



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARINA DORIGATTI BORGES

CARACTERIZAÇÃO DE MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE
PACIENTES COM ANEMIA HEMOLÍTICA HEREDITÁRIA E
POLICITEMIA VERA E SUA ATUAÇÃO NA ERITROPOESE

CAMPINAS

2023

MARINA DORIGATTI BORGES

CARACTERIZAÇÃO DE MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE
PACIENTES COM ANEMIA HEMOLÍTICA HEREDITÁRIA E
POLICITEMIA VERA E SUA ATUAÇÃO NA ERITROPOESE

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na área de Clínica Médica.

Orientador: Fernando Ferreira Costa

Coorientadora: Renata Sesti Costa

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARINA DORIGATTI BORGES, COORIENTADA PELA PROFA. DRA. RENATA SESTI COSTA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B6448c Borges, Marina Dorigatti, 1994-
Caracterização de monócitos e macrófagos de pacientes com anemia hemolítica hereditária e policitemia vera e sua atuação na eritropoese / Marina Dorigatti Borges. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Fernando Ferreira Costa.

Coorientador: Renata Sesti-Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Monócitos. 2. Macrófagos. 3. Eritropoese. 4. Fagocitose. 5. Anemia falciforme. I. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. II. Costa, Renata Sesti. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Characterization of monocytes and macrophages from patients with hereditary hemolytic anemia and polycythemia vera and their role in erythropoiesis

Palavras-chave em inglês:

Monocytes

Macrophages

Erythropoiesis

Phagocytosis

Sickle cell anemia

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Fernando Ferreira Costa [Orientador]

Paula de Melo Campos

Bruno Deltreggia Benites

Fabíola Traina

Maria Stella Figueiredo

Data de defesa: 14-02-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0327-6083>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3917205216896634>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARINA DORIGATTI BORGES

ORIENTADOR: Fernando Ferreira Costa

COORIENTADORA: Renata Sesti-Costa

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. Fernando Ferreira Costa**
- 2. PROF. DRA. Paula de Melo Campos**
- 3. PROF. DR. Bruno Deltreggia Benites**
- 4. PROF. DRA. Fabíola Traina**
- 5. PROF. DRA. Maria Stella Figueiredo**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data: [14/02/2023]

*Aos meus pais, por fazerem de tudo
para que eu chegasse até aqui.
Muito obrigada!*

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo nº 140594/2019-1) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo temático nº 2019/18886-1).

Ao meu orientador, Professor Dr. Fernando Costa, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelos conhecimentos cedidos e orientação que contribuíram para o meu crescimento profissional.

À minha coorientadora, Professora Dra. Renata, pela paciência, por discutir e incentivar o progresso desse trabalho. Aprendi muito com você e espero sempre levar esse aprendizado comigo.

Às biólogistas, Dulcineia Albuquerque e Carolina Lanaro, por todo o auxílio no dia a dia, fazendo com que essa pesquisa fosse possível.

À Daniela Pinheiro e Cristiane Souza, por estarem ao meu lado desde o estágio, no começo dessa jornada. Vocês me ensinam a ser uma pessoa e profissional cada vez melhor e me inspiram mais a cada dia que passa. Não seria o que sou hoje sem a amizade de vocês. Que bom poder compartilhar minhas conquistas e minhas crises existenciais com vocês. Muito obrigada por tudo. Amo vocês.

À Ingrid Sousa, Priscila Boyano e Flávia Albuquerque, a convivência com vocês foi e é muito importante para mim. Vocês são mulheres incríveis que me inspiram todos os dias. Obrigada pelas discussões científicas e também pelos momentos fora do trabalho, pelos shows e pelas risadas. Vocês deixaram essa jornada muito mais divertida.

À Izabela Felice e ao Matheus Ajeje, que chegaram a pouco tempo, mas que foram muito importantes para que o chegasse até o final. Muito obrigada pela ajuda no laboratório e pela amizade e risadas dentro e fora dele.

À Pamela Lara, Erika Gotardo, Flávia Leonardo (Boca), Lucas Guschiken e Leticia Queiroz, pelas trocas de conhecimentos, momentos de descontração e pelos (muitos) cafés.

Aos meus pais, Haroldo e Beatriz, e ao meu irmão, Guilherme, por sempre me incentivarem e aconselharem a seguir o melhor caminho para mim. Obrigada por todo o apoio. Amo muito vocês.

A todos que fizeram parte dessa conquista, o meu muito obrigada!

RESUMO

Monócitos e macrófagos são células da imunidade inata capazes de modificar seu fenótipo para adequar-se ao tecido no qual estão presentes e às necessidades do meio. A eritropoese, processo de formação de hemácias, acontece nas ilhas eritroblásticas (IEs), nichos especializados compostos por um macrófago central cercado por células eritroides em diferentes estágios de diferenciação. Eles apresentam fenótipo específico que inclui a expressão de moléculas anti-inflamatórias, de adesão e daquelas ligadas ao metabolismo do ferro e à eritrofagocitose. Isso possibilita que exerçam funções essenciais para o desenvolvimento eritroide: reciclagem do ferro a partir da fagocitose dos eritrócitos senescentes e a indução da proliferação e sobrevivência dos eritroblastos. Em algumas situações ocorre a eritropoese de estresse (EE), com o aumento da produção de eritrócitos e maior recrutamento de ferro. Algumas doenças possuem um estado crônico de EE: a anemia falciforme (AF) é caracterizada pela falcização das hemácias levando à ativação do endotélio, inflamação e crises vaso-oclusivas. Na policitemia vera (PV) a eritropoese é aumentada, com proliferação de progenitores eritroides e maior risco de trombose. A depleção de macrófagos em modelo animal de PV e de anemia hemolítica mostrou a importância dessas células durante a EE. Os monócitos também parecem estar envolvidos nos processos da eritropoese. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o fenótipo de monócitos e macrófagos de pacientes com EE. Em especial, foram investigadas a capacidade dessas células de promoverem a diferenciação eritroide e fagocitarem eritrócitos. Foram incluídos pacientes AF ou PV atendidos no Hemocentro-UNICAMP em fase estável da doença. O grupo controle (CTRL) incluiu indivíduos saudáveis. Os monócitos circulantes do sangue total foram utilizados para a investigação da expressão de moléculas características dos macrófagos das IEs, para verificar seu envolvimento na fagocitose de células eritroides, para avaliar o papel das hemácias e dos monócitos nesse processo, investigando a expressão de heme-oxigenase-1 (HO-1) e ferroportina (FPN), e também para a diferenciação e Fenotipagem dos macrófagos. O perfil de expressão dos macrófagos de pacientes EE não se assemelhou ao dos macrófagos das IEs, provavelmente devido ao ambiente controlado no qual a diferenciação foi feita. Em contrapartida, os monócitos desses pacientes se mostraram mais semelhantes fenotipicamente do que os monócitos CTRL, indicando que seriam capazes de

influenciar na EE presente nessas doenças. Essas células participam da eritrofagocitose na circulação, sendo que o aumento dessa atividade parece ser resultado de uma maior participação das hemácias nos pacientes AF e, ser uma influência tanto das hemácias quanto dos monócitos nos pacientes PV. Em todos os grupos observou-se aumento das expressões de HO-1 e FPN nos monócitos após a fagocitose. Esses resultados mostram que, apesar de possuírem fisiopatologias diferentes, pacientes com AF ou PV possuem monócitos mais capazes de interagir com células eritroides e de realizar a sua retirada na circulação, contribuindo para o maior entendimento da eritrofagocitose e da EE que ocorrem nessas doenças, revelando a contribuição dos monócitos nesses processos e abrindo caminhos para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos no futuro.

Palavras-chave: monócitos, macrófagos, eritropoese, fagocitose, anemia falciforme.

ABSTRACT

Monocytes and macrophages are cells of innate immunity capable of modifying their phenotype to adapt to the tissue in which they are present and the needs of the environment. Erythropoiesis, the process of red blood cell formation, happens in erythroblastic islands (EBIs), specialized niches composed of a central macrophage surrounded by erythroid cells at different stages of differentiation. They have a specific phenotype that includes the expression of anti-inflammatory molecules, adhesion molecules, and those linked to iron metabolism and erythrophagocytosis. This enables them to perform essential functions for erythroid development: iron recycling from the phagocytosis of senescent erythrocytes and the induction of erythroblast proliferation and survival. In some situations, stress erythropoiesis (SE) occurs, with increased erythrocyte production and greater iron recruitment. Some diseases have a chronic state of SE: sickle cell anemia (SCA) is characterized by the falcization of red blood cells leading to the activation of endothelium, inflammation, and vaso-occlusive crises. In polycythemia vera (PV) erythropoiesis is increased, with proliferation of erythroid precursors and higher risk of thrombosis. The depletion of macrophages in animal model of PV and hemolytic anemia showed the importance of these cells during SE. Monocytes also seem to be involved in the erythropoiesis processes. The aim of this work was to characterize the phenotype of monocytes and macrophages of patients with SE. In particular, the ability of these cells to promote erythroid differentiation and phagocyte erythrocytes were investigated. Were included patients diagnosed with SCD or PV in the UNICAMP Blood Center, all in stable phase of the disease. The control group (CTRL) included healthy individuals. Circulating monocytes of total blood were used for the investigation of the expression of molecules characteristic of EBIs, to verify their involvement in erythroid cell phagocytosis, to evaluate the role of red blood cells and monocytes in this process, investigating the expression of heme-oxygenase-1 (HO-1) and ferroportin (FPN), and for the differentiation and phenotyping of macrophages. The expression profile of SE patients' macrophages did not resemble that of the EBIs macrophages, probably due to the controlled environment in which the differentiation was conducted. On the other hand, monocytes of these patients were more similar phenotypically than CTRL monocytes, indicating that they would be able to influence the SE present in these diseases. These cells participate in erythrophagocytosis in the circulation, and this activity appears to be increased by the

influence of red blood cells in SCA patients and, an influence of both red blood cells and monocytes in PV patients. In all groups there was an increase in HO-1 and FPN expressions in monocytes after phagocytosis. These results show that, although they have different pathophysiologies, patients with SCA or PV have monocytes more capable of interacting with erythroid cells and to perform their removal in circulation, contributing to the greater understanding of erythrophagocytosis and the SE that occur in these diseases, revealing the contribution of monocytes in these processes and opening ways to the development of new therapeutic targets in the future.

Keywords: monocytes; macrophages; erythropoiesis; phagocytosis; sickle cell anemia.

Lista de figuras

Figura 1. Funções dos subtipos de monócitos e macrófagos.....	19
Figura 2. Subtipos de monócitos quanto a expressão de CD14 e CD16.....	19
Figura 3. Reposição de ferro.....	22
Figura 4. Eritropoese e ilhas eritroblásticas.....	23
Figura 5. Moléculas de adesão nas ilhas eritroblásticas.....	25
Figura 6. Sinal da fagocitose de hemácias pelos macrófagos.....	26
Figura 7. Quebra do heme das hemoglobinas.....	26
Figura 8. Esquema experimental do ensaio de fagocitose <i>in vitro</i>	38
Figura 9. Fenotipagem dos macrófagos de pacientes com anemia falciforme (AF).....	40
Figura 10. Expressão de CD206 nos monócitos circulantes.....	41
Figura 11. Expressão de CD163 nos monócitos circulantes.....	42
Figura 12. Expressão de CD169 nos monócitos circulantes.....	43
Figura 13. Expressão de VCAM-1 nos monócitos circulantes.....	43
Figura 14. Expressão de Sirp- α nos monócitos circulantes.....	44
Figura 15. Fagocitose de hemácias pelos monócitos circulantes.....	45
Figura 16. Ensaio de fagocitose <i>in vitro</i> de pacientes com anemia falciforme (AF).....	46
Figura 17. Ensaio de fagocitose <i>in vitro</i> de pacientes com policitemia vera (PV).....	46
Figura 18. Fagocitose <i>in vitro</i> por subtipo de monócito de pacientes com anemia falciforme (AF).....	47
Figura 19. Fagocitose <i>in vitro</i> por subtipo de monócito de pacientes com policitemia vera (PV).....	47
Figura 20. Expressão de heme-oxigenase-1 (HO-1) nos monócitos após a fagocitose de hemácias.....	48

Figura 21. Expressão de ferroportina (FPN) nos monócitos após a fagocitose de hemácias.....	49
Figura 22. Hipótese do envolvimento dos monócitos circulantes na eritropoese de estresse.....	54

Lista de abreviaturas

ACD	Ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose
AF	Anemia falciforme
BSA	Albumina de soro bovino
BFU-E	<i>Burst forming unit erythroid</i> (unidade formadora de explosão eritroide)
CFU-E	<i>Colony forming unit erythroid</i> (Unidade formadora de colônia eritroide)
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
CTRL	Controle
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eritropoese de estresse
Epo	Eritropoetina
EpoR	Receptor de eritropoetina
Emp	<i>Erythroblast macrophage protein</i> (proteína eritroblasto macrófago)
FDA	<i>Food and drugs administration</i>
FPN	Ferroportina
FSC	<i>Forward scatter</i> (ângulo de dispersão frontal)
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HO-1	Heme oxigenase-1
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i> (célula tronco hematopoética)
HTC	Hematócrito
HU	Hidroxiureia
ICAM-4	<i>Intercellular Adhesion Molecule 4</i> (molécula de adesão intercelular-4)
IEs	Ilhas eritroblásticas
IST	Índice de saturação de transferrina
LPS	Lipopolissacarídeo

M-CSF *Macrophage colony-stimulating factor* (fator estimulante de colônias de macrófagos)

MC-C Monócitos clássicos

MC-I Monócitos intermediários

MC-NC Monócitos não-clássicos

MIF Média de intensidade de fluorescência

PBMC *Peripheral blood mononuclear cells* (Células mononucleares do sangue periférico)

PBS *Phosphate-Buffered Saline* (Salina tamponada com fosfato)

PLT Plaquetas

PV Policitemia vera

RBC Red blood cells (hemácias)

Retic Reticulócitos absolutos

ROS *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

RPM *Revolutions per minute* (rotações por minuto)

SEP *Stress erythroid progenitors* (progenitores eritroides de estresse)

Sirp- α *Signal regulatory protein α* (proteína reguladora de sinal alfa)

SSC *Side scatter* (ângulo de dispersão lateral)

Tf Transferrina

TfR1 Receptor da transferrina 1

TIBC Capacidade total de ligação do ferro

VCAM1 *Vascular cell adhesion molecule 1* (molécula de adesão celular vascular-1)

VCM Volume corpuscular médio

WBC White blood cells (leucócitos)

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Macrófagos e Monócitos.....	18
1.2. Metabolismo do ferro.....	20
1.3. Eritropoese.....	22
1.4. Eritropoese de estresse.....	27
1.4.1. Anemia falciforme.....	27
1.4.2. Policitemia vera.....	29
1.4.3. Envolvimento dos monócitos e macrófagos na EE.....	30
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	34
4.1. Casuística.....	34
4.2. Metodologia.....	34
4.2.1. Isolamento de monócitos de sangue periférico.....	34
4.2.2. Diferenciação de monócitos em macrófagos.....	35
4.2.3. Fenotipagem de monócitos e macrófagos.....	36
4.2.4. Fagocitose <i>ex vivo</i>	37
4.2.5. Ensaio de fagocitose <i>in vitro</i>	37
4.2.6. Citometria de fluxo e análises estatísticas.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Macrófagos de pacientes com AF diferenciados em cultura não apresentam perfil de expressão de moléculas semelhante ao dos macrófagos das IEs e se assemelham àqueles de indivíduos saudáveis.....	40
5.2. Monócitos circulantes de pacientes com EE possuem fenótipo similar aos macrófagos das IEs.....	41

5.3. Monócitos participam da fagocitose de hemácias na circulação de pacientes com EE.....	44
5.4. Durante a EE, a atividade fagocítica pode ser influenciada tanto pelos monócitos quanto pelas hemácias.....	45
5.5. Eritrofagocitose leva ao aumento de expressão de HO-1 e FPN nos monócitos	48
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÃO.....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
9. APÊNDICES.....	66
9.1. Tabela de dados demográficos e laboratoriais - pacientes com AF	66
9.2. Tabela de dados demográficos e laboratoriais – pacientes com PV.....	67
9.3. Estratégia de análise – fenotipagem de macrófagos.....	68
9.4. Estratégia de análise – fenotipagem de monócitos.....	69
9.5. Estratégia de análise - fagocitose <i>ex vivo</i>	70
9.6. Estratégia de análise - ensaio de fagocitose <i>in vitro</i>	71
10. ANEXOS.....	72
10.1. Aprovação comitê de ética	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Macrófagos e Monócitos

Monócitos e macrófagos são células da linhagem mieloide envolvidas na imunidade inata. Constituem cerca de 5-10% dos glóbulos brancos do sangue periférico, contribuindo para a resolução da inflamação e retomada da homeostase do organismo. Durante condições normais, os monócitos circulantes podem se diferenciar em macrófagos teciduais, integrando a população de células locais que contribuem para diversos processos como desenvolvimento e monitoramento de alterações teciduais. Durante processos inflamatórios, eles se diferenciam em macrófagos inflamatórios no local afetado (1–4).

Ambas as células são capazes de modificar seu fenótipo para se adequar ao tecido no qual estão presentes e às necessidades do meio, indo do estado basal durante condições normais, para um estado pro-inflamatório com capacidade de eliminação de patógenos e de inflamação e, por fim, para um estado anti-inflamatório, promovendo a resolução dessa inflamação e volta a condições ideais (Figura 1). Essas mudanças ocorrem através da sinalização do meio, com fatores de crescimento e citocinas, ou da presença de patógenos (2,4).

A principal função dos monócitos é repor o *pool* de macrófagos teciduais, tanto em condições normais, quanto durante estresse (5). Apesar disso, esses monócitos circulantes possuem diferentes subtipos, com funções e fenótipos individuais, mostrando que eles são importantes antes mesmo da diferenciação em macrófagos (1). As expressões dos marcadores CD14 e CD16 determinam a classificação de três subtipos de monócitos. Cerca de 80-90% do *pool* de monócitos é constituído do subtipo clássico (MC-C), que são CD14⁺⁺CD16⁻. Os outros 10-20% são compostos dos subtipos intermediários (MC-I) - CD14⁺⁺CD16⁺, e não-clássicos (MC-NC) - CD14⁺CD16⁺ (Figura 2) (1,6).

Os MC-C são responsáveis pela fagocitose e pela imunidade inata, são capazes de migrar para tecidos e se diferenciar em macrófagos já em condições homeostáticas. Os MC-I fazem a apresentação de antígenos, secreção de citocinas, regulação da apoptose e participam da angiogênese. Já os MC-NC rastreiam o endotélio procurando sinais de inflamação e participam da resposta antiviral (1,6,7).

