. SAYYADIPOUR F, AMIRIZADEH N, OODI A et al. Red Blood Cells are Appropriate Carrier for Coagulation Factor VIII. **Cardiovascular Haematol Disord Drug Targets**, v. 20, p. 131-137, 2020.
69. MAO B, HUANG S, LU X et al. Early development of definitive erythroblasts from human pluripotent stem cells defined by expression of glycophorin A/CD235a, CD34, and CD36. **Stem Cell Rep**, v. 7, p. 869-883, 2016.
70. MIETTINEN M & LASOTA J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 13, p. 205-220, 2005.
71. PIERELLI L, BONANNO G, RUTELLA S et al. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. **Leuk Lymphoma**, v. 42, p. 1195-1206, 2001.
72. AN X & CHEN L. Flow cytometry (FCM) analysis and fluorescence-activated cell sorting (FACS) of erythroid cells. **Methods Mol Biol**, vol 1698, p. 153-174, 2018.
73. CHASIS JA & MOHANDAS N. Red blood cell glycophorins. **Blood**, v. 80, p. 1869-1879, 1992.
74. PRETINI V, KOENEN MH, KAESTNER L et al. Red blood cells: chasing interactions. **Front Physiol**, v. 10, p. 945, 2019.
75. KURANO M, NISHIKAWA M, KUMA H et al. Involvement of Band3 in the efflux of sphingosine 1-phosphate from erythrocytes. **PLoS One**, v. 12, e0177543, 2017.
76. OORE-OFE O, SOMA P, BUYS AV et al. Characterizing pathology in erythrocytes using morphological and biophysical membrane properties: Relation to impaired hemorheology and cardiovascular function in rheumatoid arthritis. **Biochim Biophys Acta Biomemb**, v. 1859, p. 2381-2391, 2017.
77. SHINDE AV, KELSH R, PETERS JH et al. The $\alpha 4\beta 1$ integrin and the EDA domain of fibronectin regulate a profibrotic phenotype in dermal fibroblasts. **Matrix Biol**, v. 41, p. 26-35, 2015.
78. LOBB RR & HEMLER ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. **J Clin Invest**, v. 94, p. 1722-1728, 1994.

79. YUSUF-MAKAGIANSAR H, ANDERSON E, YAKOVLEVA V et al. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Med Res Ver**, v. 2, p 146-67, 2002.
80. TELEN MJ. Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules. **Transfus Med Rev**, v. 19, p. 32-44, 2005.
81. ARROYO AG, YANG JT, RAYBURN H, HYNES RO. α 4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors in vivo. **Immunity**, v. 11, p. 555-566, 1999.
82. ZIVOT A, LIPTON JM, NARLA A, BLANC L. Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. **Mol Med**, v. 24, p. 1-15, 2018.
83. RIABOV V, MOSSNER M, STÖHR A et al. High erythroferrone expression in CD71+ erythroid progenitors predicts superior survival in myelodysplastic syndromes. **Brit J Haematol**, v. 192, p. 879-891, 2021.
84. HOPFER O, NOLTE F, MOSSNER M et al. Epigenetic dysregulation of GATA1 is involved in myelodysplastic syndromes dyserythropoiesis. **Eur J Haematol**, v. 88, p. 144-153, 2012.
85. LING T, CRISPINO JD, ZINGARIELLO M et al. GATA1 insufficiencies in primary myelofibrosis and other hematopoietic disorders: consequences for therapy. **Expert Rev Hematol**, v. 11, p. 169-184, 2018.
86. VENUGOPAL S & MASCARENHAS J. Novel therapeutics in myeloproliferative neoplasms. **J Hematol Oncol**, v. 13, p. 1-13, 2020.
87. VALENT P, BÜSCHE G, THEURL I et al. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. **Haematol**, v. 103, p. 1593-1604, 2018.
88. CHASIS JA. Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis. **Curr Opin Hematol**, v. 13, p. 137-141, 2006.
89. RAMOS P, CASU C, GARDENGI S, et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. **Nature Med**, v. 19, p. 437-445, 2013.
90. GINZBURG Y & RIVELLA S. β -thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. **Blood**, v. 118, p. 4321-4330, 2011.
91. LAUBACH JP, FU P, JIANG X et al. Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. **Exp Hematol**, v. 37, p. 1411-1422, 2009.
92. TEFFERI A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. **Am J Hematol**, v. 96, p. 145-162, 2021.
93. YAN H, ALI A, BLANC L et al. Comprehensive phenotyping of erythropoiesis in human bone marrow: Evaluation of normal and ineffective erythropoiesis. **Am J Hematol**, v. 96, p. 1064-1076, 2021.
94. ALI AM, HUANG Y, PINHEIRO RF et al. Severely impaired terminal erythroid differentiation as an independent prognostic marker in myelodysplastic syndromes. **Blood Adv**, v. 2, p. 1393-1402, 2018.

