



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

FRANCIELE RODRIGUES MACEDO

**AUMENTO DA CELULARIDADE MIELOIDE E ADIPOSIDADE
MEDULAR EM RATOS OBESOS COM HIPERLEPTINEMIA**

Araçatuba

2022

FRANCIELE RODRIGUES MACEDO

**AUMENTO DA CELULARIDADE MIELOIDE E
ADIPOSIDADE MEDULAR EM RATOS OBESOS COM
HIPERLEPTINEMIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

Araçatuba

2022

M141a Macedo, Franciele Rodrigues
Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos
obesos com hiperleptinemia / Franciele Rodrigues Macedo. --
Araçatuba, 2022
51 f. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Paulo César Ciarlini

1. Hematopoiese. 2. Medula óssea. 3. Hemograma. 4. Obesidade. 5.
Leptina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos obesos com hiperleptinemia

AUTORA: FRANCIÉLE RODRIGUES MACEDO

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA (Participação Virtual)

Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO - Ourinhos

Araçatuba, 25 de maio de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos obesos com hiperleptinemia

AUTORA: FRANCIÉLE RODRIGUES MACEDO

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA (Participação Virtual)

Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO Ourinhos

Araçatuba, 25 de maio de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos obesos com hiperleptinemia

AUTORA: FRANCIÉLE RODRIGUES MACEDO

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Almeida
Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO - Ourinhos

Araçatuba, 25 de maio de 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdemar (em memória) e Celina, e aos meus irmãos Sueli, Luciana e Vinicius por todo amor, carinho, apoio e incentivo que recebi durante a elaboração deste trabalho. O laço mais lindo da vida é a união de uma família. Gratidão por tudo que fizeram por mim. Amo incondicionalmente vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo amor, suporte e incentivo para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Ciarlini, por toda dedicação, paciência e ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para realização do trabalho. Processo nº 2019/22881-5.

Aos Prof. Dr. Fabiano Antonio Cardioli, Prof^a. Dr^a. Suely Regina Mogami Bomfim, Prof^a. Dr^a. Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune e Prof. Dr. Breno Fernando Martins de Almeida pela presença na banca examinadora, ensinamentos e contribuições para este trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório Clínico Veterinário - FMVA/UNESP, pelos longos dias de trabalho, dedicação e amizade, em especial ao Murilo, que colaborou em diversas etapas deste trabalho.

Ao meu namorado Raphael por todo apoio e palavras de incentivo e ao meu cachorro Théo (em memória) por ter sido meu suporte emocional.

Aos meus amigos e todos que colaboraram direta e indiretamente para a conclusão de mais uma vitória.

A todos meu sincero e profundo obrigado!

**“A sabedoria não vem do acerto, mas sim do aprendizado
com os erros”**

Monja Coen

MACEDO, F. R. **Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos obesos com hiperleptinemia**. 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2022.

RESUMO

A obesidade e suas complicações estão cada vez mais frequente na população humana e animal. Complicações relacionadas à obesidade têm sido reproduzidas em roedores, porém não há concordância quanto às alterações hematológicas associadas ao aumento de leptina plasmática e de adipócitos na medula óssea (MO). O objetivo do presente trabalho foi investigar a hipótese de que em ratos obesos com hiperleptinemia ocorre o aumento da adiposidade da MO, altera a celularidade medular e sangue periférico. Um estudo experimental controlado e cego foi realizado com 30 ratos Wistar divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (C) e obeso (Ob). A obesidade foi induzida com dieta hipercalórica. Após 120 dias de tratamento, a concentração aumentada de leptina plasmática, índice de Lee e Índice de Massa Corporal (IMC) foram adotados como critérios para exclusão do grupo C (n= 15) e de inclusão no grupo Ob (n= 15). Em ratos obesos a porcentagem de gordura da MO foi significativamente maior ($p<0,05$). Este aumento da adiposidade medular teve correlação positiva com o aumento da relação M:E ($r=0,7794$, $p=0,0047$) e leptina plasmática ($r=0,7760$, $p=0,0083$). As alterações da MO associadas à obesidade e hiperleptinemia não promoveram alteração no perfil hematológico do sangue periférico. Concluiu-se que o acúmulo de gordura na MO de ratos Wistar obesos com hiperleptinemia aumenta a população de células mieloide sem comprometer outras linhagens e o perfil hematológico do sangue periférico.