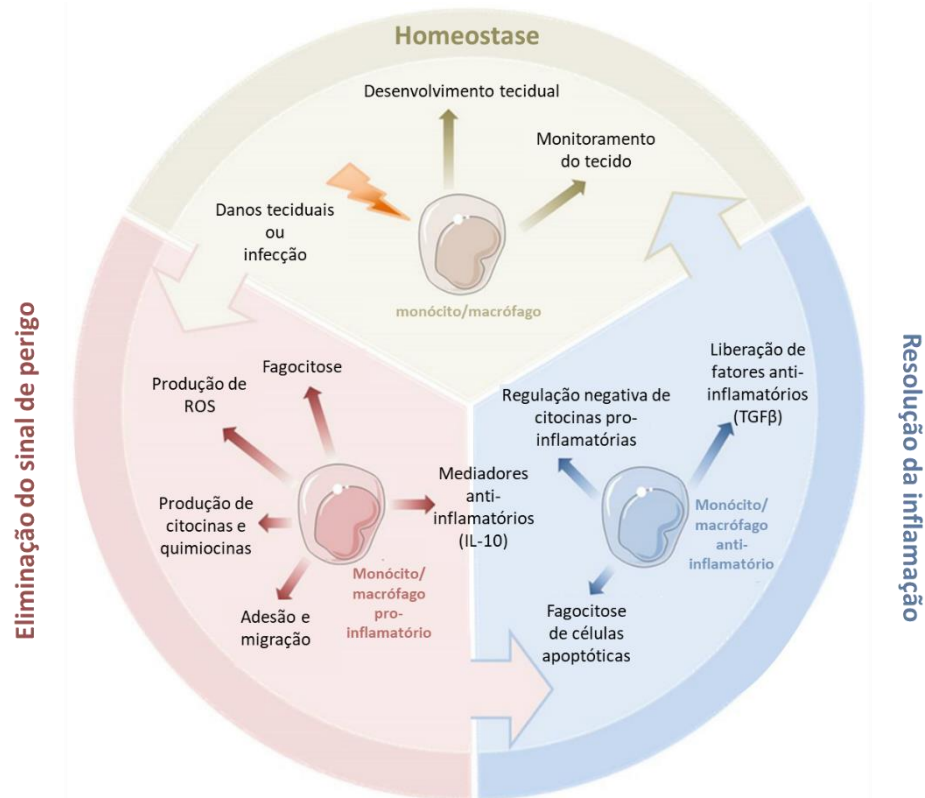


Figura 1. Funções dos subtipos de monócitos e macrófagos. Macrófagos e monócitos são capazes de mudar seu fenótipo, de acordo com as necessidades do organismo. Eles saem do estado de homeostase para um estado pro-inflamatório para eliminar patógenos e combater a inflamação. A mudança desse estado para o anti-inflamatório permite a resolução do problema até a retomada da homeostase. Dependendo do estímulo do meio, monócitos e macrófagos assumem fenótipos distintos com funções específicas. Adaptada de Austermann e colaboradores (2)

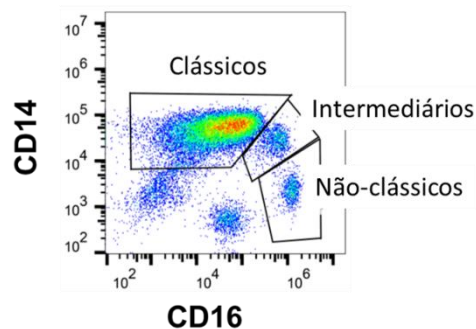


Figura 2. Subtipos de monócitos quanto a expressão de CD14 e CD16. Dot plot de citometria de fluxo convencional com a classificação dos subtipos de monócitos de acordo com a expressão de CD14 e CD16: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺). Dot plot de citometria de fluxo convencional.

Os macrófagos teciduais são especializados e assumem fenótipos diferentes dependendo do tecido que ocupam e função que desempenham, como é o exemplo das células de Kupffer (fígado), macrófagos alveolares (pulmões), osteoclastos (ossos), entre outros (5). Além da classificação por local, eles também são classificados de acordo com a expressão de moléculas associadas ao aumento ou supressão da resposta imune, sendo macrófagos M1 ou pro-inflamatórios e M2 ou anti-inflamatórios. Os primeiros expressam citocinas pro-inflamatórias e promovem a síntese de óxidos nítricos; os outros expressam arginase 1, CD206 (receptor de manose), receptor de IL-4, entre outros. Essa classificação é simplificada, no sentido de que eles não exercem apenas duas funções distintas. Os M2, por exemplo, são classificados ainda em M2a, M2b, M2c e M2d, dependendo do estímulo que recebem para a diferenciação (2,4,5,8,9). Algumas das funções gerais dos macrófagos são: produção de citocinas e quimiocinas, apresentação de antígenos, fagocitose de células em apoptose e reciclagem do ferro (4).

Tanto monócitos quanto macrófagos estão envolvidos em diversas doenças, desde asma e doenças inflamatórias e autoimunes, até infecções bacterianas, virais e fúngicas. A diferenciação de monócitos em macrófagos e as proporções dos subtipos de cada célula parece variar em condições patológicas e com o uso de medicamentos, aumentando ou diminuindo a gravidade dos sintomas de algumas doenças (1,4,10).

Além disso, uma das mais importantes funções dessas células é o seu envolvimento no metabolismo de ferro. Macrófagos M1 expressam níveis altos de moléculas de estoque do ferro, como a ferritina, e baixos níveis de moléculas que estimulam o efluxo desse metal, a ferroportina (FPN). O contrário acontece nos M2, que parecem favorecer o efluxo e não o armazenamento do ferro (11,12). Haschka e colaboradores (13) demonstraram o envolvimento dos MC-C e MC-I no recrutamento e reciclagem do ferro na circulação.

1.2. Metabolismo do ferro

O ferro é um dos componentes mais importantes na manutenção da homeostase celular já que ele participa de processos como síntese de DNA, proteção

contra patógenos e transporte de oxigênio através da molécula de hemoglobina (Hb) presente nas hemácias. Apesar de ser importante, o excesso de ferro é prejudicial ao organismo. Sua presença em grande quantidade favorece o surgimento de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos oxidativos e peroxidação lipídica, levando a danos celulares. Assim, a regulação da disponibilidade desse metal é de extrema importância (14–16).

A maior parte do ferro está presente nas hemácias. Durante o processo de retiradas das hemácias senescentes da circulação, o ferro é constantemente reciclado. Ele só é eliminado do organismo durante sangramentos ou descamação do endotélio duodenal e do epitélio. Essas pequenas perdas são supridas através da alimentação, sendo absorvido pelos enterócitos do duodeno (17,18).

Quando há níveis altos de ferro no organismo, a hepcidina (hormônio produzido pelo fígado) age na FPN, proteína transmembrana responsável pelo efluxo do ferro na célula, causando a sua internalização e degradação. Assim, o ferro não é liberado e fica armazenado na forma de ferritina intracelular, sendo resgatado quando houver necessidade ou sendo descartado durante as descamações do endotélio (16,19).

Algumas situações diminuem a quantidade de ferro do organismo. Nesses momentos, a hepcidina não é produzida e a FPN permanece estável na membrana das células, permitindo que o ferro seja externalizado. O ferro livre é tóxico e, uma vez fora da célula, precisa se ligar à transferrina (Tf) para ser transportado de forma segura até o local adequado. O complexo Tf-ferro é reconhecido pelo receptor de transferrina 1 (TfR1) nas células que necessitam do metal e é internalizado para que o ferro seja liberado para uso imediato ou para ser estocado como ferritina para uso posterior (16,18) (Figura 3).

Desequilíbrios no metabolismo do ferro causam consequências para todo o organismo. Seu excesso é acumulado em órgãos como fígado e coração, causando problemas de funcionamento e ao estresse oxidativo das células ali presentes. Déficits prolongados interferem no processo de eritropoese, causando anemias moderadas ou severas (20).

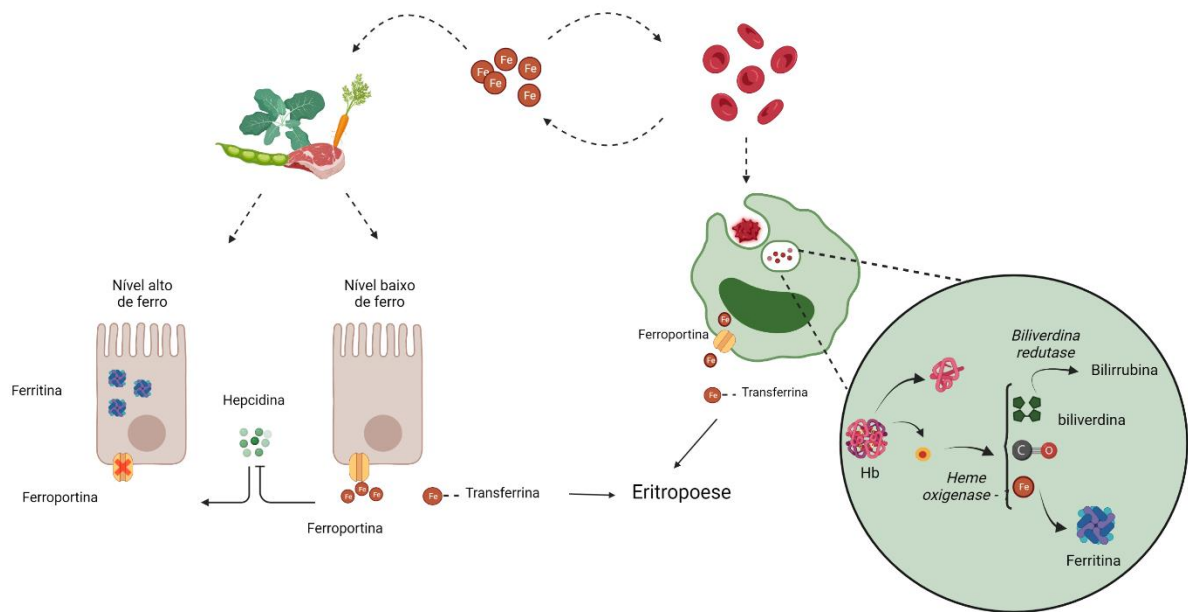


Figura 3. Reposição de ferro. O ferro do organismo é proveniente, em sua maior parte, da reciclagem das hemácias senescentes pelos macrófagos. O restante é adquirido da alimentação e absorvido pelos enterócitos do intestino. Se os níveis de ferro estão altos, a hepcidina (hormônio produzido pelo fígado) é secretada, a ferroportina é degradada e o ferro é armazenado como ferritina. Se os níveis estão baixos, a hepcidina não é produzida, a ferroportina fica na membrana na célula permitindo a saída do ferro. Uma vez fora da célula, ele se liga à transferrina para ser transportado até o local necessitado, geralmente a medula óssea, para suprir a eritropoese. Criada através do BioRender.

1.3. Eritropoese

A eritropoese é um processo dinâmico e complexo no qual progenitores eritroides presentes na medula óssea sofrem mudanças citoplasmática e nucleares, até formarem células maduras capazes de transportar oxigênio (21,22). Eles se desenvolvem em pro-eritroblastos, seguindo para eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos. Estes, perdem o núcleo dando origem aos reticulócitos e, por fim, aos eritrócitos maduros – as hemácias, que permanecem na circulação até a sua senescência (23,24). Essas células carregam a Hb que é formada por globinas e pelo heme ligado a átomos de ferro. Sua principal função é o transporte de oxigênio (25).

Nos adultos, esse processo acontece em nichos especializados na medula óssea, chamados de ilhas eritoblásticas (IEs). Descritas em 1958, são compostas por um macrófago central cercado por células eritroides em diferentes estágios de diferenciação (26,27). Existem dois tipos de IEs que participam de formas específicas na eritropoese. As IEs imaturas estão localizadas ao longo da medula óssea e são compostas por macrófagos pequenos ligados a células eritroides nos estágios iniciais de desenvolvimento. Esses macrófagos são responsáveis por secretar fatores de crescimento que favorecem a proliferação e diferenciação eritroide. As IEs maduras são formadas por macrófagos maiores ligados a células eritroides mais diferenciadas e se localizam mais perto dos capilares sinusoides, para que a liberação das hemácias para a circulação ocorra mais facilmente. Esses macrófagos fornecem ferro e fagocitam os núcleos expelidos durante a maturação das hemácias (24,28) (Figura 4).

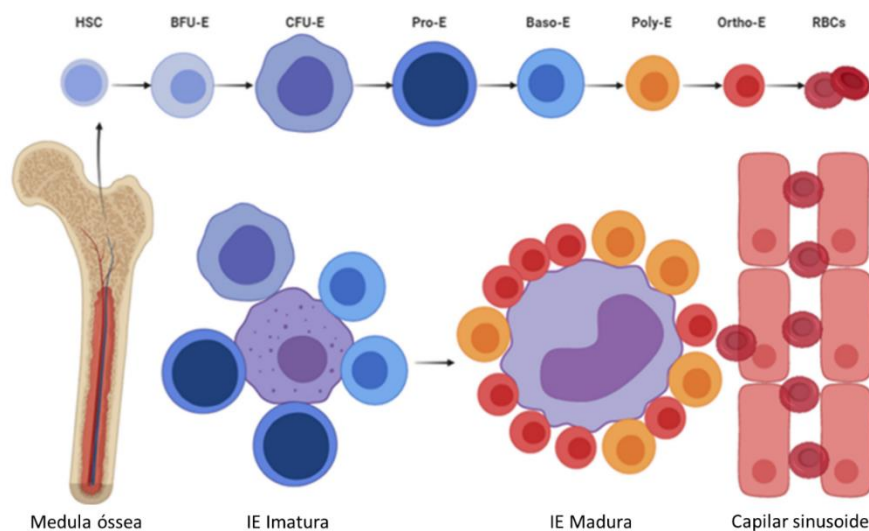


Figura 4. Eritropoese e ilhas eritoblásticas. Diferenciação das células eritroides desde progenitores (HSC – célula tronco hematopoética, BFU-E - unidade formadora de explosão eritroide e CFU-E – unidade formadora de cultura eritroide), proeritroblastos (Pro-E), eritroblastos basófilos (Baso-E), policromáticos (Poly-E) e ortocromáticos (Orto-E) até hemácias maduras (RBC). Ilhas eritoblásticas (IE) imaturas com células eritroides menos diferenciadas, localizada ao longo da medula óssea e IE madura, com células eritroides mais diferenciadas e localizada perto dos capilares sinusoides, para a liberação das hemácias na circulação. Adaptado de Li e colaboradores (24)

A interação entre os macrófagos e os eritroblastos é essencial para o desenvolvimento de células eritroides maduras, tanto em estágios iniciais, quanto nos mais tardios (29). Os macrófagos presentes nessas estruturas possuem funções fisiológicas essenciais para o desenvolvimento eritroide incluindo, além da reciclagem do ferro a partir da fagocitose dos eritrócitos senescentes, a indução da proliferação e sobrevivência dos eritroblastos (30–34).

A influência que os macrófagos exercem nas células eritroides é, pelo menos em parte, mediada de maneira dependente do contato entre as células (35), sugerindo que moléculas de adesão ou fatores parácrinos secretados dentro dos nichos eritroides possam ser importantes efetores desse evento. Assim, os macrófagos centrais das IEs apresentam um fenótipo distinto dos macrófagos residentes em outros tecidos (36).

As principais moléculas de adesão responsáveis pela interação entre macrófagos e eritroblasto são: a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM1 - *Vascular cell adhesion molecule 1*), a α_V integrina, a Emp (*erythroblast macrophage protein*), CD169 e o CD163 nos macrófagos. Elas interagem, respectivamente, com a integrina $\alpha_4\beta_1$, com a molécula de adesão intercelular-4 (ICAM-4 - *Intercellular Adhesion Molecule 4*), com a Emp e com glicoproteínas ainda não conhecidas nos eritroblastos (30,35,37–39).

A eritropoetina (Epo), hormônio produzido pelos rins e pelo fígado, atua como principal fator de regulação da produção de hemácias, tendo papel importante na regulação do desenvolvimento eritroide (23). Recentemente foi visto que os macrófagos das IEs expressam receptor de Epo (EpoR), o que sugere uma regulação da eritropoese por meio deles (36).

Devido a esse envolvimento do metabolismo do ferro, os macrófagos centrais expressam, além das moléculas relacionadas a adesão às células eritroides, moléculas que permitem a captação desse metal. O já citado CD163 é também receptor do complexo Hb-haptoglobina (proteína de transporte). O complexo hemopexina-heme é reconhecido pelo CD91 e o ferro ligado à transferrina é reconhecido pelo TfR1 (40). Luo e colaboradores (41) mostraram ainda que os macrófagos que promovem a proliferação das células tronco hematopoéticas apresentam o perfil M2, com expressão de CD206. A expressão em conjunto dessas

moléculas caracteriza o fenótipo de macrófago das IEs e está representada na Figura 5.

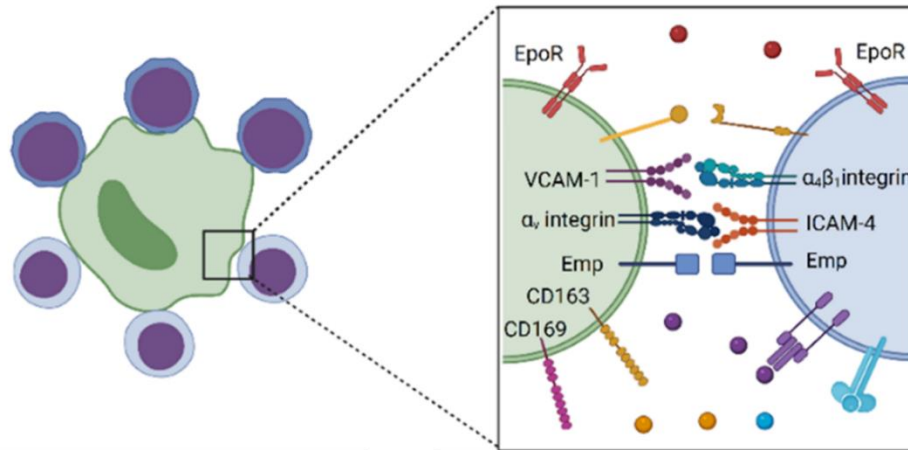


Figura 5. Moléculas de adesão nas ilhas eritroblásticas. Ilha eritroblástica composta por macrófago central (em verde) e células eritroides (em azul) em proliferação e diferenciação. Moléculas de adesão expressas pelos dois tipos celulares. EpoR = receptor de eritropoetina, VCAM1 = molécula de adesão celular vascular-1, integrina $\alpha_4\beta_1$, α_v integrina, ICAM4 = molécula de adesão intercelular-4, Emp = *erythroblast macrophage protein*, CD163, CD169. Adaptado de Borges e Sesti-Costa. (42).

A reciclagem do ferro a partir das hemácias senescentes é feita principalmente através da interação entre Sirp α (proteína regulatória de sinal - *signal-regulatory-protein*) e CD47 (Figura 6). Hemácias saudáveis expressam CD47 e conforme envelhecem ou sofrem danos, essa expressão é perdida. A diminuição da expressão de CD47 é reconhecida pelo Sirp α , indicando que aquela célula deve ser retirada da circulação, dando início ao processo de fagocitose por parte dos macrófagos (43).

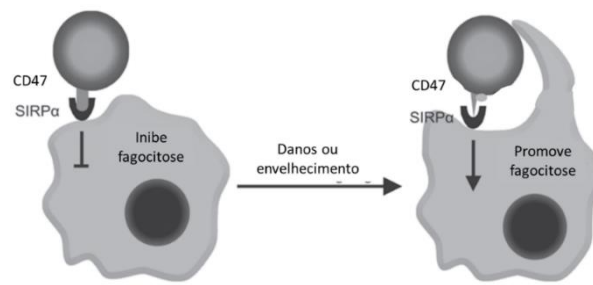


Figura 6. Sinal da fagocitose de hemácias pelos macrófagos. Macrófago interagindo com hemácia saudável através da ligação entre Sirp α e CD47, inibindo a fagocitose. Após sofrerem danos ou entrarem em senescência, as hemácias perdem a expressão de CD47, promovendo a fagocitose por meio dos macrófagos. Adaptado de Burger e colaboradores (43).