95. BRUCHOVA H, YOON D, AGARWA A et al. Erythropoiesis in polycythemia vera is hyper-proliferative and has accelerated maturation. **Blood Cells Mol Dis**, v. 43, p. 81-87, 2009.
96. JI YQ, ZHANG YQ, LI MQ et al. EPO improves the proliferation and inhibits apoptosis of trophoblast and decidual stromal cells through activating STAT-5 and inactivating p38 signal in human early pregnancy. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, p. 765–774, 2011.
97. HASSELBALCH HC. Time for revival of the red blood cell count and red cell mass in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and polycythemia vera?. **Haematol**, v. 104, p. 2119–2125, 2019.
98. MONACO, G et al. flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. **Bioinformatics**, v. 32, p. 2473-2480, 2016.
99. VAN GASSEN S et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. **Cytometry Part A**, v. 87, p. 636-645, 2015.
100. HUBEL A. **Preservation of cells: a practical manual**. John Wiley & Sons, 2018.
101. GINIS I; GRINBLAT B; SHIRVAN H. Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 18, p. 453-463, 2012.
102. WOODS, EJ et al. Off the shelf cellular therapeutics: factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. **Cytotherapy**, v. 18, p. 697-711, 2016.
103. GAO D, CRITSER JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR J**, v.41, p. 187-96, 2000.
104. MENEGHEL J, KILBRIDE P, MORRIS GJ. Cryopreservation as a Key Element in the Successful Delivery of Cell-Based Therapies-A Review. **Front Med (Lausanne)**, v. 26, 2020.
105. MAZUR P, SEKI S, PINN IL et al. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. **Cryobiology**, v. 51, p. 29-53, 2005.
106. BAKKEN AM. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 1, p. 47-54, 2006.
107. VOLUVEN® 6%. GARCIA CMP. Local: Aquiraz – CE, 2014. **Bula de medicamento**
108. LI R, JOHNSON R, YU G et al. Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials. **Cytotherapy**, v. 21, p:943-957, 2019.
109. ACD-A. Biomet U.K. Ltd. Local: Bridgend, South Wales. **Bula de medicamento**
110. HIRABAYASHI S, WLODARSKI MW, KOZYRA E et al. Heterogeneity of GATA2-related myeloid neoplasms. **Int J Hematol**, v. 106, p. 175-182, 2017.
111. LALLY J, BOASMAN K, BROWN C et al. GATA-1: A potential novel biomarker for the differentiation of essential thrombocythemia and myelofibrosis. **J Thromb Haemost**, v. 17, p. 896-900, 2019.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da FCFRP-USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 010/2020
kms

Ribeirão Preto, 28 de maio de 2020.

Ao pesquisador
Gabriel Dessotti Barretto
Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

Informamos que o protocolo de pesquisa intitulado “**Avaliação imunofenotípica e molecular dos precursores eritróides em Neoplasias Mieloproliferativas**” (CAAE: 29030620.9.0000.5403 – Protocolo CEP/FCFRP nº 526), foi aprovado “ad referendum” do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em 05/05/2020, conforme Parecer Consubstanciado nº 4.008.735, e referendado por unanimidade em sua 196ª reunião ordinária realizada em 22/05/2020.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador principal: Gabriel Dessotti Barretto

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Projeto de Pesquisa: “Avaliação imunofenotípica e molecular dos precursores eritróides em Neoplasias Mieloproliferativas”

Coleta e armazenamento de amostras biológicas (Pacientes)

O (a) Senhor (a) está sendo convidado a doar e permitir o uso de sua amostra de medula óssea para a atual pesquisa, cujo título é “Avaliação imunofenotípica e molecular dos precursores eritróides em Neoplasias Mieloproliferativas”, e para futuras pesquisas científicas na área de Hematologia (ciência que estuda o sangue). A cada nova pesquisa com esse material, o (a) Senhor (a) será procurado para receber explicações e autorizar ou não a utilização da sua amostra já armazenada.