Palavras-chave: Hematopoiese. Medula óssea. Hemograma. Obesidade. Leptina.

MACEDO, F. R. **Increased myeloid cellularity and medullary adiposity in obese rats with hyperleptinemia.** 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Obesity and its complications are increasingly frequent in human and animal populations. Obesity-related complications have been reproduced in rodents, but there is no agreement on the hematological changes associated with increased plasma leptin and adipocytes in bone marrow (BM). The objective was to investigate the hypothesis that in obese rats with hyperleptinemia, increased adiposity of BM alters bone marrow cellularity and peripheral blood. A controlled, blinded experimental study was performed with 30 Wistar rats randomly divided into two groups: control (C) and obese (Ob). Obesity was induced with a hypercaloric diet. After 120 days of treatment, increased plasma leptin concentration, Lee index and Body Mass Index (BMI) were adopted as criteria for exclusion from group C (n= 15) and for inclusion in group Ob (n= 15). In obese rats the fat percentage of the BM was significantly higher ($p<0.05$). This increased medullary adiposity had a positive correlation with increased M:E ratio ($r=0.7794$, $p=0.0047$) and plasma leptin ($r=0.7760$, $p=0.0083$). The changes in BM associated with obesity and hyperleptinemia did not promote changes in the hematological profile of peripheral blood. It was concluded that fat accumulation in the BM of obese Wistar rats with hyperleptinemia increases the myeloid cell population without compromising other lineages and the hematological profile of peripheral blood.

Keywords: Hematopoiesis. Bone marrow. CBC. Obesity. Leptin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Avaliação da porcentagem de gordura na medula óssea de ratos Wistar, correlação da leptina com a porcentagem de gordura da medula óssea de ratos Wistar obesos e correlação entre a relação mieloide-eritroide e a porcentagem de gordura da medula óssea de ratos Wistar obesos	30
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos estudos incluídos na revisão para investigar a relação entre hiperleptinemia, alterações da adiposidade medular e do hemograma na obesidade	16
Tabela 2 – Hemograma do grupo controle e de ratos Wistar obesos	33

LISTA DE ABREVIATURAS

MO	Medula óssea
Ob	Obeso
M:E	relação mieloide-eritroide
IMC	Índice de massa corporal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 Revisão de literatura	14
1.2 Resultados e Discussão	14
 2 CAPÍTULO 1 - AUMENTO DA CELULARIDADE MIELOIDE E ADIPOSIDADE MEDULAR EM RATOS OBESOS COM HIPERLEPTINEMIA	 19
2.1 Resumo	21
2.2 Abstract	22
2.3 Introdução	23
2.4 Material e Métodos	24
2.4.1 Delineamento	24
2.4.2 Mascaramento, critérios de inclusão e exclusão	25
2.4.3 Coleta das amostras	25
2.4.4 Avaliação da medula óssea	25
2.4.5 Hemograma	26
2.4.6 Análise imunoenzimática	27
2.4.7 Análise estatística	27
2.5 Resultados	27
2.5.1 Em ratos obesos com hiperleptemia o aumento da adiposidade medular não promove alteração hematológica quantitativa no sangue periférico	29
2.6 Discussão	29
2.7 Conclusão	31
2.8 Referências Bibliográficas	32
APÊNDICE A “Referências da Introdução Geral”	37
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	41
ANEXO B – Normas da revista para publicação do artigo	42

1 INTRODUÇÃO GERAL

A obesidade é uma doença inflamatória crônica que envolve fatores genéticos, hormonais, ambientais e alimentares, e promove uma série de complicações sistêmicas (LEE et al., 2013). Dados do National Health and Nutrition indicam que mais de 300 milhões de americanos são obesos (35,7% dos adultos), condição esta que predispõe à diabetes mellitus tipo 2, doença cardiovascular, mortalidade precoce, além de causar um aumento da adiposidade da medula óssea capaz de perturbar o microambiente hematopoiético, gerando potenciais danos ao sistema imunológico (ADLER et al., 2014).