O processo de reciclagem do ferro é mediado pela enzima heme-oxigenase 1 (HO-1), que é responsável pelo catabolismo do heme em ferro, biliverdina e monóxido de carbono (CO) (44). HO-1 possui uma função crucial na diferenciação dos eritroblastos mesmo em condições de estresse, já que uma redução na sua atividade resulta no impedimento da maturação dos progenitores (45). Uma vez liberado do heme, o ferro pode, então, ser armazenado como ferritina ou exportado através da FPN para ser transportado pela Tf (Figura 7).

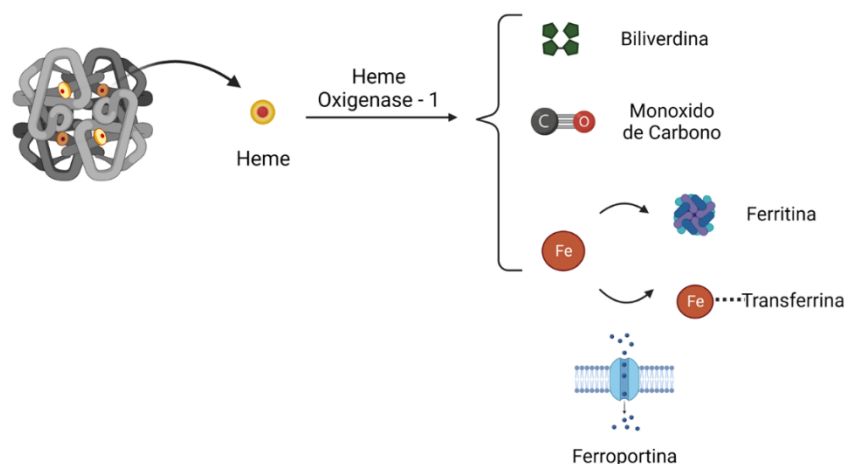


Figura 7. Quebra do heme das hemoglobinas. O heme contido nas hemoglobinas é quebrado em biliverdina, monóxido de carbono e ferro (Fe) através da ação da heme-oxigenase-1. O Fe pode, então, ser armazenado como ferritina ou ser exportado através da ferroportina para se ligar à transferrina e ser transportado para o tecido necessitado. Criado através do BioRender.

1.4. Eritropoese de estresse

Em algumas situações como por exemplo hipoxia, anemia, infecção e inflamação, a eritropoese normal não é suficiente para manter a quantidade necessária de hemácias na circulação. Nesses momentos ocorre a eritropoese de estresse (EE), com a expansão da atividade na medula óssea e também para sítios extramedulares, como o baço e fígado, e o desenvolvimento de novos progenitores eritroides específicos dos momentos de estresse, chamados de progenitores eritroides de estresse (SEPs – *stress erythroid progenitors*), células comprometidas a linhagem eritroide (46,47). Ao contrário da eritropoese normal que produz uma quantidade constante de células eritroides, a EE produz rapidamente progenitores eritroides que vão se diferenciar normalmente e de forma simultânea na presença de Epo, para fornecer um número adequado de hemácias para manter a eritropoese funcional (48,49).

As IEs presentes na medula óssea e no baço durante a EE são formadas por macrófagos diferenciados a partir de monócitos, especialmente para suprir a nova demanda de células eritroides. Conforme os progenitores eritroides se diferenciam, os monócitos também se diferenciam (50). Além disso, para que essa expansão de progenitores eritroides aconteça, há um maior recrutamento de ferro através da diminuição dos níveis de hepcidina e a permanência da FPN na membrana dos enterócitos, permitindo uma maior absorção (51).

A fisiopatologia de algumas doenças leva a um estado crônico de EE. Exemplos dessas doenças são a anemia falciforme (AF) e a policitemia vera (PV).

1.4.1. Anemia falciforme

A AF é uma doença hereditária causada por uma mutação em homozigose no gene da β -globina que leva à substituição de um aminoácido ácido glutâmico por valina, formando uma Hb anormal, a HbS. Em condições de desoxigenação, a HbS é polimerizada e provoca a falcização das hemácias, através de mudanças na forma e nas propriedades físicas dessas células (52–54). A doença é caracterizada por anemia hemolítica crônica e recorrentes crises de vaso-oclusão que levam a danos em vários órgãos e ao estresse oxidativo (55,56). O baço é um dos órgãos mais

afetados devido ao acúmulo de eritrócitos falcizados, levando, inicialmente, a esplenomegalia e sequestro esplênico na infância. A expectativa de vida desses pacientes é reduzida e o tratamento é geralmente feito através do uso de hidroxiureia (HU) e, em alguns casos, por transfusões sanguíneas, visando a substituição das células eritroides mutadas por células saudáveis mais capazes de realizar o transporte de oxigênio (55). Outras três drogas já foram aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso como tratamento: o crizanlizumab, a L-glutamina e o voxelotor (57). No Brasil, o crizanlizumab e o voxelotor foram aprovados, mas ainda não são amplamente utilizados.

A principal causa da anemia desses pacientes é a falcização das hemácias, que acaba reduzindo a sua meia-vida através da hemólise (58). Alguns trabalhos reportam alterações na diferenciação terminal dos eritrócitos como possível causa de piora da anemia. El Hoss e colaboradores (59) mostraram alta taxa de mortalidade durante a diferenciação, entre os estágios de eritroblastos policromáticos e ortocromáticos, com perda de cerca de 40% das células. A apoptose dessas células ocorre nas IEs, fazendo com que os macrófagos centrais desses nichos aumentem sua capacidade de fagocitose para retirar as células mortas do meio. A desregulação da atividade fagocítica pode acabar interferindo nas outras funções desempenhadas por esses macrófagos, afetando ainda mais a maturação dos eritroblastos (60).

Já se sabe que os monócitos desses pacientes também desempenham funções diferentes daqueles de indivíduos saudáveis. Em 2019 Liu e colaboradores (61) mostraram que nos pacientes com AF os MC-NC circulantes desempenham a função de fagocitose, sendo que essa atividade é ainda mais presente durante crises vaso-oclusivas. Além disso, esses monócitos expressam altos níveis de HO-1. Essa população está diminuída naqueles pacientes que sofreram crises vaso-oclusivas, indicando que eles protegem o endotélio dessa complicação (62).

Pacientes com AF também sofrem de sobrecarga de ferro, principalmente no fígado (63), sendo necessário o uso de quelantes em muitos casos. Esse excesso de ferro vem das transfusões regulares, do aumento de absorção do metal para melhorar a anemia através do aumento da atividade eritropoética e da hemólise que resulta na liberação do ferro da Hb (64). O tratamento de camundongos com AF com um inibidor de FPN levou à redução de marcadores de hemólise, evidenciando ainda

mais a relação entre a quantidade de ferro presente no organismo e a hemólise sofrida (65).

1.4.2. Policitemia vera

A PV é uma doença mieloproliferativa em que a maioria dos casos é causada por uma mutação V617F no gene *JAK2*, levando a um ganho de função. Cerca de 3% dos pacientes são *JAK2* V617F negativos e possuem outras mutações no mesmo gene, localizadas no éxon 12 (66). Este gene codifica a proteína *JAK2*, que atua na sinalização do receptor de Epo, promovendo a proliferação, sobrevivência e maturação de progenitores hematopoéticos multipotentes (67). A ativação de *JAK2* faz com que as células eritroides e mieloides sejam hipersensíveis a Epo, sendo capazes de formar colônias na sua ausência (68–70).

A doença é caracterizada pela produção elevada de células eritroides, plaquetas e granulócitos morfológicamente normais (71), com a expansão de eritropoese para áreas extramedulares (69), levando a níveis aumentados de hemoglobina e hematócrito. Devido ao aumento de células circulantes, ocorre aumento da viscosidade sanguínea, com maior risco de eventos trombóticos venosos e arteriais, afetando também o baço que precisa filtrar o sangue, levando ao acúmulo de células (68,72). Assim, o tratamento geralmente é feito com o uso de terapia citoreduzoras, como a HU, para diminuir o risco de trombose, e sangrias buscando a manutenção do nível de hematócrito (HTC) abaixo dos 45% (73).

A mutação de *JAK2* afeta toda a linhagem mieloide, incluindo plaquetas, neutrófilos e monócitos, possivelmente interferindo nas funções dessas células (74–76). Além disso, já se sabe que ocorre o aumento de macrófagos CD68⁺CD163⁺ na medula óssea de pacientes com PV, o que pode ser explicado pelo aumento de produção celular (77) e que a monocitose está relacionada com o aumento de mortalidade desses pacientes (78), mostrando que essas células também são afetadas durante a doença.

1.4.3. Envolvimento dos monócitos e macrófagos na EE

Como mostrado anteriormente, os macrófagos influenciam diretamente na eritropoese ao formarem as IEs. Durante as situações de estresse, esse envolvimento parece ser ainda maior.

Ramos e colaboradores (79) mostraram uma contribuição incisiva dos macrófagos em modelos murinos de PV, já que a depleção dessas células foi capaz de reverter algumas das características-chaves ligadas à doença, como por exemplo, o desenvolvimento da eritropoese extramedular e da esplenomegalia. Apesar de ainda não estar claro se os macrófagos de pacientes possuem esse mesmo papel e se contribuem para o desenvolvimento da doença, a presença dessas células na cultura eritroide de células CD34⁺ de pacientes com PV levou ao aumento da proliferação eritroide e diminuição da velocidade de diferenciação. No mesmo ano, Chow e colaboradores (30) mostraram o importante papel desses macrófagos também em anemias hemolíticas, já que a sua depleção causa recuperação mais lenta até níveis normais de reticulócitos e hematócrito.

Apesar de não ser o principal papel dos monócitos, eles também interferem na eritropoese, desempenhando funções primariamente dos macrófagos. Estudos conduzidos em 2010 e 2015 demonstraram que a diferenciação de eritrócitos *in vitro* a partir de células humanas CD34⁺ é de quatro a 15 vezes maior quando na presença de outras células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Eles mostraram que as células responsáveis por esse aumento na diferenciação eritróide são os monócitos, principalmente MC-I, os quais também expressam CD163, CD169 e CD206. O efeito na diferenciação eritróide promovido pelos monócitos foi independente de contato e ocorreu antes do estágio de eritroblastos, aumentando a proliferação e diminuindo a apoptose das células CD34⁺ (38,80,81).

Estudos recentes mostram ainda que os MC-C e MC-I expressam maior quantidade de moléculas relacionadas com o metabolismo do ferro, como por exemplo, FPN, ferritina, TfR1 e Sirp- α . Além disso, os MC-C são os maiores responsáveis pela fagocitose de hemácias danificadas e senescentes, tanto no estado normal quanto durante o estresse hematológico causado por transfusões em pacientes com síndrome mielodisplásica (82). Liu e colaboradores (61) demonstraram um maior envolvimento dos MC-NC na fagocitose de eritroblastos, avaliado pela

presença de glicoforina-A (parte da membrana eritroide) nas células de pacientes com AF e um aumento considerável dessa fagocitose naqueles pacientes em crise vaso-oclusiva, indicando um papel importante dessas células na patologia da doença. Esses dados mostram a contribuição dos diferentes subtipos de monócitos durante processos ligados a eritropoese.

Desequilíbrios na atividade eritropoética, como acontece durante a EE das doenças já citadas, afetam também o funcionamento dos macrófagos e monócitos. A diminuição do tempo de vida das hemácias gera um aumento da eritrofagocitose por meio dos macrófagos (83). Quando a demanda por esse processo excede o normal, a produção de HO-1 e ferritina não é suficiente para retirar todo o ferro livre liberado da quebra da Hb, gerando um acúmulo no plasma e no citosol e dando origem a ROS e produtos de peroxidação lipídica (84,85). Nessa situação, há diminuição do número de macrófagos do baço e fígado induzida por meio de ferroptose (85–87), um tipo de morte celular relacionado ao desequilíbrio do metabolismo do ferro com acúmulo de ROS e consequente peroxidação lipídica (84). Ela parece ser reduzida com o uso de quelantes de ferro, evidenciando sua relação com o acúmulo desse metal (88) e, conseqüentemente, com a elevada eritrofagocitose por parte de macrófagos e possivelmente de monócitos circulantes.

2. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos envolvidos na eritropoese de estresse ainda não estão totalmente estabelecidos. Assim, a caracterização das células presentes durante o processo é de grande importância para aumentar o conhecimento sobre doenças com quadro crônico de eritropoese de estresse.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o fenótipo de monócitos e macrófagos de pacientes com eritropoese de estresse na policitemia vera e na anemia falciforme. Em especial, foram investigadas a capacidade dessas células de promoverem a diferenciação eritroide e fagocitarem eritrócitos.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a expressão de moléculas características dos macrófagos das ilhas eritroblásticas e daquelas ligadas ao metabolismo de ferro nos monócitos circulantes;
- Observar a capacidade dos monócitos do sangue periférico de fagocitar eritrócitos;
- Investigar a possível interferência dos monócitos do sangue periférico na eritropoese.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

O estudo incluiu pacientes de ambos os sexos, com mais de 18 anos e atendidos no Hemocentro da UNICAMP com diagnóstico de AF, confirmado pelo hemograma, eletroforese de Hb, sequenciamento do DNA para confirmação da mutação da globina β em homozigose; ou de PV, seguindo os critérios da Organização Mundial da Saúde, com Hb acima de 16g/dL, HTC acima de 45% ou outra evidência de aumento de volume de células vermelhas, biopsia de medula óssea mostrando hiperplasticidade de três linhagens e comprovação da presença da mutação JAK2 V617F ou mutações no éxon 12 do mesmo gene.

Os pacientes foram abordados durante sua consulta já agendada, sendo que a coleta de sangue e dados clínicos foi realizada durante a rotina dos participantes. Os pacientes selecionados estavam em fase estável da doença, sem crises de dor, processos inflamatórios agudos ou transfusão sanguínea nos últimos três meses. O grupo controle foi composto por indivíduos sadios (CTRL). Tanto pacientes quanto os indivíduos sadios assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CAAE: 88768318.6.0000.5404 – Anexo 1). Os dados laboratoriais e demográficos foram obtidos a partir dos prontuários de atendimento e estão apresentados nas tabelas presentes nos Apêndices 9.1 e 9.2.

4.2. Metodologia

4.2.1. Isolamento de monócitos de sangue periférico

Foram coletados aproximadamente 20ml de sangue periférico em tubos de heparina lítica de cada participante para a separação das células mononucleares. Em capela de fluxo laminar, o sangue foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) estéril até o volume de 50ml. O sangue diluído foi dividido em dois tubos Falcon, sendo adicionado diretamente em cima de 15ml de Ficoll (densidade 1077g/ml – GE Healthcare), sem misturar as fases para que a separação em densidades acontecesse através da centrifugação à 400g por 30 minutos em temperatura ambiente, sem freio e aceleração. A camada contendo o PBMC foi coletada com o

auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para um novo tubo para que fossem feitas duas lavagens com PBS 1x por 10 minutos a 1500rpm (freio e aceleração nove), descartando o sobrenadante entre elas. O pellet obtido após a segunda lavagem foi ressuspensionado em 5ml de tampão de lise gelado e permaneceu por 10 minutos a 4°C para que as hemácias fossem lisadas. Após esse período, o volume foi completado com PBS 1x e lavado novamente. O pellet resultante foi ressuspensionado em 1ml de PBS 1x para contagem das células mononucleares em câmara de Neubauer.

As células CD14⁺ foram separadas com o auxílio de *beads* magnéticas (MACS) que selecionam essa população. Brevemente, foi adicionado o volume proporcional de *beads* de acordo com o número de células obtidas anteriormente e feita uma incubação com PBS-BSA-ACD por 15 minutos a 4°C. Após esse período, foram adicionados 6ml de PBS-BSA-ACD para uma lavagem a 1500rpm por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 1ml e colocado na coluna de separação previamente umedecida e posicionada no suporte magnético. Após três lavagens com 3ml de PBS-BSA-ACD cada, a coluna contendo as células CD14⁺ foi retirada do suporte magnético e as células foram recuperadas em 6ml de PBS-BSA-ACD com a ajuda de um êmbolo. Após centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 1ml de meio de cultura RPMI para a contagem das células na câmara de Neubauer.

4.2.2. Diferenciação de monócitos em macrófagos

Cerca de 2×10^6 células mononucleares foram incubadas em placa de 24 poços contendo meio RPMI incompleto (sem suplementação) em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 2 horas para que os monócitos pudessem aderir. Após esse período, o meio contendo as células não aderidas foi retirado e substituído por RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina, penicilina/streptomicina e M-CSF (R&D SYSTEMS) - que estimula a diferenciação dos monócitos, na concentração de 25µg/ml por seis dias, com troca do meio no terceiro dia. Após diferenciação, os macrófagos foram coletados com o auxílio de PBS 1x gelado e separados para a citometria de fluxo.

4.2.3. Fenotipagem de monócitos e macrófagos

A caracterização da expressão das moléculas de interesse relacionadas às ilhas eritroblásticas, como moléculas de adesão a células eritroides, metabolismo de ferro e do subtipo anti-inflamatório foi feita diretamente dos monócitos do sangue periférico e dos macrófagos diferenciados em cultura a partir dos monócitos, utilizando citometria de fluxo convencional.

Os anticorpos utilizados estão especificados na tabela 1. Os macrófagos foram previamente selecionados como a população CD14⁺CD68⁺ e os monócitos foram classificados nos subtipos MC-C, MC-I e MC-NC de acordo com a expressão de CD14 e CD16. As estratégias de seleção das populações estão apresentadas no Apêndice 9.3 e 9.4.

Tabela 1. Anticorpos utilizados para a seleção das populações de macrófagos e monócitos e para a investigação da expressão de moléculas relacionados às ilhas eritroblásticas, através de citometria de fluxo.

Anticorpo	Função	Clone	Marca
Anti-CD14-FITC	Receptor de LPS, expresso por macrófagos e monócitos	Tuk4	Life Technologies
Anti-CD16-PerCP	Receptor transmembrana, expresso por monócitos	3G8	Life Technologies
Anti-CD68-Pecy7	Glicoproteína expressa em macrófagos	Y1/82A	BD
Anti-CD169-647	Adesão a células eritroides Receptor Do complexo	7-239	BD
Anti-CD163-BV421	Hemoglobina-haptoglobina; adesão a células eritroides	GHI/31	BD
Anti-Sirp- α -PE	Sinalizadora de fagocitose	SE5A5	BD
Anti-VCAM1-BV605	Adesão a células eritroides	51-10C9	Biologend
Anti-CD206-PE	Receptor de manose, perfil anti-inflamatório	19.2	BD

4.2.4. Fagocitose *ex vivo*

Para a investigação da fagocitose de células eritroides pelos monócitos circulantes, $1,5 \times 10^6$ células mononucleares de sangue periférico foram incubadas com os anticorpos anti-CD14-FITC e anti-CD16-PerCP. Após 30 minutos a 4°C , as células foram lavadas do excesso de anticorpo através da centrifugação a 7000rpm por 2 minutos. A marcação foi fixada e as células permeabilizadas utilizando o kit Cytotfix/Cytoperm Plus (BD). Após nova lavagem, foi adicionado o anticorpo anti-glicoforina A-PE, clone CLB-ery-1 (Life Technologies) por 30 minutos para que fosse feita a marcação intracelular. Uma última lavagem foi feita e o pellet foi ressuspendido em 300 μl de PBS 1x para leitura por citometria de fluxo convencional. A estratégia de análise se encontra no Apêndice 9.5.