A pesquisa a ser desenvolvida atualmente tem como objetivo compreender quais alterações ocorrem nas células que dão origem aos glóbulos vermelhos do sangue em pacientes portadores de Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose. Para isso, iremos coletar 8 ml (dois tubos roxos) de sua medula óssea e, em laboratório, isolar essas células, para estudarmos como elas se comportam em indivíduos doentes, de modo a compreender de que maneira elas influenciam no surgimento e na evolução destas doenças.

Desta maneira, ao concordar em ceder sua medula óssea para nossas análises, iremos avaliar quais diferenças existem entre essas células e como podem estar associadas ao quadro de sua doença.

Caso concorde, o (a) Senhor (a) doará uma amostra de medula óssea. A coleta de medula óssea poderá causar dor, inchaço ou rouidão no local da coleta. Sua amostra e seus dados coletados serão identificados por números, de modo que seu nome não apareça e que você não seja identificado. Após coletada, a amostra será guardada por 10 anos em um BIORREPOSITÓRIO (banco de amostras biológicas), intitulado Biorrepositório do Laboratório de Fisiopatologia das Doenças Hematológicas da FCFRP, localizado na sala multiusuários 46A-M, segundo andar do bloco M da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-RP em condições adequadas de armazenamento, sob responsabilidade da Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro. Ao final deste tempo de armazenamento, a amostra será devidamente descartada.

O (a) Senhor (a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato comigo nos telefones citados no final deste documento, para que eu possa suspender o armazenamento da sua amostra, que poderá ser entregue ao/à Senhor (a), se assim desejar, ou descartada após seu consentimento por escrito.

Caso não concorde em doar 8 ml de medula óssea ou desista de participar da pesquisa ou de manter sua amostra armazenada, essa decisão não lhe trará qualquer penalização ou prejuízo.

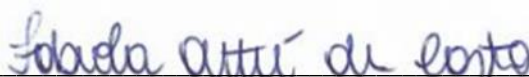
A coleta deste material biológico nesse momento não trará nenhum benefício imediato para o (a) Senhor (a), entretanto, no futuro, os dados obtidos com novas pesquisas poderão ajudar outras pessoas doentes. Coloco-me à disposição para lhe fornecer o resultado da pesquisa realizada com sua amostra.

O senhor (a) não terá benefícios imediatos participando desta pesquisa, mas contribuirá com o melhor entendimento de doenças do sangue, como neste caso as Neoplasias Mieloproliferativas.

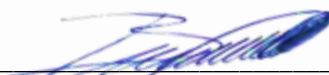
Esta pesquisa não lhe trará nenhum custo ou gasto, entretanto, caso seja necessário, os gastos decorrentes da pesquisa serão ressarcidos e em caso de dano também decorrente da pesquisa o (a) Senhor (a) será indenizado. O (a) Senhor (a) terá garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa.

Toda nova pesquisa utilizando sua amostra biológica será realizada somente quando o projeto for aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP.

Em caso de dúvidas éticas, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, no endereço Avenida do Café, s/n, Campus Universitário, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto/SP ou pelo telefone (16) 3315-4213, de segunda à sexta-feira das 8h00 às 12h00. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão de caráter consultivo, normativo, deliberativo e educativo, com instituído de defender os interesses dos sujeitos da pesquisa e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões ético-científicos.



Profa. Dra. Fabíola Atti de Castro
(16) 3315-4163/ (16) 99613-0791
castrofabiola@hotmail.com



Gabriel Dessotti Barretto
(16)98119-4693
gabrielbarretto@usp.br

Participante da Pesquisa

Li e concordo em participar da pesquisa.