4.2.5. Ensaio de fagocitose *in vitro*

Monócitos separados por *beads* CD14⁺ como descrito anteriormente foram incubados *overnight* em estufa a 37°C com 5% de CO_2 , em placa de 24 poços com RPMI suplementado na concentração de 5×10^5 células por poço.

Hemácias de pacientes e indivíduos controle (diferentes dos quais foram isolados os monócitos) foram separadas a partir de sangue periférico coletado em tubo de EDTA no dia anterior. Foram feitas duas lavagens de 2 minutos a 1600rpm com PBS 1x e 80 μl de sangue. 20 μl do pellet resultante das lavagens foram separados para a contagem das células. Elas foram marcadas com o kit de marcação de membrana PKH26 (Sigma) e incubadas com os monócitos por 2 horas em uma concentração de 5×10^6 por poço. Foram feitos um total de quatro poços para os monócitos de cada indivíduo – dois com hemácia de paciente e dois com hemácia de controle. Após esse período, as células foram coletadas com PBS gelado, juntando os dois poços iguais, e lavadas a 1500rpm por 10 minutos. Foram adicionados 3ml de tampão de lise hemácias para quebrar aquelas que não foram fagocitadas. Após lavagem, os pellets foram ressuspendidos em 100 μl de PBS-BSA-ACD e separados em dois tubos *ependorf* para as marcações com anticorpos.

Para o primeiro painel foram utilizados os anticorpos anti-CD14-FITC, anti-CD16-PeCy7, clone 3G8 (Life Technologies) e anti-FPN (LifeSpan Bioscience) conjugado com o anticorpo secundário Alexa fluor 633 (Invitrogen). Primeiramente,

foram adicionados 2,5µl de FC block (BD) aos 50µl de células por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, 1µl de anticorpo primário anti-FPN foi adicionado, seguido de uma lavagem à 7000rpm por dois minutos. O anticorpo secundário foi então adicionado na proporção de 1:1000. Após lavagem, foram adicionados os anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 em 50µl de volume total. O pellet final foi ressuspendido em 300µl para realização da citometria de fluxo. Todas as incubações foram de 30 minutos a 4°C.

Para o segundo painel, foram adicionados primeiramente os anticorpos anti-CD14-FITC e anti-CD16-PeCy7 em 50µl de PBS-BSA-ACD. Após lavagem, o kit Cytofix/Cytoperm Plus (BD) foi utilizado para a fixação e permeabilização das células. Por fim, as células foram incubadas com o anticorpo anti-HO-1-647, clone 23 (BD) por 30 minutos a 4°C, seguido de uma lavagem e leitura por citometria de fluxo convencional. O esquema experimental está ilustrado na Figura 8 e a estratégia de análise se encontra no Apêndice 9.6.

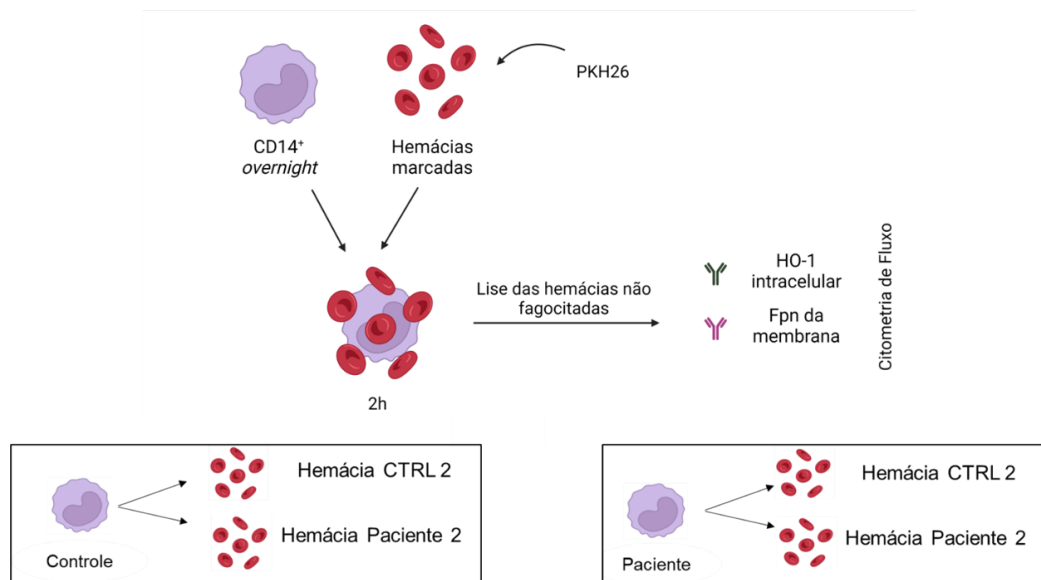


Figura 8. Esquema experimental do ensaio de fagocitose *in vitro*. Monócitos CD14⁺ foram incubados por duas horas com hemácias marcadas com o corante de membrana PKH26. Após esse período, foi feita a lise das hemácias não fagocitadas e a divisão das células para avaliação da expressão de heme-oxigenase-1 (HO-1) e ferroportina (FPN) através de citometria de fluxo. Foram realizadas as incubações dos seguintes conjuntos de células: monócitos de indivíduos saudáveis (CTRL) com hemácias de outros CTRL ou de pacientes; e monócitos de pacientes com hemácias de CTRL ou de outros pacientes. Criado através do BioRender.

4.2.6. Citometria de fluxo e análises estatísticas

Todas as leituras de citometria de fluxo convencional foram realizadas no equipamento Cytotflex (Beckman coulter). As análises finais foram feitas no software FlowJo e as análises estatísticas foram realizadas no software Prism – GraphPad.

5. RESULTADOS

5.1. Macrófagos de pacientes com AF diferenciados em cultura não apresentam perfil de expressão de moléculas semelhante ao dos macrófagos das IEs e se assemelham àqueles de indivíduos saudáveis

Os macrófagos diferenciados em cultura a partir de monócitos circulantes de indivíduos CTRL e de pacientes com AF não apresentaram diferenças significativas quanto a expressão das moléculas relacionadas ao fenótipo das IEs (CD206 e CD163), moléculas de adesão (CD169 e VCAM1) e nem relacionadas à fagocitose de eritrócitos (Sirp- α) (Figura 9). A única distinção entre os grupos foi uma velocidade de diferenciação menor, representada pela porcentagem de células CD14⁺CD68⁺ na cultura, nos monócitos dos pacientes com AF do que aquela vista nas células de indivíduos saudáveis, o que sugere uma diferenciação mais lenta (Figura 9A).

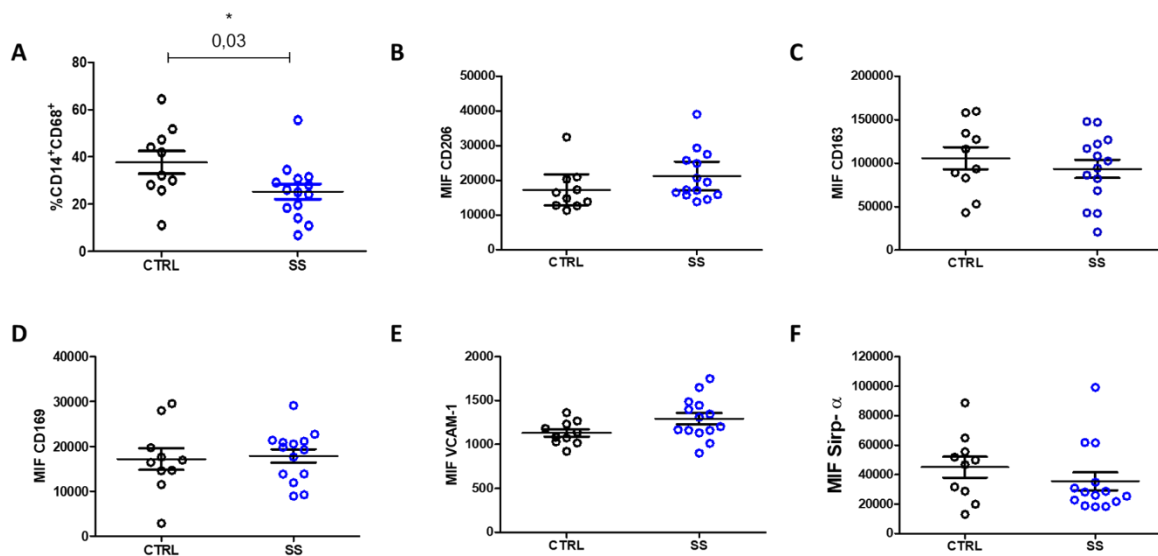


Figura 9. Fenotipagem dos macrófagos de pacientes com anemia falciforme (AF).

Porcentagem de células CD14⁺CD68⁺ indicando a diferenciação dos monócitos circulantes de indivíduos controles (CTRL, em preto) e pacientes com AF (SS, em azul) em macrófagos (A); média de intensidade de fluorescência (MIF) dos marcadores típicos de macrófagos das ilhas eritroblásticas nas células diferenciadas em cultura: CD206 – marcador do perfil anti-inflamatório (B), CD163 – receptor do complexo hemoglobina-haptoglobina e molécula de adesão (C), das moléculas de adesão VCAM-1 (D) e CD169 (E) e do sinalizados de fagocitose Sirp- α (F).

5.2. Monócitos circulantes de pacientes com EE possuem fenótipo similar aos macrófagos das IEs

Como não foram encontradas diferenças nos macrófagos diferenciados em cultura, os monócitos circulantes foram investigados quanto ao seu fenótipo. As primeiras moléculas investigadas foram aquelas ligadas ao fenótipo dos macrófagos das ilhas eritroblásticas. Quando comparados com a expressão em monócitos de CTRL, o CD206 (marcador de macrófagos do tipo M2) estava mais presente nos MC-I e MC-NC dos pacientes AF e nos MC-NC nos pacientes com PV (Figura 10).

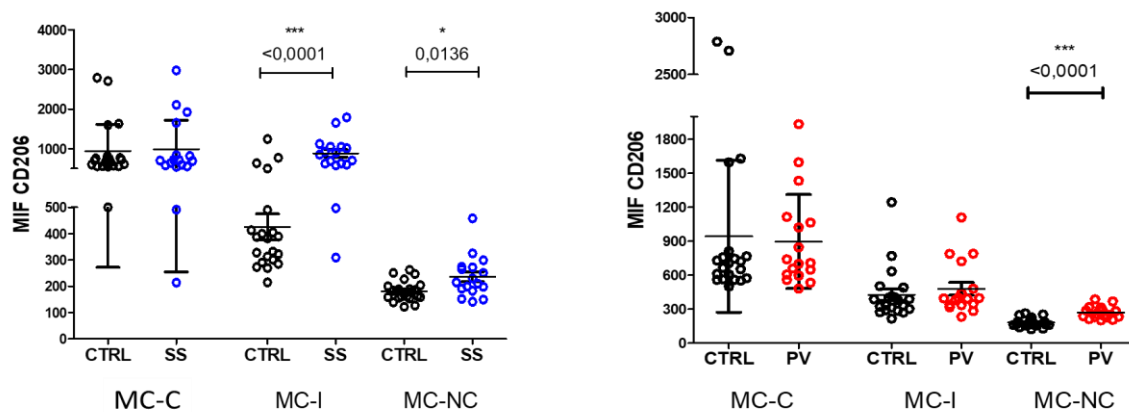


Figura 10. Expressão de CD206 nos monócitos circulantes. Média de intensidade de fluorescência (MIF) da molécula característica do perfil anti-inflamatório - CD206, nos monócitos circulantes de indivíduos saudáveis (CTRL) em preto, pacientes com anemia falciforme (SS) em azul e pacientes com policitemia vera (PV) em vermelho, nos subtipos clássicos (MC-C), intermediários (MC-I) e não-clássicos (MC-NC). nCTRL:21; nSS:17; nPV:17. Teste de Mann Whitney, $P < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

Outro marcador clássico desses macrófagos é o CD163 que, além de ser o receptor do complexo hemoglobina-haptoglobina, estando envolvido no metabolismo de ferro, também participa da adesão dos macrófagos às células eritroides nas ilhas. Ele se mostrou mais presente nos MC-I de indivíduos com AF e nos MC-NC na PV (Figura 11).

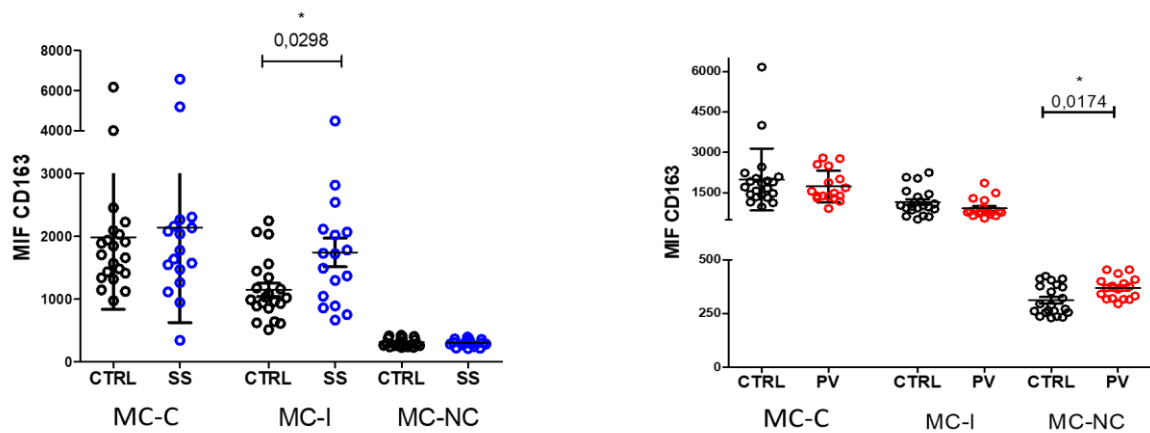


Figura 11. Expressão de CD163 nos monócitos circulantes. Média de intensidade de fluorescência (MIF) do receptor do complexo hemoglobina-haptoglobina e molécula de adesão a células eritroides - CD163, nos monócitos circulantes de indivíduos saudáveis (CTRL) em preto, pacientes com anemia falciforme (SS) em azul e pacientes com policitemia vera (PV) em vermelho nos subtipos clássicos (MC-C), intermediários (MC-I) e não-clássicos (MC-NC). nCTRL:21; nSS:17; nPV:17. Teste de Mann Whitney, $P < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

Também desempenhando a função de molécula de adesão, o CD169 e o VCAM1 se mostraram, respectivamente, aumentados nos MC-C e MC-I dos pacientes de ambas as doenças (Figura 12), e aumentado nos MC-I dos pacientes com AF e em todos os subtipos dos pacientes PV (Figura 13). Esses dados em conjunto mostram que os monócitos tanto dos pacientes com AF como os com PV apresentam um fenótipo similar ao dos macrófagos das IEs, com aumento das moléculas necessárias para adesão aos eritroblastos.

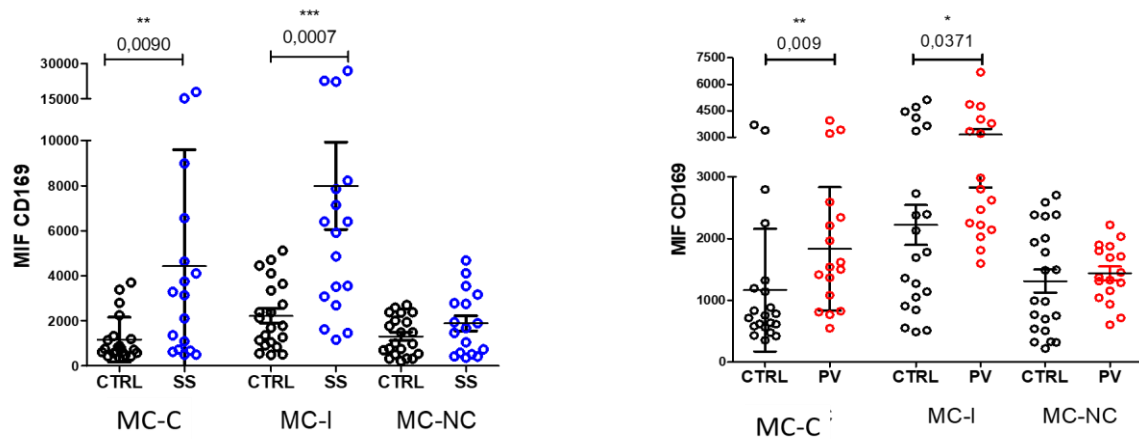


Figura 12. Expressão de CD169 nos monócitos circulantes. Média de intensidade de fluorescência (MIF) da molécula de adesão a células eritroides - CD169, nos monócitos circulantes de indivíduos saudáveis (CTRL) em preto, pacientes com anemia falciforme (SS) em azul e pacientes com policitemia vera (PV) em vermelho, nos subtipos clássicos (MC-C), intermediários (MC-I) e não-clássicos (MC-NC). nCTRL:21; nSS:17; nPV:17. Teste de Mann Whitney, $P < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

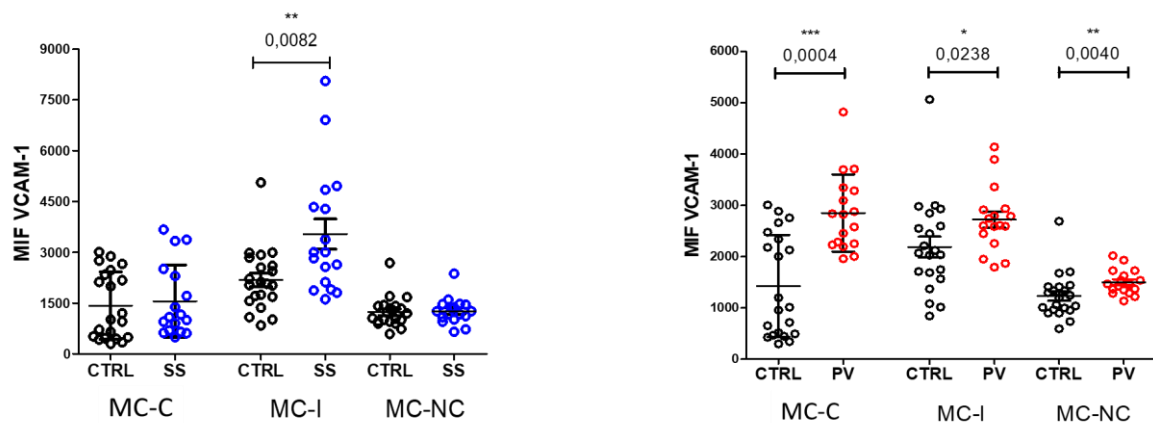


Figura 13. Expressão de VCAM-1 nos monócitos circulantes. Média de intensidade de fluorescência (MIF) da molécula de adesão a células eritroides – VCAM-1, nos monócitos circulantes de indivíduos saudáveis (CTRL) em preto, pacientes com anemia falciforme (SS) em azul e pacientes com policitemia vera (PV) em vermelho, nos subtipos clássicos (MC-C), intermediários (MC-I) e não-clássicos (MC-NC). nCTRL:21; nSS:17; nPV:17. Teste de Mann Whitney, $P < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

Outra importante função dos macrófagos é a fagocitose de hemácias senescentes e danificadas através da interação entre Sirp- α nos macrófagos e CD47 nas hemácias. Os dados mostram uma diminuição da presença de Sirp- α nos MC-NC dos pacientes com AF e nos MC-C de pacientes com PV (Figura 14), indicando maior capacidade fagocítica desses monócitos. Um aumento significativo na expressão de Sirp- α por MC-NC de pacientes com PV também foi observado.

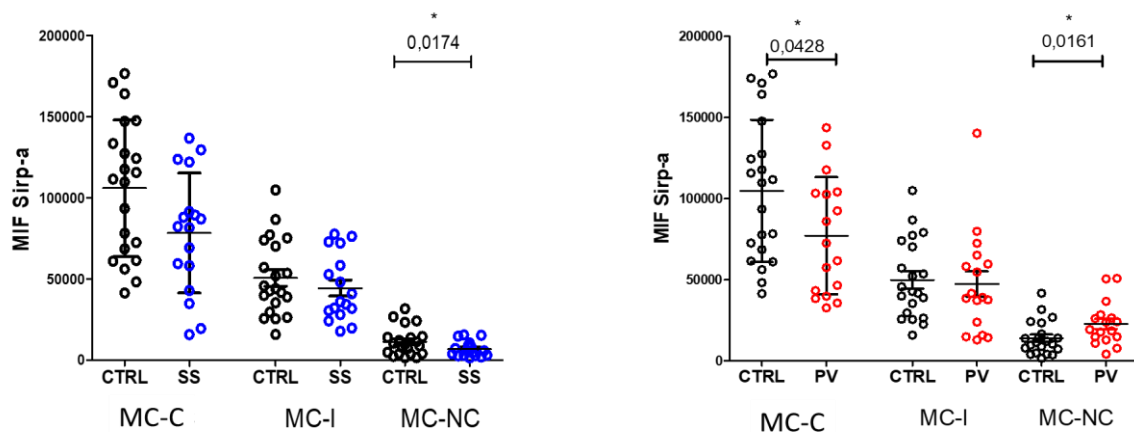


Figura 14. Expressão de Sirp- α nos monócitos circulantes. Média de intensidade de fluorescência (MIF) da proteína regulatória da fagocitose - Sirp- α , nos monócitos circulantes de indivíduos saudáveis (CTRL) em preto, pacientes com anemia falciforme (SS) em azul e pacientes com policitemia vera (PV) em vermelho, nos subtipos clássicos (MC-C), intermediários (MC-I) e não-clássicos (MC-NC). nCTRL:21; nSS:17; nPV:17. Teste de Mann Whitney, $P < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

5.3. Monócitos participam da fagocitose de hemácias na circulação de pacientes com EE

Para confirmar que esses monócitos participam da fagocitose das hemácias, foi feita a marcação de glicoforina A intracelular nessas células circulantes a fim de se observar resquícios de células eritroides, indicando fagocitose. Foi possível observar que em ambos os grupos de pacientes houve maior porcentagem de monócitos positivos para glicoforina A quando comparado ao grupo CTRL (Figura 15), com uma participação maior no grupo AF do que no grupo PV.

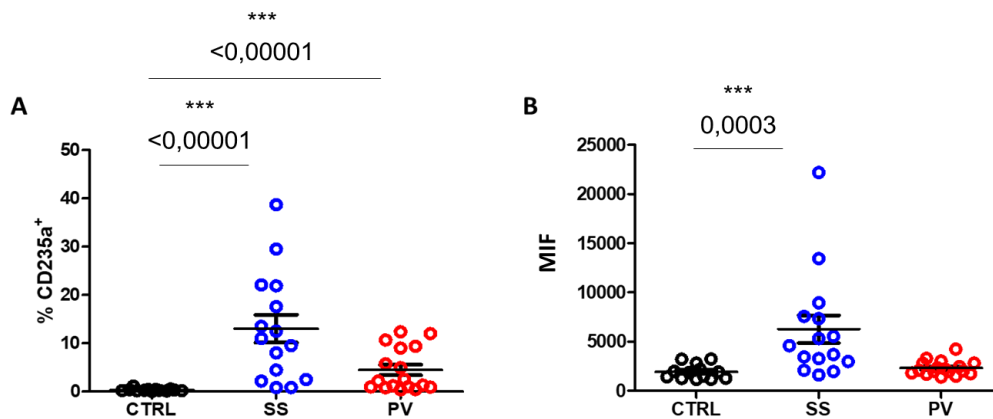


Figura 15. Fagocitose de hemácias pelos monócitos circulantes. Porcentagem de monócitos circulantes que fagocitaram células eritroides, indicados pela marcação intracelular positiva de glicoforina A (CD235a) (A) e a média de intensidade de fluorescência (MIF) dessa marcação (B) em indivíduos controle (CTRL, em preto), pacientes com anemia falciforme (SS, em azul) e pacientes com policitemia vera (PV, em vermelho). nCTRL:13; nSS:15; nPV:17. Teste de Mann Whitney, $P < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

5.4. Durante a EE, a atividade fagocítica pode ser influenciada tanto pelos monócitos quanto pelas hemácias

Para saber se o aumento da atividade eritrofagocítica vista nos monócitos circulantes estava mais ligada aos monócitos ou às hemácias, foi feita incubação *in vitro* dos monócitos com hemácias marcadas com PKH26 coletados de indivíduos controles e de pacientes. Nossos dados mostram que as hemácias de pacientes com AF foram as responsáveis por induzir maior fagocitose, independentemente da origem do monócito, já que não foram observadas diferenças entre os monócitos de pacientes com AF e os de indivíduos saudáveis (Figuras 16). Com relação aos pacientes com PV, foi observada uma participação tanto da hemácia quanto do monócito no aumento da eritrofagocitose, já que os monócitos dos pacientes com PV fagocitaram mais do que os monócitos de indivíduos saudáveis, independente da hemácia presente (Figura 17).

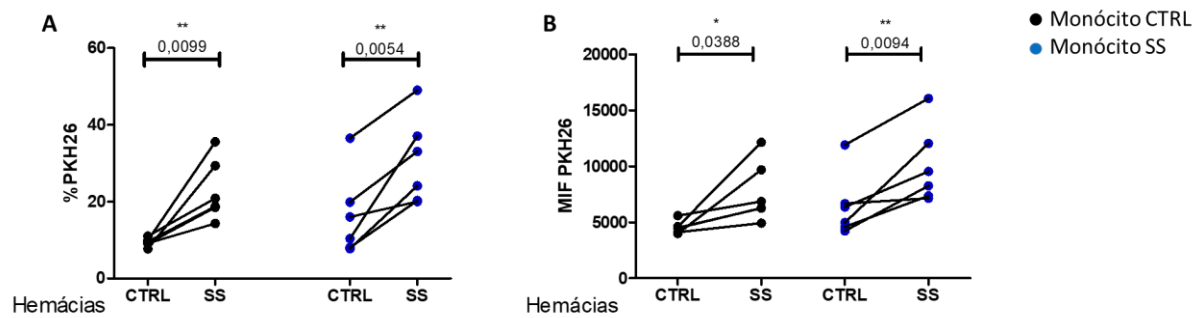


Figura 16. Ensaio de fagocitose *in vitro* de pacientes com anemia falciforme (AF). Porcentagem de monócitos PKH26+ (A) indicando fagocitose de hemácias e média de intensidade de fluorescência (MIF) dessa marcação (B) nos monócitos de indivíduos controle (CTRL, em preto) e pacientes com AF (SS, em azul), incubados com hemácias de CTRL ou de pacientes AF. nCTRL:6; nSS:6. Teste t pareado, $P < 0,05$.

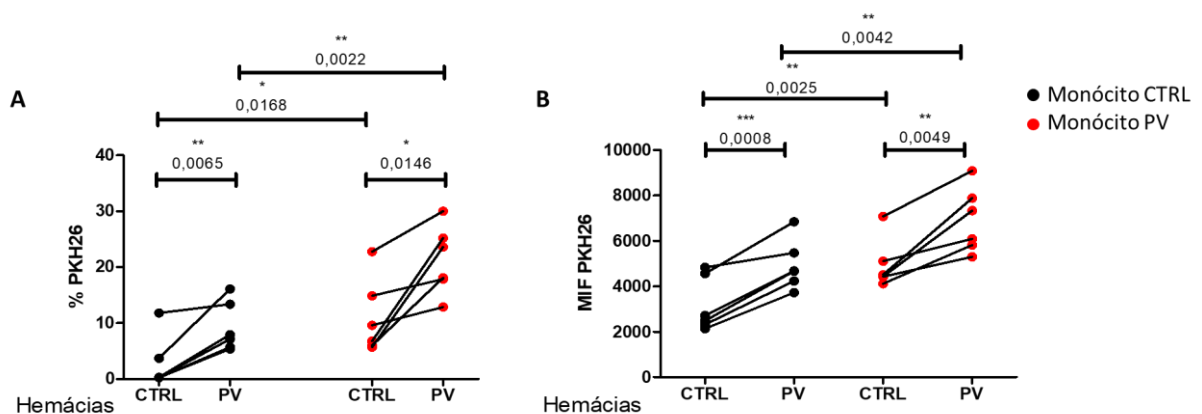


Figura 17. Ensaio de fagocitose *in vitro* de pacientes com policitemia vera (PV). Porcentagem de monócitos PKH26+ (A) indicando fagocitose de hemácias e média de intensidade de fluorescência (MIF) dessa marcação (B) nos monócitos de indivíduos controle (CTRL, em preto) e pacientes com policitemia vera (PV, em vermelho), incubados com hemácias de CTRL ou de pacientes PV. nCTRL:6; nPV:6. Teste t pareado, $P < 0,05$.

Observando a fagocitose por subtipo de monócitos, houve um maior envolvimento dos MC-C em ambas as doenças na fagocitose das hemácias, já que uma maior porcentagem desse subtipo celular se apresentou positiva para PKH26 (marcação realizada nas hemácias), enquanto os MC-NC parecem não ter

participação nessa atividade ou ainda tem sua participação inibida, com maior percentagem PKH26⁻ (Figuras 18 e 19).

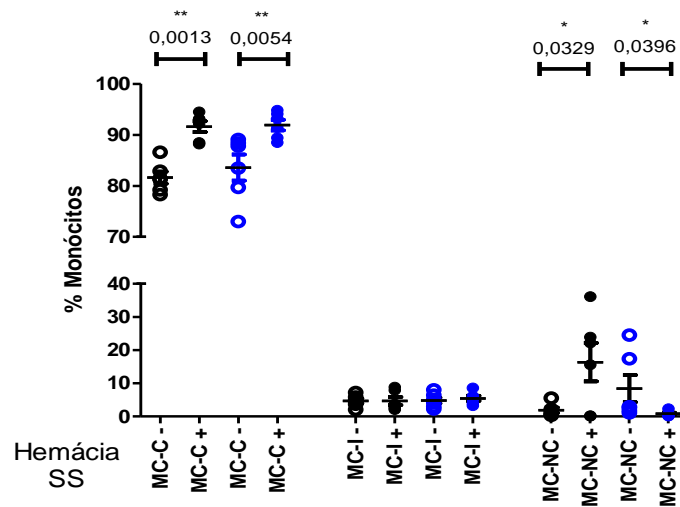


Figura 18. Fagocitose *in vitro* por subtipo de monócito de pacientes com anemia falciforme (AF). Porcentagem de monócitos clássicos (MC-C), intermediários (MC-I) e não-clássicos (MC-NC) que não fagocitaram (-) e que fagocitaram (+) hemácias de pacientes com AF (SS). Em preto os monócitos de indivíduos saudáveis (CTRL) e em azul, monócitos SS. Teste t pareado, $P < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

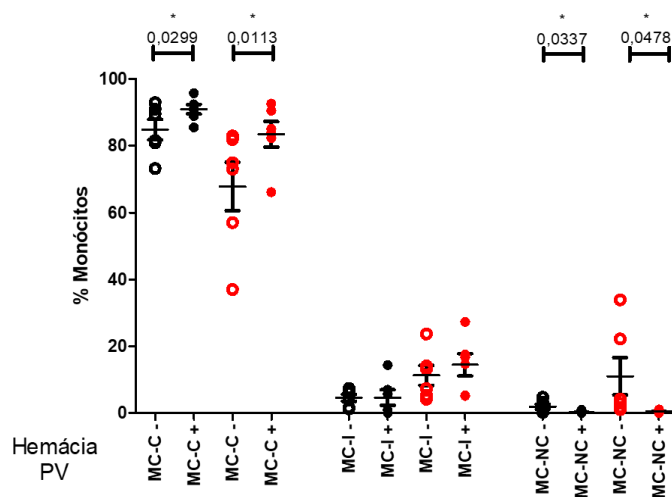


Figura 19. Fagocitose *in vitro* por subtipo de monócito de pacientes com policitemia vera (PV). Porcentagem de monócitos clássicos (MC-C), intermediários (MC-I) e não-clássicos (MC-NC) que não fagocitaram (-) e que fagocitaram (+) hemácias de pacientes com policitemia vera (PV). Em preto os monócitos de indivíduos saudáveis (CTRL) e em vermelho, monócitos PV. Teste t pareado, $P < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

5.5. Eritrofagocitose leva ao aumento de expressão de HO-1 e FPN nos monócitos

Após identificado o aumento na fagocitose de hemácias pelos monócitos dos pacientes, foi avaliado como estava o metabolismo do ferro pós-fagocitose. Para isso, foram investigadas as expressões de HO-1 intracelular e de FPN na membrana nos monócitos de CTRL e de pacientes após fagocitose de hemácias.

Comparando os monócitos que fagocitaram (PKH26+) com os que não fagocitaram (PKH26-), os que participaram da fagocitose tiveram maior expressão de HO-1 (Figura 20). Isso também foi visto com a expressão de FPN – os monócitos que fagocitaram apresentaram maior expressão dessa proteína, (Figura 21). Esses aumentos de expressão foram vistos independentemente do tipo de monócito, sendo relacionado apenas com a fagocitose. Além disso, foi observada uma tendência ($p=0,0731$) de menor expressão de FPN nos monócitos dos pacientes com PV quando comparado aos monócitos de CTRL mesmo antes da fagocitose.

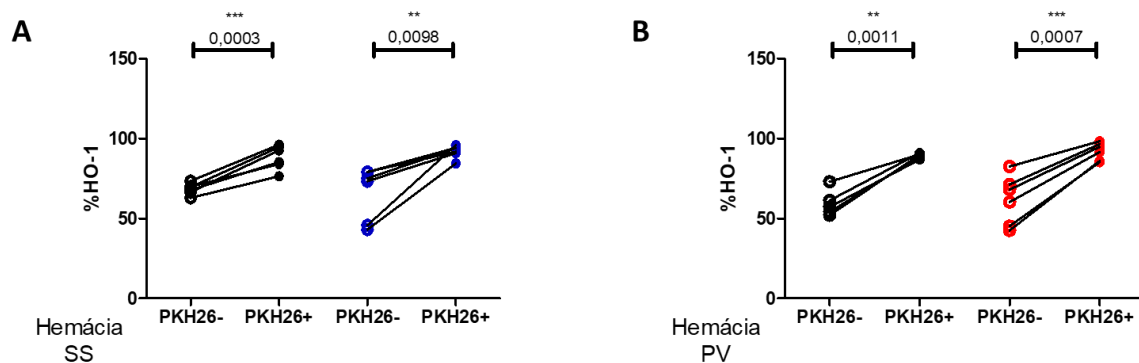


Figura 20. Expressão de heme-oxigenase-1 (HO-1) nos monócitos após a fagocitose de hemácias. Porcentagem de HO-1 nos monócitos que não fagocitaram (PKH26-) e nos que fagocitaram hemácias de pacientes marcadas (PKH26+). A) monócitos de indivíduos saudáveis (CTRL) em preto e de pacientes falciforme (SS), em azul, fagocitando hemácias SS; B) monócitos de CTRL em preto e de pacientes com policitemia vera (PV), em vermelho, fagocitando hemácias PV. nCTRL:6; nSS:6; nPV:5. Teste t pareado, $P<0,05$.

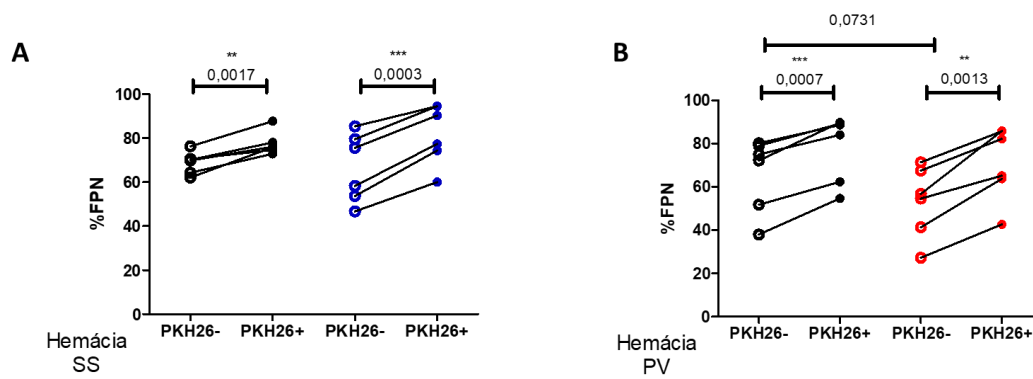


Figura 21. Expressão de ferroportina (FPN) nos monócitos após a fagocitose de hemácias. Porcentagem de FPN nos monócitos que não fagocitaram (PKH26-) e nos que fagocitaram (PKH26+) hemácias marcadas. A) monócitos de indivíduos saudáveis (CTRL) em preto e de pacientes falciforme (SS), em azul, fagocitando hemácias SS; B) monócitos de CTRL em preto e de pacientes com policitemia vera (PV), em vermelho, fagocitando hemácias PV. nCTRL:6; nSS:6; nPV:6. Teste t pareado, $P < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Macrófagos são células-chave durante a eritropoese, influenciando diretamente no processo de proliferação das células eritroides. Eles são ainda mais fundamentais durante a EE, que ocorre de forma crônica em algumas doenças, como a AF e a PV.

Neste estudo, os macrófagos diferenciados em cultura a partir de monócitos circulantes de pacientes com AF apresentaram fenótipo semelhante àquele visto nas células de indivíduos saudáveis. Essa similaridade pode estar relacionada ao ambiente no qual a diferenciação ocorreu, já que as condições *in vitro* são controladas e distintas daquela a qual as células são expostas na circulação dos pacientes. A influência de estímulos externos sobre o fenótipo das células já foi demonstrada antes. Heideveld e colaboradores (89), por exemplo, demonstraram que a presença de glicocorticoides durante a diferenciação de monócitos em macrófagos conduz o fenótipo dessas células para um perfil semelhante aos macrófagos centrais das IEs, gerando um perfil de expressão de moléculas distinto daquele encontrado nas células diferenciadas na ausência do fator. Assim, é possível que, se essas células forem estimuladas com algum fator inflamatório, o fenótipo resultante dessa estimulação poderá ser distinto entre os grupos. A única distinção notada entre as populações foi uma taxa de diferenciação menor dos monócitos em macrófagos dos pacientes AF. Isso pode indicar que essas células se diferenciam mais lentamente ou sofreram apoptose durante o processo de diferenciação.