Assinatura do Doador ou responsável legal

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

ANEXO C –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador principal: Gabriel Dessotti Barretto

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Projeto de Pesquisa: “Avaliação imunofenotípica e molecular dos precursores eritróides em Neoplasias Mieloproliferativas”

Coleta e armazenamento de amostras biológicas (Controle)

O (a) Senhor (a) está sendo convidado a doar e permitir o uso de sua amostra de medula óssea para a atual pesquisa, cujo título é “Avaliação imunofenotípica e molecular dos precursores eritróides em Neoplasias Mieloproliferativas”, e para futuras pesquisas científicas na área de Hematologia (ciência que estuda o sangue). A cada nova pesquisa com esse material, o (a) Senhor (a) será procurado para receber explicações e autorizar ou não a utilização da sua amostra já armazenada.

A pesquisa a ser desenvolvida atualmente tem como objetivo compreender quais alterações ocorrem nas células que dão origem aos glóbulos vermelhos do sangue em pacientes portadores de Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose. Para isso, iremos coletar 8 ml (dois tubos roxos) de sua medula óssea e, em laboratório, isolar essas células, para estudarmos como elas se comportam em indivíduos saudáveis em comparação com indivíduos doentes, de modo a compreender de que maneira elas influenciam no surgimento e na evolução destas doenças.

Desta maneira, ao concordar em ceder sua medula óssea para nossas análises, iremos avaliar quais diferenças existem entre essas células e como podem estar associadas ao quadro dos pacientes que possuem a doença.

Caso concorde, o (a) Senhor (a) doará uma amostra de medula óssea. A coleta de medula óssea poderá causar dor, inchaço ou rouidão no local da coleta. Sua amostra e seus dados coletados serão identificados por números, de modo que seu nome não apareça e que você não seja identificado. Após coletada, a amostra será guardada por 10 anos em um BIORREPOSITÓRIO (banco de amostras biológicas), intitulado Biorrepositório do Laboratório de Fisiopatologia das Doenças Hematológicas da FCFRP, localizado na sala multiusuários 46A-M, segundo andar do bloco M da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-RP em condições adequadas de armazenamento, sob responsabilidade da Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro. Ao final deste tempo de armazenamento, a amostra será devidamente descartada.

O (a) Senhor (a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato comigo nos telefones citados no final deste documento, para que eu possa suspender o armazenamento da sua amostra, que poderá ser entregue ao/à Senhor (a), se assim desejar, ou descartada após seu consentimento por escrito.

Caso não concorde em doar 8 ml de medula óssea ou desista de participar da pesquisa ou de manter sua amostra armazenada, essa decisão não lhe trará qualquer penalização ou prejuízo.

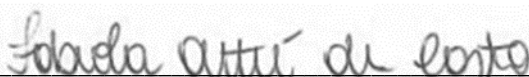
A coleta deste material biológico nesse momento não trará nenhum benefício imediato para o (a) Senhor (a), entretanto, no futuro, os dados obtidos com novas pesquisas poderão ajudar outras pessoas doentes. Coloco-me à disposição para lhe fornecer o resultado da pesquisa realizada com sua amostra.

O senhor (a) não terá benefícios imediatos participando desta pesquisa, mas contribuirá com o melhor entendimento de doenças do sangue, como neste caso as Neoplasias Mieloproliferativas.

Esta pesquisa não lhe trará nenhum custo ou gasto, entretanto, caso seja necessário, os gastos decorrentes da pesquisa serão ressarcidos e em caso de dano também decorrente da pesquisa o (a) Senhor (a) será indenizado. O (a) Senhor (a) terá garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa.

Toda nova pesquisa utilizando sua amostra biológica será realizada somente quando o projeto for aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP.

Em caso de dúvidas éticas, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, no endereço Avenida do Café, s/n, Campus Universitário, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto/SP ou pelo telefone (16) 3315-4213, de segunda à sexta-feira das 8h00 às 12h00. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão de caráter consultivo, normativo, deliberativo e educativo, com instituído de defender os interesses dos sujeitos da pesquisa e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões ético-científicos.



Profa. Dra. Fabíola Atti de Castro
(16) 3315-4163/ (16) 99613-0791
castrofabiola@hotmail.com



Gabriel Dessotti Barretto
(16)98119-4693
gabrielbarretto@usp.br

Participante da Pesquisa

Li e concordo em participar da pesquisa.

Assinatura do Doador ou responsável legal

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