Visto que há uma influência do meio no fenótipo das células, foram investigadas as expressões das moléculas ligadas aos macrófagos IEs nos monócitos circulantes coletados diretamente do sangue dos indivíduos. Notou-se uma maior presença desses marcadores nas células dos pacientes com AF e com PV, quando comparado com os monócitos de indivíduos CTRL, principalmente moléculas de adesão a células eritroides e do perfil M2. Nos pacientes com AF, os MC-I apresentaram um fenótipo mais parecido aos macrófagos das IEs e nos pacientes com PV, os MC-NC se mostraram mais parecidos. Esses dados sugerem que os monócitos dos pacientes com EE possuem maior semelhança com os macrófagos que promovem a eritropoese do que os monócitos em condições saudáveis e assim, sugerem uma maior capacidade de influência nos processos que ocorrem nesse

nicho, além de mostrarem que os subtipos de monócitos podem atuar de formas distintas no processo. A depleção dos macrófagos centrais das IEs se mostrou promissora na diminuição da EE em diversas patologias (30,79).

O papel dos monócitos na fagocitose de hemácias senescentes e danificadas já foi visto anteriormente. Os dados mostram uma diminuição na expressão de Sirp- α nos MC-NC dos pacientes AF e nos MC-I dos pacientes PV, o que sugere uma maior fagocitose de hemácias nessas células do que nos monócitos de CTRL, já que a perda do Sirp- α resultaria na diminuição da capacidade de reconhecer o CD47 e dariam início ao processo de fagocitose também de hemácias saudáveis. Assim, é possível que os monócitos de pacientes AF e com PV estejam envolvidos não só com a eritropoese, mas também com a retirada das hemácias da circulação. De fato, a interação entre Sirp- α e CD47 é investigada como alvo de tratamento anticâncer, com a busca de mecanismos que bloqueiem essa ligação, já que células tumorais costumam ter superexpressão de CD47, levando à sua permanência nos tecidos (90,91). Entretanto, apenas isso não parece ser o suficiente para que os macrófagos aumentem a capacidade de fagocitose. Bian e colaboradores (92), demonstraram que camundongos com bloqueio de Sirp- α ou CD47 não tiveram aumento de fagocitose de hemácias bloqueadas em condições normais. Esse cenário muda, em condições inflamatórias, levando a um quadro de anemia severa desses animais mostrando o quanto a inflamação pode modular a interação entre essas duas moléculas.

O aumento da fagocitose foi notado pela presença de glicoforina A no interior dos monócitos circulantes de ambas as doenças – o que não foi visto nos indivíduos CTRL. Os monócitos de pacientes AF já foram previamente ligados a fagocitose de hemácias, tanto no estado estável da doença quanto durante crises agudas (61), mas isso ainda não havia sido documentado na PV. Wang e colaboradores (93) mostraram que os eritrócitos com a mutação JAK2 V617F apresentam redução da expressão de CD47, sendo mais susceptíveis a fagocitose por macrófagos com ou sem a mutação, quando comparado com eritrócitos saudáveis, tanto no modelo animal, quanto nas culturas com células de pacientes e indivíduos saudáveis, levando a uma sobrecarga dos macrófagos, que seriam impossibilitados de realizar suas outras funções. Isso evidencia que, durante a EE, os

monócitos circulantes participam da fagocitose das hemácias, função primariamente desempenhada pelos macrófagos.

Durante nosso ensaio de fagocitose *in vitro*, foi possível observar que nos pacientes com AF a atividade fagocítica está mais relacionada às hemácias do que aos monócitos, já que a exposição dos monócitos AF a hemácias CTRL não resultou no aumento desse processo, indicando que não é uma função inata dessas células. Por outro lado, na PV tanto monócitos quanto hemácias influenciam a fagocitose, já que se notou um aumento dessa atividade quando os monócitos de pacientes com PV foram expostos a hemácias saudáveis. Investigações futuras poderiam determinar se a presença da mutação de JAK2 em toda linhagem mieloide, incluindo nos monócitos, poderia estar envolvida com a alteração da função dessas células.

A depleção dos macrófagos das IEs em modelo animal de PV levou à melhora de alguns aspectos das doenças, como a esplenomegalia, reticulocitose, eritrocitose e hematócrito (HTC) elevado. Por outro lado, a depleção na anemia hemolítica levou à limitação da eritropoese na medula óssea e no baço e demonstra a importância dessas células na recuperação dessa condição (30,79). Sabe-se que os monócitos são recrutados para o baço durante situações de estresse para a diferenciação em macrófagos (50). Assim, a depleção dos monócitos em modelo animais de PV e AF poderia revelar o grau de participação dessas células nos processos das doenças.

A maior presença de HO-1 e de FPN nos monócitos que participaram da fagocitose indica, respectivamente, um aumento da capacidade de catabolizar o heme liberado pelas hemácias fagocitadas e da capacidade de exportar o ferro resultante dessa quebra. Os aumentos de expressão de moléculas do metabolismo de ferro após a fagocitose sugerem influência importante dos monócitos na disponibilidade de ferro para suprir a demanda na produção de células eritroides.

Uma das maiores limitações encontradas nesse estudo foi o uso de HU pela maioria dos pacientes, tanto no grupo de AF, quanto no grupo PV, não sendo possível realizar uma comparação entre grupos com e sem tratamento. Essa comparação seria importante devido à já documentada influência do uso de medicamentos no fenótipo das células e na distribuição dos subtipos de monócitos, além da sua atuação direta na inflamação e hemólise. Apesar de existir essa limitação,

o tratamento não fez com que o perfil de expressão encontrado nas células dos pacientes fosse igual ao encontrado das células de indivíduos saudáveis.

Em resumo, macrófagos diferenciados em cultura (condições controladas) de pacientes com AF não apresentaram fenótipos diferentes. Por outro lado, subtipos de monócitos tanto de pacientes com AF quanto de pacientes com PV possuem expressão alterada de moléculas importantes para o processo da eritropoese, sugerindo um papel dessas células na EE. Apesar de serem doenças com fisiopatologias diferentes, a AF e a PV apresentam EE e os monócitos circulantes dos pacientes com ambas as doenças participam da fagocitose de hemácias, porém as hemácias dos pacientes com AF parecem desempenhar papel mais decisivo nessa função, enquanto na PV, tanto as hemácias quanto os monócitos influenciam da atividade fagocítica.

Dessa forma, a hipótese final é que, em ambas as doenças que ativam mecanismos de EE, os monócitos circulantes são capazes de adquirir características que os habilitam a fagocitar as hemácias e a reciclar o ferro do heme através do aumento da HO-1. O aumento na expressão da FPN por essas células após a fagocitose das hemácias indica que, após o metabolismo do ferro, este é externalizado. Em conjunto com os dados que mostram que os monócitos expressam moléculas de adesão a eritroblastos, nossos resultados sugerem que essas células têm o potencial de contribuir com a eritropoese. Nas situações que fogem à situação fisiológica, a contribuição dos monócitos circulantes nesses processos pode ser relevante, especialmente na AF onde há disfunção esplênica e o baço não é capaz de desempenhar corretamente o seu papel na eritropoese extramedular. Os eritroblastos circulantes presentes na AF, embora não abundantes, poderiam se ligar aos monócitos repletos de moléculas de adesão, o que estimularia a eritropoese. Adicionalmente, na AF os monócitos circulantes poderiam contribuir desde que haja hipoesplenismo, para a hemólise extravascular, reduzindo a proporção de hemólise intravascular e diminuindo os efeitos sistêmicos desse processo, com redução de óxido nítrico, lesão endotelial, hipertensão pulmonar e priapismo, entre outros. Na PV, o baço também pode ser afetado devido à grande quantidade de células circulantes e os monócitos possivelmente podem estar atuando na eritropoese extramedular (Figura 22). Essa hipótese ainda precisa ser validada por ensaios de diferenciação *in vitro* de células eritroides na presença de monócitos de pacientes. No geral, esses

resultados contribuem para o maior entendimento da eritrofagocitose e eritropoese de estresse que ocorrem na AF e na PV e a contribuição dos monócitos nesses processos, o que pode abrir caminhos para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Esses resultados estão de acordo com o que já foi descrito sobre monócitos na AF e fornecem maiores detalhes sobre marcadores específicos presentes nessas células na doença e evidenciam pela primeira vez o fenótipo dos monócitos e seu papel na fagocitose na policitemia vera.

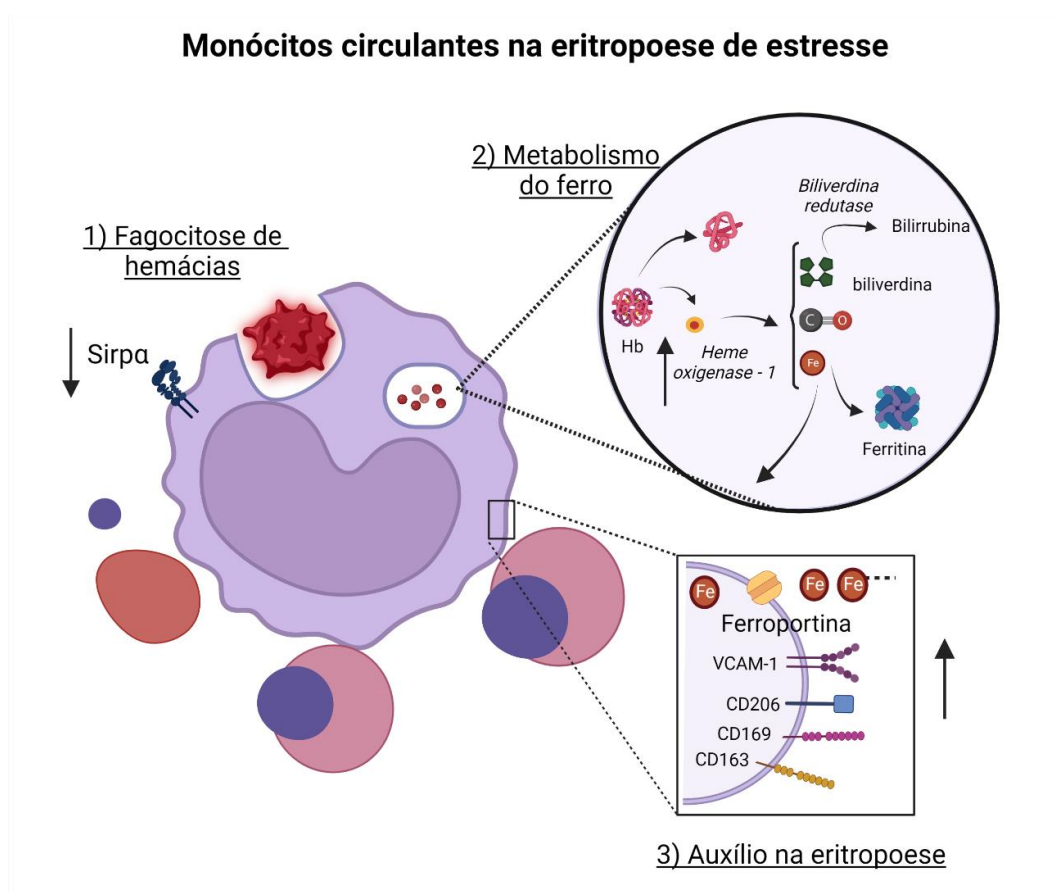


Figura 22. Hipótese do envolvimento dos monócitos circulantes na eritropoese de estresse. Durante situações de estresse hematopoético, os monócitos parecem ser capazes de realizar a fagocitose de hemácias circulantes, contribuírem para o metabolismo do ferro com o aumento de expressão de heme-oxigenase-1 e ferroportina, além de expressarem moléculas que permitem a adesão às células eritroides, potencialmente influenciando no processo de eritropoese. Assim, cria-se a hipótese de que os monócitos podem atuar e ter um papel relevante na eritropoese extramedular.

7. CONCLUSÃO

- Monócitos circulantes de pacientes com eritropoese de estresse, como anemia falciforme e policitemia vera, possuem perfil de expressão de moléculas mais semelhante àquele presente nos macrófagos das ilhas eritroblásticas.
- Apesar de não serem os principais responsáveis pela fagocitose de hemácias danificadas e senescentes, os monócitos circulantes participam desse processo em situações de estresse, como já foi visto anteriormente na anemia falciforme e é observado pela primeira vez neste trabalho em pacientes com policitemia vera. Essa atividade é influenciada pelas hemácias na anemia falciforme e tanto pelas hemácias quanto monócitos na policitemia vera.
- As características encontradas nos monócitos de pacientes com eritropoese de estresse indicam possível envolvimento dessas células nos processos que ocorrem nas ilhas eritroblásticas, como eritropoese, fornecimento de ferro e eritrofagocitose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Williams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018;49(4):595–613.
2. Austermann J, Roth J, Barczyk-kahlert K. The Good and the Bad : Monocytes ' and Macrophages ' Diverse Functions in Inflammation. *Cells*. 2022;11(1979).
3. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation : circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2014;2(1):1–9.
4. Saeed AS, Hossein M, Taghadosi M, Fatemeh SE, Bitam M, Mohammadi A, et al. Macrophage plasticity , polarization , and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233:6425–40.
5. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(November):723–37.
6. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets : implications for health and disease. *Singapore Immunol Netw SlgN*. 2012;53:41–57.
7. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2019;10(2035).
8. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1 / M2 polarization. *Eur J Pharmacol [Internet]*. 2020;877(November 2019):173090. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>
9. Liu L, Stokes J V, Tan W, Pruett SB. An optimized flow cytometry panel for classifying macrophage polarization. *J Immunol Methods*. 2022;511(113378).
10. Guarda CC, Siveira-Mattos PSM, Yahouédéhou SCMA, Santiago RP, Aleluia MM, Figueiredo CVB, et al. Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. *Sci Rep*. 2019;9(14829).

11. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of Metabolism by Macrophages Minireview. *Cell Metab.* 2012;15(4):432–7.
12. Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim J. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res.* 2012;53:11–24.
13. Haschka D, Petzer V, Kocher F, Tschurtschenthaler C, Schaefer B, Seifert M, et al. Classical and intermediate monocytes scavenge non-transferrin-bound iron and damaged erythrocytes. *JCI Insight.* 2019;4(8):1–23.
14. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J.* 2011;434:365–81.
15. Sukhbaatar N, Weichhart T. Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals.* 2018;11(137).
16. Vogt AS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4591).
17. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852:1347–59.
18. Dev S, Babitt JL. Overview of Iron Metabolism in Health and Disease. *hemodial int.* 2018;21(Suppl 1):6–20.
19. Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Maron-Jimenez M-J, Ganz T, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab.* 2012;15(6):918–24.
20. Cherayil BJ. Iron and immunity: immunological consequences of iron deficiency and overload. *Arch Immunol Ther Exp.* 2010;58(6):407–15.
21. Gregory C, Eaves A. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood.* 1978;51(3):527–37.
22. Zivot A, Lipton JM, Narla A, Blanc L. Erythropoiesis: Insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Mol Med.* 2018;24(1):1–15.
23. Antonio M, Rodrigo Z, Calado T. Eritropoese e Eritropoetina. In: *Tratado de*

- Hematologia. 2013. p. 15–22.
24. 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.* 2021;8(February):1–16.
 25. Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Hemoglobin: structure, function and allostery. *Subcell Biochem.* 2020;94:345–82.
 26. Bessis M. Erythroblastic Island, functional unity of bone marrow. *Rev Hematol.* 1958;13(1):8–11.
 27. Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: Niches for erythropoiesis. *Blood.* 2008;112(3):470–8.
 28. Yeo JH, Lam YW, Fraser ST. Cellular dynamics of mammalian red blood cell production in the erythroblastic island niche. *Biophys Rev.* 2019;11(6):873–94.
 29. Manwani D, Bieker JJ. The Erythroblastic Island. *Curr Top Dev Biol.* 2008;82(07):23–53.
 30. Chow A, Huggins M, Ahmed J, Hashimoto D, Lucas D, Kunisaki Y, et al. CD169 + macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat Med.* 2013;19(4):429–36.
 31. Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature.* 2005;437(September):754–8.
 32. Sadahira Y, Yasuda T, Yoshino T, Manabe T, Takeishi T. Impaired splenic erythropoiesis in phlebotomized mice injected with CL2MDP-liposome : an experimental model for studying the role of stromal macrophages in erythropoiesis Abstract : Erythropoiesis occurs in the presence of erythropoietin (EPO) without m. *Journal Leukoc Biol.* 2000;68(October):464–70.
 33. Hanspal M, Hanspal JS. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: A 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood.* 1994;84(10):3494–504.

34. Morris L, Crockerf PR, Fraser I, Hill M, Gordon S. Expression of a divalent cation-dependent erythroblast adhesion receptor by stromal macrophages from murine bone marrow. *J Cell Sci.* 1991;99:141–7.
35. Rhodes MM, Kopsombut P, Bondurant MC, Price JO, Koury MJ. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood.* 2008;111(3):1700–8.
36. Li W, Wang Y, Zhao H, Zhang H, Xu Y, Wang S, et al. Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages. *Blood.* 2019;134(5):480–91.
37. Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very Late Activation Antigen 4-Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Interaction Is Involved in the Formation of Erythroblastic Islands By Yoshito Sadahira, Tadashi Yoshino,* and Yasumasa Monobe. *J Exp Med.* 1995;181(January):411–5.
38. Fabriek BO, Polfliet MMJ, Vloet RPM, Van Der Schors RC, Ligtenberg AJM, Weaver LK, et al. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood.* 2007;109(12):5223–9.
39. Javan GT, Can I, Yeboah F, Lee Y, Soni S. Novel interactions between erythroblast macrophage protein and cell migration. *Blood Cells, Mol Dis.* 2016;60:24–7.
40. Winn NC, Volk KM, Hasty AH. Regulation of tissue iron homeostasis: the macrophage “ferrostat .” *JCI Insight.* 2020;5(2):1–14.
41. Luo Y, Shao L, Chang J, Feng W, Liu YL, Cottler-Fox MH, et al. M1 and M2 macrophages differentially regulate hematopoietic stem cell self-renewal and ex vivo expansion. *Blood Adv.* 2018;2(8):859–70.
42. Borges MD, Sesti-costa R. Macrophages : key players in erythrocyte turnover. *Hematol , Transfus Cell Ther.* 2022;44(4):574–81.
43. Burger P, Hilarius-Stokman P, De Korte D, Van Den Berg TK, Van Bruggen R. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood.*

- 2012;119(23):5512–21.
44. Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Mueller S. Heme Oxygenase-1 and Iron in Liver Inflammation: A Complex Alliance. *Curr Drug Targets*. 2012;11(12):1541–50.
 45. Cao YA, Kusy S, Luong R, Wong RJ, Stevenson DK, Contag CH. Heme oxygenase-1 deletion affects stress erythropoiesis. *PLoS One*. 2011;6(5):1–8.
 46. Paulson RF, Shi L, Wu D-C. Stress Erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(3):139–45.
 47. Paulson RF, Ruan B, Hao S, Chen Y. Stress Erythropoiesis is a Key Inflammatory Response. *Cells*. 2020;9(634):1–14.
 48. Xiang J, Wu D, Chen Y, Paulson RF. In vitro culture of stress erythroid progenitors identifies distinct progenitor populations and analogous human progenitors. *Blood*. 2015;125(11):1803–12.
 49. Liao C, Hardison RC, Kennett MJ, Carlson BA, Paulson RF, Prabhu KS. Selenoproteins regulate stress erythroid progenitors and spleen microenvironment during stress erythropoiesis. *Blood*. 2018;131(23):2568–80.
 50. Liao C, Prabhu KS, Paulson RF. Monocyte-derived macrophages expand the murine stress erythropoietic niche during the recovery from anemia. *Blood*. 2018;132(24):1–4.
 51. Kim A, Nemeth E. New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(3):199–205.
 52. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *ScientificWorldJournal*. 2009;9:46–67.
 53. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4:1–22.
 54. Linus Pauling HAI, Singer SJ, Wells IC. "Sickle cell anemia, a molecular disease." *Science* (80-). 1949;110(2865):543–8.
 55. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease.

- Lancet [Internet]. 2017;390(10091):311–23. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9)
56. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561–73.
 57. Rai P, Desai PC, Ataga KI. The Evolving Landscape of Drug Therapies for Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2022;36:1285–312.
 58. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* [Internet]. 2010;376(9757):2018–31. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X)
 59. Hoss S EI, Cochet S, Godard A, Yan H, Frati G, Boutonnat-faucher B, et al. Fetal hemoglobin rescues ineffective erythropoiesis in sickle cell disease. *Haematologica*. 2021;106(10):2707–19.
 60. El Nemer W, Godard A, El Hoss S. Ineffective erythropoiesis in sickle cell disease: New insights and future implications. *Curr Opin Hematol*. 2021;28(3):171–6.
 61. Liu Y, Zhong H, Bao W, Mendelson A, An X, Shi P, et al. Patrolling monocytes scavenge endothelial-adherent sickle RBCs: A novel mechanism of inhibition of vaso-occlusion in SCD. *Blood*. 2019;134(7):579–90.
 62. Liu Y, Jing F, Yi W, Mendelson A, Shi P, Walsh R, et al. HO-1hi patrolling monocytes protect against vaso-occlusion in sickle cell disease. *Blood*. 2018;131(14):1600–10.
 63. Wood JC, Tyszka JM, Carson S, Nelson MD, Coates TD. Myocardial iron loading in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease. *Blood*. 2004;103(5):1934–6.
 64. van Beers EJ, Yang Y, Raghavachar N, Tian X, Allen D, Nichols J, et al. Iron, inflammation, and early death in adults with Sickle cell disease. *Circ Res*. 201AD;116(2):298–306.
 65. Nyffenegger N, Zennadi R, Kalleda N, Flace A, Ingoglia G, Buzzi RM, et al. The oral ferroportin inhibitor vamifeport improves hemodynamics in a mouse model

- of sickle cell disease. *Blood*. 2022;140(7):769–81.
66. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459–68.
67. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* [Internet]. 2017;129(6):667–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-10-695940>
68. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054–61.
69. James C, Ugo V, Le Couedic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Medecine/Sciences*. 2005;21(6–7):669–70.
70. Dai C, Krantz S, Dessypris E, Means RJ, Horn S, Gilbert H. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1992;80(4):891–9.
71. Spivak JL. Polycythemia vera, the hematocrit, and blood-volume Physiology. *N Engl J Med*. 2013;368(1):76–8.
72. Hultcrantz M, Dickman PW, Landgren O, Kristinsson SY, Andersson TM, Service M, et al. Risk of arterial and venous thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasm: a population-based cohort study. *Ann Intern Med*. 2018;168(5):317–25.
73. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. Polycythemia vera: historical oversights, diagnostic details, and therapeutic views. *Leukemia*. 2021;35(12):3339–51.
74. Bassan VL, Barretto GD, de Almeida FC, Palma PVB, Binelli LS, da Silva JPL, et al. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms display alterations in monocyte subpopulations frequency and immunophenotype. *Med Oncol*. 2022;39(12):1–12.

75. Ishii T, Bruno E, Hoffman R, Xu M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2 V617F mutation in polycythemia vera. *Blood*. 2006;108(9):3128–34.
76. Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Massé A, Godin I, Le Couedic JP, et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007;109(1):71–7.
77. Molitor DCA, Boor P, Bunes A, Schneider RK, Teichmann LL, Körber RM, et al. Macrophage frequency in the bone marrow correlates with morphologic subtype of myeloproliferative neoplasm. *Ann Hematol*. 2021;100(1):97–104.
78. Morsia E, Gangat N. Myeloproliferative Neoplasms with Monocytosis. *Curr Hematol Malig Rep*. 2022;17(1):46–51.
79. Ramos P, Casu C, Gardenghi S, Breda L, Crielaard BJ, Guy E, et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. *Nat Med*. 2013;19(4):437–45.
80. van den Akker E, Satchwell TJ, Pellegrin S, Daniels G, Toyé AM. The majority of the in vitro erythroid expansion potential resides in CD34 - cells, outweighing the contribution of CD34 + cells and significantly increasing the erythroblast yield from peripheral blood samples. *Haematologica*. 2010;95(9):1594–8.
81. Heideveld E, Masiello F, Marra M, Esteghamat F, Yağcı N, von Lindern M, et al. CD14+ cells from peripheral blood positively regulate hematopoietic stem and progenitor cell survival resulting in increased erythroid yield. *Haematologica*. 2015;100(11):1396–406.
82. Haschka D, Petzer V, Kocher F, Tschurtschenthaler C, Schaefer B, Seifert M, et al. Classical and intermediate monocytes scavenge non-transferrin-bound iron and damaged erythrocytes. *JCI Insight*. 2019;4(8):1–23.
83. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(2):373–93.
84. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et

- al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060–72.
85. Youssef LA, Rebbaa A, Pampou S, Weisberg SP, Stockwell BR, Hod EA, et al. Increased erythrophagocytosis induces ferroptosis in red pulp macrophages in a mouse model of transfusion. *Blood*. 2018;131(23):2581–93.
86. Kovtunovych G, Eckhaus MA, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Rouault TA. Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: Effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood*. 2010;116(26):6054–62.
87. Theurl I, Hilgendorf I, Nairz M, Tymoszyk P, Haschka D, Asshoff M, et al. On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat Med*. 2016;22(July):945–951.
88. Stockwell BR, Angeli JPF, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al. Ferroptosis : A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism , Redox Biology , and Disease. *Cell*. 2017;171(October):273–85.
89. Heideveld E, Neil LAH, Cross SJ, Alphen FPJ Van, Biggelaar M Van Den, Toye AM, et al. Glucocorticoids induce differentiation of monocytes towards macrophages that share functional and phenotypical aspects with erythroblastic island macrophages. *Haematologica*. 2018;103(3):395–405.
90. Yang H, Shao R, Huang H, Wang X, Rong Z, Lin Y. Engineering macrophages to phagocytose cancer cells by blocking the CD47 / SIRP α axis. *Cancer Med*. 2019;8:4245–53.
91. Veillette A, Chen J. SIRP α – CD47 Immune Checkpoint Blockade in Anticancer Therapy. *Trends Immunol*. 2017;39(3):173–84.
92. Bian Z, Shi L, Guo Y, Lv Z, Tang C, Niu S, et al. Cd47-Sirp α interaction and IL-10 constrain inflammation-induced macrophage phagocytosis of healthy self-cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;(8):E5434–E5443.
93. Wang W, Liu W, Fidler T, Wang Y, Tang Y, Woods B, et al. Macrophage inflammation, erythrophagocytosis and accelerated atherosclerosis in Jak2

V617F mice. *Circ Res.* 2018;123(11):e35–47.

9. APÊNDICES

9.1. Tabela de dados demográficos e laboratoriais - pacientes com AF

Apêndice 1. Tabela com os dados demográficos e laboratoriais dos grupos de pacientes com anemia falciforme.

	Mediana (Mínima – Máxima)
Idade (n=39)	43 (20-60)
RBC (3,9-6x10 ⁶ /ul) (n=39)	2,28 (1,53 - 3,49)
PLT (130-400x10 ³ /μL) (n=39)	334 (122 - 720)
WBC (3,7-11,1x10 ³ /μL) (n=39)	5,37 (3,55 - 11,95)
HCM (27,3-32,6pg) (n=39)	37,7 (27,5 - 44,9)
VCM (82-98fl) (n=39)	115,4 (84,4 - 139,9)
Hb (11,8-16,7g/dL) (n=39)	8,3 (6 - 11)
Ht (36-50%) (n=39)	26,2 (17,5 - 32,6)
Retic (22-139x10 ⁹ /μL) (n=39)	243 (67,8 - 923)
Monócitos (0,2-0,92x10 ³ /μL) (n=39)	0,33 (0,12 - 1,27)
Ferro Sérico (70-180ug/dL) (n=32)	116,5 (38 - 208)
Ferritina (m:30-400; f:13-150ng/dL) (n=32)	593 (25,1 - 3039)
TIBC (255-450ug/dL) (n=32)	272,5 (154 - 411)
IST (20-45%) (n=32)	40,5 (11 - 96)
Bilirrubina indireta (0,10-1mg/dL) (n=22)	1,52 (0,81 - 6,24)
Bilirrubina total (0,3-1,2mg/dL) (n=22)	1,78 (0,44 - 6,94)
HbF (%) (n=33)	16,1 (1,6 - 30,5)
HbS (%) (n=33)	77,1 (53,9 - 91,4)
	N
Sexo (masculino/feminino) (n=39)	17/22
Uso de hidroxiureia (n=39)	33

RBC: contagem de hemácias, PLT: plaqueta, WBC: leucócitos totais, HCM: hemoglobina corpuscular média, VCM: volume corpuscular médio, Hb: hemoglobina, HTC: hematócrito, Retic: reticulócitos absolutos, TIBC: capacidade total de ligação do ferro, IST: índice de saturação de transferrina.

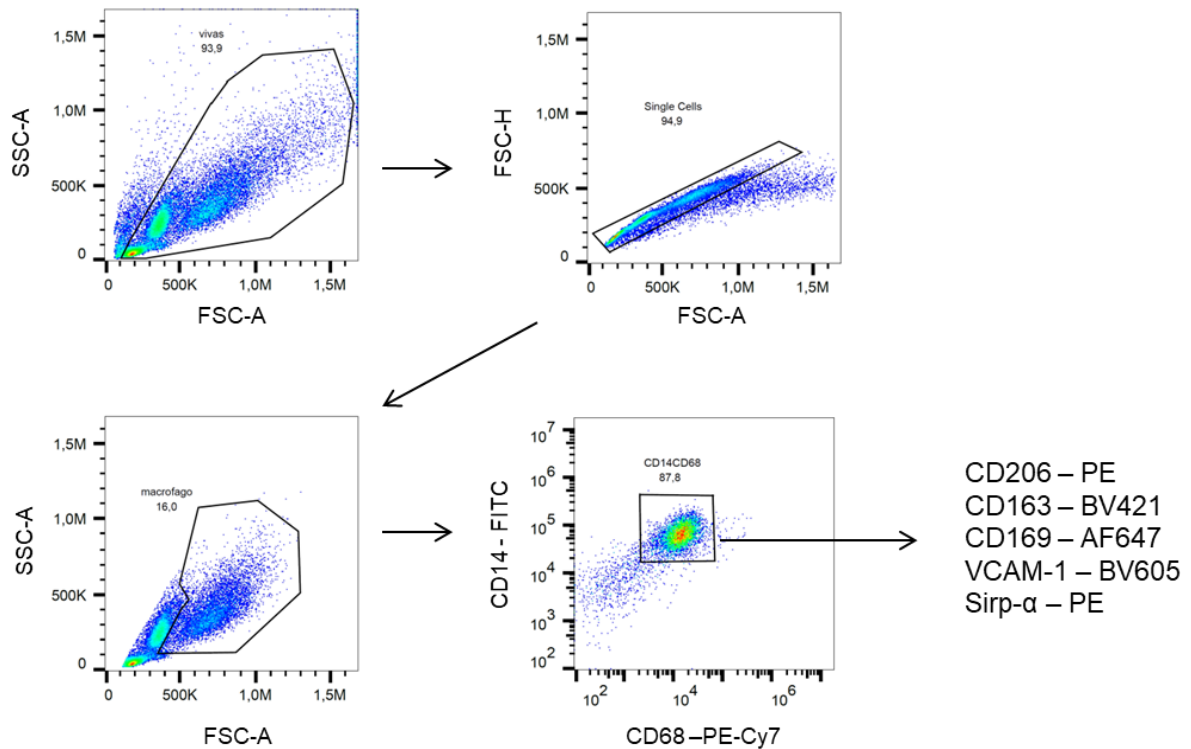
9.2. Tabela de dados demográficos e laboratoriais – pacientes com PV

Apêndice 2. Tabela com os dados demográficos e laboratoriais dos grupos de pacientes com policitemia vera.

	Mediana (Mínima – Máxima)
Idade (n=31)	67 (24-77)
RBC (3,9-6x10 ⁶ /ul) (n=31)	4,09 (2,71 - 8,12)
PLT (130-400x10 ³ /μL) (n=31)	349 (137 - 898)
WBC (3,7-11,1x10 ³ /μL) (n=31)	5,79 (2,97 - 16,29)
HCM (27,3-32,6pg) (n=31)	32,9 (17,8 - 40,3)
VCM (82-98fl) (n=31)	101,6 (65,4 - 124,6)
Hb (11,8-16,7g/dL) (n=31)	14,3 (2,97 - 16,29)
Ht (36-50%) (n=31)	8.98 (4.67 - 14.67)
Monócitos (0,2-0,92x10 ³ /μL) (n=31)	0,25 (0,14 - 0,7)
Ferro Sérico (70-180ug/dL) (n=18)	75,5 (23 - 143)
Ferritina (m:30-400; f:13-150ng/dL) (n=18)	58,5 (12,4 - 429,8)
TIBC (255-450ug/dL) (n=18)	359,5 (261 - 630)
IST (20-45%) (n=18)	20 (4 - 37)
	N
Sexo (masculino/feminino) (n=31)	16/15
Uso de hidroxiureia (n=31)	29
Sangrias terapêuticas (n=31)	3
Presença da mutação JAK V617F (n=31)	29
Ausência da mutação JAK V617F e presença de mutação no éxon 12 de JAK2	2

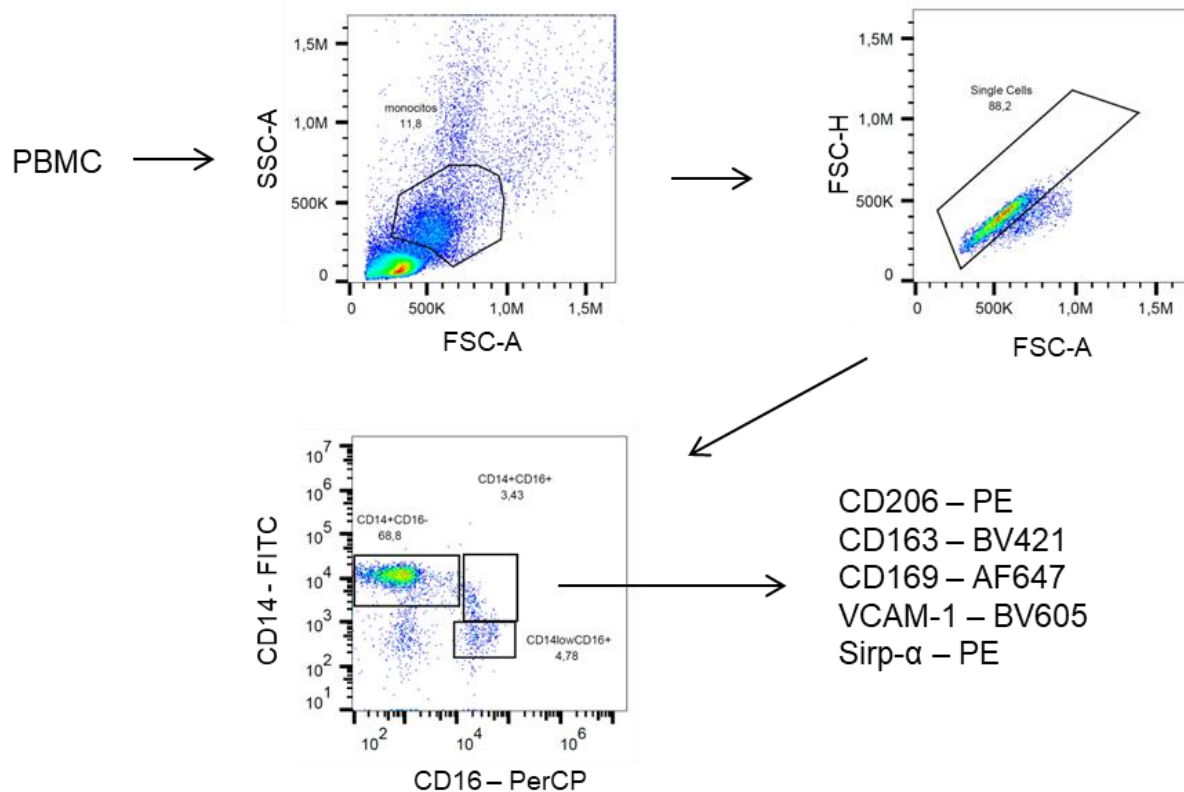
RBC: contagem de hemácias, PLT: plaqueta, WBC: leucócitos totais, HCM: hemoglobina corpuscular média, VCM: volume corpuscular médio, Hb: hemoglobina, HTC: hematócrito, TIBC: capacidade total de ligação do ferro, IST: índice de saturação de transferrina.

9.3. Estratégia de análise – fenotipagem de macrófagos



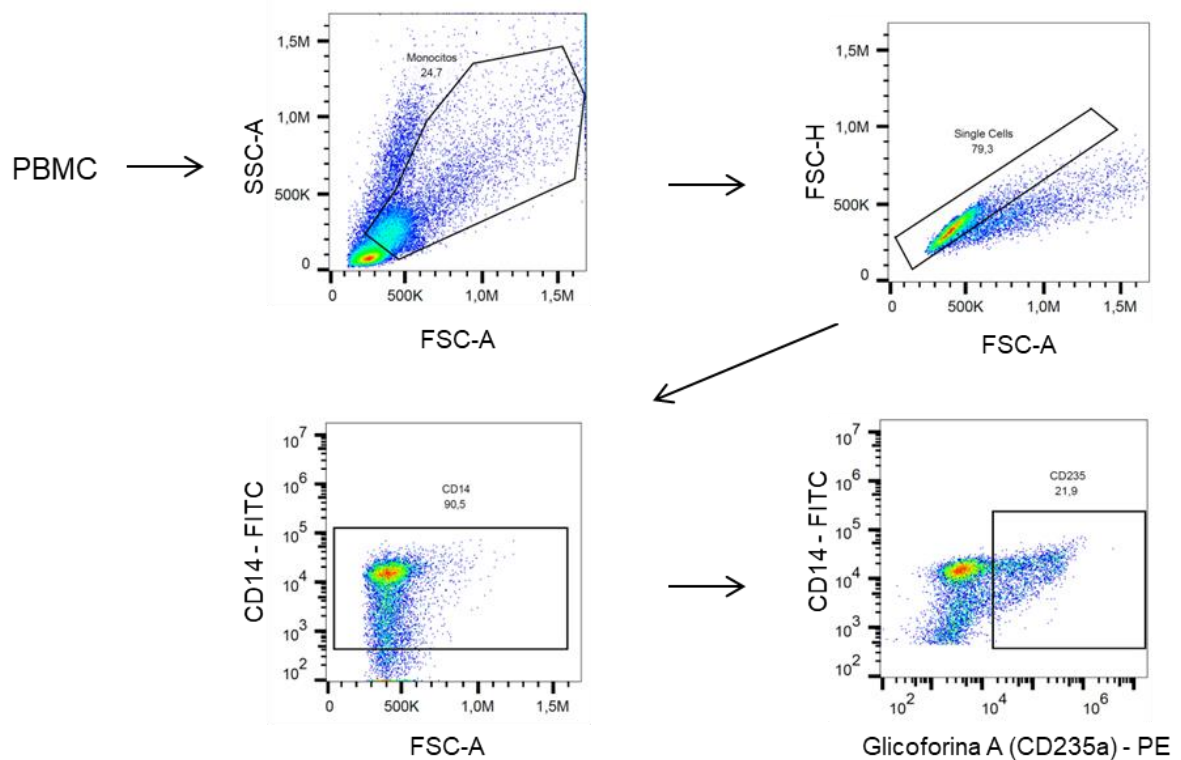
Apêndice 2. Estratégia de seleção da população de macrófagos diferenciados em cultura a partir de monócitos circulantes. Através de citometria de fluxo convencional as células foram selecionadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Separou-se as células que passaram pelos filtros de detecção individualmente (single cells) através do dot plot FSC-HxFSC-A. Elas foram mais uma vez separadas através do dot plot SSC-AxFSC-A para que, em seguida, fosse feita a seleção dos macrófagos CD68⁺CD14⁺. Dentro dessa população duplo-positiva foram feitas as análises quanto a expressão das moléculas de interesse: CD206 (marcador anti-inflamatório), CD163 (receptor do complexo hemoglobina-haptoglobina e molécula de adesão), Sirp- α (sinalizadora de fagocitose), CD169 (molécula e sVCAM-1 (moléculas de adesão à eritrócitos).

9.4. Estratégia de análise – fenotipagem de monócitos



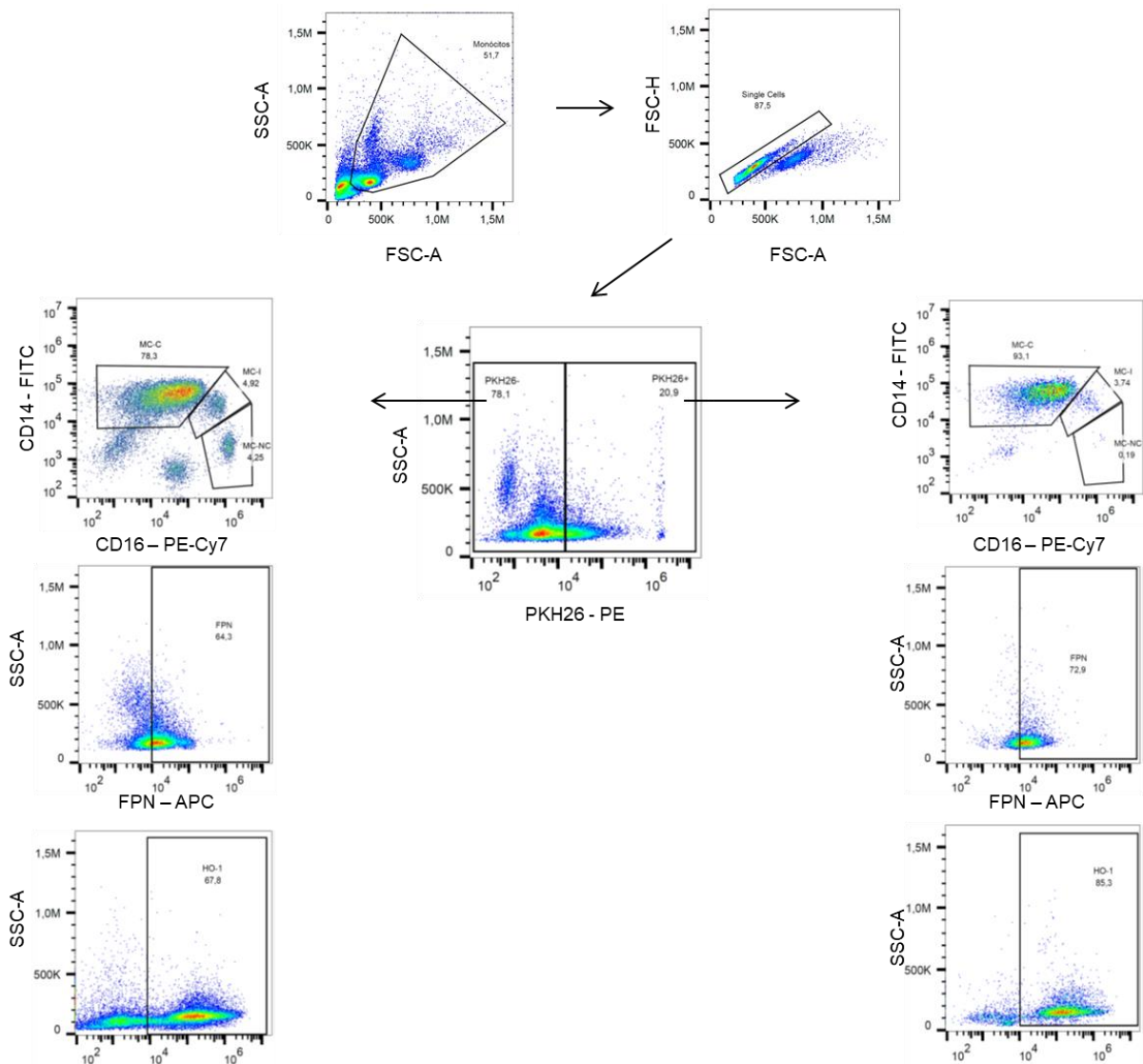
Apêndice 3. Estratégia de seleção de monócitos circulantes presentes nas células mononucleares (PBMC). Através de citometria de fluxo convencional as células foram selecionadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Em seguida, selecionou-se as células que passaram pelos filtros de detecção individualmente (single cells) através do dot plot FSC-HxFSC-A. Os subtipos de monócitos foram selecionados a partir da marcação com CD14 e CD16: CD14⁺CD16⁻ (monócitos clássicos), CD14⁺CD16⁺ (monócitos intermediários) e CD14^{low} CD16⁺ (monócitos não-clássicos), para que então fossem feitas as análises de expressão das moléculas de interesse: CD206 (marcador anti-inflamatório), CD163 (receptor do complexo hemoglobina-haptoglobina e molécula de adesão), Sirp-α (sinalizadora de fagocitose), CD169 (molécula e sVCAM-1 (moléculas de adesão à eritrócitos).

9.5. Estratégia de análise - fagocitose ex vivo



Apêndice 4. Estratégia de seleção de monócitos circulantes presentes nas células mononucleares (PBMC). Através de citometria de fluxo convencional as células foram selecionadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Em seguida, selecionou-se as células que passaram pelos filtros de detecção individualmente (single cells) através do dot plot FSC-HxFSC-A. Foram selecionadas as células com presença de CD14 (monócitos) e em seguida, utilizou-se a marcação da glicoforina A (CD235a) intracelular para quantificar a porcentagem de monócitos que haviam fagocitado células eritroides.

9.6. Estratégia de análise - ensaio de fagocitose *in vitro*



Apêndice 5. Estratégia de seleção dos monócitos mantidos em cultura com hemácias marcadas com PKH26 para o ensaio de fagocitose *in vitro*. Através de citometria de fluxo convencional as células foram selecionadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). As células que passaram pelos filtros de detecção individualmente (single cells) foram selecionadas através do dot plot FSC-HxFSC-A. Em seguida, foram separados os monócitos PKH26⁻ e PKH26⁺, respectivamente, aqueles que não participaram da fagocitose de hemácias e as que participaram dessa atividade. Dentro de cada população, foram feitas duas análises: a porcentagem de cada subtipo de monócitos através da marcação com CD14 e CD16 – CD14⁺CD16⁻ (monócitos clássicos), CD14⁺CD16⁻ (monócitos intermediários) e CD14^{low} CD16⁺ (monócitos não-clássicos); e a porcentagem de expressão de ferroportina (FPN) e de hemoxygenase-1 (HO-1).

10. ANEXOS

10.1. Aprovação comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Capacidade de monócitos e macrófagos de pacientes com hemoglobinopatias em promover a eritropoese

Pesquisador: RENATA SESTI COSTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 88768318.6.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.748.637

Apresentação do Projeto:

Resumo:

A eritropoese é um processo dinâmico e complexo pelo qual os progenitores eritróides se desenvolvem em eritrócitos enucleados maduros. Ao longo do processo, há uma queda na capacidade proliferativa e um aumento na expressão do receptor da eritropoietina (Epo) na superfície das células progenitoras. Essas células se diferenciam em proeritroblastos, os quais sofrem maturação citoplasmática e mudanças nucleares que geram, em sequência, eritroblastos basofílicos, policromatófilico e ortocromático. O último expele seu núcleo, se tornando reticulócitos e, por fim, eritrócitos maduros, que circulam na corrente sanguínea até a sua senescência (Gregory & Eaves, 1978; Oikonomidou & Rivella, 2017). O desenvolvimento dos eritrócitos ocorre em nichos especializados na medula óssea, chamados de ilhas eritroblásticas, compostos por um macrófago central cercado por eritroblastos em diferentes estágios de diferenciação (Bessis, 1958; Chasis & Mohandas, 2008). Os macrófagos interagem com os eritroblastos pela ligação da integrina $\alpha 4 \beta 1$ nos eritroblastos com VCAM1 nos macrófagos (Sadahira et al, 1995). Embora a eritropoese seja um processo extremamente ativo durante situações homeostáticas, ela pode ser ainda mais estimulada sob condições de anemia ou hipoxemia, um processo conhecido como eritropoese em estresse. Durante a eritropoese em estresse, o desenvolvimento eritróide se estende a sítios extra medulares, principalmente o baço e o fígado, conduzindo à expansão dos progenitores eritróides, recrutamento de ferro e aumento da

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.748.637

produção de reticulócitos e eritrócitos maduros (Paulson, et al, 2011; Ramos et al, 2010). A patofisiologia de algumas anemias hemolíticas se assemelham a de um estado crônico de eritropoese em estresse. Essas incluem duas doenças aparentemente dicotômicas, a policitemia vera e a b-talassemia. A policitemia vera é caracterizada por eritrocitose extremamente elevada associada com uma mutação constitutivamente ativa no gene JAK2 (V617F), o qual codifica uma proteína que atua na sinalização do receptor da Epo (Baxter et al, 2005; James et al, 2005). Ao contrário, a b-talassemia é caracterizada por anemia, devido à baixa produção de b-globina, e expansão dos progenitores eritróides, o que é atribuído a centenas de mutações no gene da b-globina e seu promotor (Ginzburg & Rivella, 2011; Rivella, 2009; Libani et al, 2008). Ambas as doenças compartilham características da eritropoese em estresse, como esplenomegalia, expansão dos progenitores eritróides e reticulocitose elevada. O desenvolvimento dos eritrócitos, processo chamado de eritropoese, ocorre em nichos especializados na medula óssea, chamados de ilhas eritroblásticas, compostos por um macrófago central cercado por eritroblastos em diferentes estágios de diferenciação. Em situações de anemia ou hipoxemia, ocorre a eritropoese em estresse, a qual se estende a sítios extra medulares, principalmente o baço e o fígado, conduzindo à expansão dos progenitores eritróides, recrutamento de ferro e aumento da produção de reticulócitos e eritrócitos maduros. Os macrófagos são células chave tanto na eritropoese homeostática quanto na eritropoese em estresse, já que sua depleção em modelos murinos impede a proliferação de novos eritroblastos e desenvolvimento de reticulócitos e eritrócitos maduros. Em humanos, alguns monócitos circulantes também parecem desenvolver essa função, aumentando a proliferação e diminuindo a apoptose de células CD34+. Esses monócitos são CD14^{high}CD16⁺ e expressam CD163, CD169 e CD206. Não se sabe, no entanto, se a quantidade desses monócitos ou se sua diferenciação em macrófagos de ilhas eritroblásticas são alteradas durante anemias agudas e hemoglobinopatias com a anemias crônicas, e se esses monócitos contribuem para o desenvolvimento ou a persistência da doença. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é investigar o fenótipo dos monócitos em pacientes com anemias hemolíticas hereditárias e suas capacidades de se diferenciar em macrófagos característicos de ilhas eritroblásticas e de promover a eritropoese. Delineamento experimental: PBMC de pacientes com policitemia vera, b-talassemia e anemia falciforme e de indivíduos controles serão isoladas por gradiente de Ficoll e as células CD34⁺ e os monócitos (CD14⁺) serão isolados por beads magnéticas. Os monócitos serão diferenciados ou não em macrófagos in vitro de três maneiras diferentes: (1) na presença de M-CSF; (2) na presença de MCSF e 10% de soro autólogo; e (3) na presença de M-CSF e dexametasona.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.748.637

- Os monócitos e macrófagos serão marcados com anticorpos fluorescentes anti- CD14, CD16, CD68, CD206, CD163 e CD169 e avaliados por citometria de fluxo.
- Os monócitos e macrófagos serão co-cultivados com eritroblastos em diferentes estágios de diferenciação (obtidos a partir da cultura de células CD34+ em condições de diferenciação eritróide) e serão observadas: - Adesão dos monócitos aos eritroblastos por coloração com Giemsa; - Proliferação dos eritroblastos previamente marcados com CFSE; - Diferenciação eritróide pela expressão de CD71 e CD235a por citometria de fluxo. Alternativamente, a co-cultura poderá ser realizada com a linhagem celular eritróide K562.
- Os monócitos e macrófagos serão co-cultivados com eritrócitos maduros previamente marcados com PKH26 e a fagocitose será observada por citometria de fluxo ou Amnis. Critérios de inclusão e exclusão de pacientes: O estudo incluirá 15 pacientes que são atendidos no Hemocentro da UNICAMP rotineiramente, de ambos os sexos, com 18-50 anos de idade, com policitemia vera, b-talassemia ou com anemia falciforme homocigotos para HbS. Os pacientes serão abordados durante sua consulta já agendada e a coleta de sangue e dados clínicos será realizada durante a rotina do participante. O participante não será solicitado fora de sua rotina. Serão selecionados pacientes em fase estável da doença, sem crises de dor, sem infecção ou processos inflamatórios e sem transfusão sanguínea nos últimos três meses. O grupo controle será composto por 15 indivíduos sadios (HbA), com sexo e idade compatíveis a dos pacientes. Esses últimos poderão ser doadores de sangue que procurarem o hemocentro ou voluntários que aceitem conceder sangue destinado apenas à pesquisa.

Aspectos Éticos da Pesquisa:

O projeto apresentado visa à obtenção de dados através de uma pesquisa, cumprindo assim, os requisitos da resolução do Conselho Nacional de Saúde- 466/2012 e suas complementares. Todos os participantes deste estudo serão incluídos no estudo mediante termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) datado e assinado, apresentado pelo pesquisador responsável pelo estudo no momento em que comparecerem ao Ambulatório de Hematologia. Os participantes serão informados dos benefícios e riscos de sua participação. Serão informados de que a pesquisa pode gerar benefícios indiretos no futuro, pela obtenção de novos conhecimentos sobre a eritropoese. Todos serão submetidos à punção de veia periférica de um dos braços para coleta de amostra de sangue. Como inconvenientes, pode haver dor local no momento da punção e 11 complicações comuns de uma coleta de sangue de rotina, como equimose, hematoma ou processo infeccioso local, que serão tratados e acompanhados no Ambulatório de Hematologia. A privacidade dos participantes será garantida quanto ao seu anonimato. A identidade dos participantes não será

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.748.637

revelada em publicações de resultados desse estudo.

Metodologia de Análise de Dados: Os dados serão analisados por um estatístico terceirizado. Os dados dos prontuários dos pacientes serão utilizados na análise, mantendo-se o sigilo sobre a identidade do paciente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo O objetivo principal desse projeto é caracterizar o fenótipo de monócitos e macrófagos de pacientes com anemias hemolíticas hereditárias, como policitemia vera, b-talassemia e anemia falciforme, e comparar com o fenótipo dos macrófagos das ilhas eritroblásticas, investigando-se suas capacidades de promover a diferenciação eritróide e de fagocitose dos eritrócitos em cultura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Desconfortos e riscos:

Os riscos do procedimento são os mesmos que você tem com a coleta de amostras de sangue de rotina (dor no local da punção, "roxidão" no local da coleta, e infecção no local). Se isso ocorrer, você receberá toda a assistência médica para tratamento dessas complicações, sob a supervisão do pesquisador responsável pelo estudo.

Benefícios:

Não haverá nenhum benefício direto para o participante da pesquisa, mas o conhecimento que se espera conseguir deste estudo poderá ser útil no futuro para melhorar o acompanhamento e tratamento de pacientes com anemia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pós doutorado (pois este é o vínculo da pesquisadora).

Equipe de Pesquisa:

Marina Dorigatti Borges (doutorado).

Fernando Ferreira Costa.

Hipótese:

Nossa hipótese é de que a distribuição ou função dos monócitos e macrófagos de pacientes com anemia crônica possam estar alteradas, impedindo a eritropoese e, com isso, possam contribuir com o desenvolvimento ou persistência das complicações observadas na doença.

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro:

- pacientes com beta-talassemia 15 coleta de sangue

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.748.637

- pacientes com policitemia vera 15 coleta de sangue
- pacientes com anemia falciforme 15 coleta de sangue
- indivíduos controle 15 coleta de sangue

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- folhaderostro.pdf: devidamente apresentada. Consta como patrocinador a FAPESP e tamanho amostral de 60 participantes.
- Cronograma.pdf: desenvolvimento do projeto em 4 anos (sem datas).Com início em agosto de 2018.
- Declaracaodevinculo.pdf: processo de pesquisador está em tramitação na Faculdade vinculada ao Programa Pesquisador de Pós-Doutorado. (2017 - 2018).
- Orçamento: reagentes e materiais de consumo Custeio R\$ 60.000,00.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em consideração ao parecer anterior, pesquisador declara em carta resposta cartaresposta.pdf:

- "Declaração de vínculo: O vínculo institucional da pesquisadora principal é até 30/11/18, pois a bolsa de pós-doutorado da FAPESP está prevista para essa data. Como se trata de uma bolsa orçamentária de um projeto temático da FAPESP, é necessária a renovação da bolsa de 12 em 12 meses, o que já pretendemos fazer. Como o termo de outorga é válido por um ano, o vínculo institucional também é válido pelo mesmo período.". Ainda , a pesquisadora Marina Dorigatti Borges, entrou no programa de doutorado nesse mês e desenvolverá grande parte do trabalho, e como doutoranda, terá 4 anos para realização do trabalho.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

- coleta de dados 01/08/2018 02/08/2021. DECLARA COLETA DE DADOS APENAS APÓS APROVAÇÃO DO cep.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

- TCLE foi adequado.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

Conclusão: projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.748.637

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.
- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo. -Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.
- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1107067.pdf	18/06/2018 16:53:29		Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.748.637

Outros	cartaresposta.pdf	18/06/2018 16:53:08	RENATA SESTI COSTA	Aceito
Cronograma	cronograma2.pdf	18/06/2018 16:52:12	RENATA SESTI COSTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	18/06/2018 16:49:32	RENATA SESTI COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto2.pdf	18/06/2018 16:49:03	RENATA SESTI COSTA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostro.pdf	13/04/2018 14:25:51	RENATA SESTI COSTA	Aceito
Outros	Declaracaodevinculo.pdf	04/04/2018 14:34:41	RENATA SESTI COSTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 02 de Julho de 2018

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br