A medula óssea (MO) em humanos é composta por um tecido mole que representa 5% da massa corporal total (HINDORF et al., 2010) e 70% de seu volume é constituído por adipócitos (CAWTHORN et al., 2014). Os adipócitos da MO produzem adipocinas, armazenam lipídios e respondem ao balanço energético por meio de alterações no volume de gordura (LECKA-CZERNIK, 2012). A MO vermelha é regenerativa (GREER, 2019), responsável pela produção e diferenciação de novas células sanguíneas (WEISSMAN, 2000). Estresse, lesão ou fármacos podem causar alterações na formação de nicho de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais (BENOVA; TENCEROVA, 2020), sendo estas últimas multipotentes e capazes de se diferenciar em células da linhagem mesodérmica, incluindo adipócitos (MATSUSHITA; DZAU, 2017).

As adipocinas regulam a hematopoiese, enquanto que em condições de obesidade, o número e o tamanho dos adipócitos aumentam, mudando o fenótipo de adipócitos híbrido marrom e branco (bege) para um perfil adiposo branco clássico que produz concentrações excessivas de adipocinas e um viés pró-inflamatório em que algumas populações de linhagem mieloide aumentam com a perda de linfopoiese (ADLER et al., 2014).

O número de pesquisas que visam conhecer as possíveis relações entre a obesidade com a hiperleptinemia e o aumento da adiposidade medular tem crescido nos últimos anos, principalmente no que se refere às alterações das células da MO (DA SILVA et al., 2016). A obesidade promove estresse oxidativo e inflamação na MO (GALLAGHER et al., 2014; HALADE et al., 2016) associada ao aumento da secreção de adipocinas, incluindo a leptina (MORRIS; EDWARDS, 2018). O aumento da concentração plasmática de leptina (hiperleptinemia) tem sido associada com acúmulo de gordura corporal (HOUSEKNECHT et al., 1996). A leptina é secretada pelos tecidos adiposos e

responsável pelo controle da homeostase energética e da gordura corporal (TRITOS; MANTZOROS, 1997). Estudo sobre a regulação da inflamação sistêmica associada à obesidade defende a hipótese de que a leptina é uma citocina pró-inflamatória (DIB et al.; 2014).

A obesidade é caracterizada por inflamação de baixo grau, que altera a MO e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em favor de progenitores mieloides e aumento da adiposidade da MO, entretanto são limitadas as informações sobre fatores secretores inflamatórios que criam o microambiente da MO e como esses fatores mudam durante as complicações metabólicas (BENOVA; TENCEROVA, 2020).

Embora seja bem aceito que a obesidade afeta a imunidade, seus efeitos sobre a hematopoiese necessitam melhor elucidação, sendo que algumas alterações hematológicas conflitantes. Resumidamente, estudos transversais similares comprovaram que homens e mulheres com índice de massa corporal (IMC) ≥ 27 kg/m² apresentaram hiperleptinemia (WILSON et al., 1997, LAHARRAGUE et al., 2000), leucocitose (WILSON et al., 1997; HERISHANU et al., 2006, VUONG et al., 2014), aumento da linhagem mielóide (LAHARRAGUE et al., 2000), além de neutrofilia (HERISHANU et al., 2006, VUONG et al., 2014) e linfopenia (VUONG et al., 2014). Tais divergências de achados hematológicos se devem provavelmente a fatores não passíveis de serem controlados na população humana obesa, incluindo complicações associadas com o grau e tempo de obesidade, diferenças quanto à dieta, atividade física, sedentarismo etc.

Neste sentido, modelos experimentais objetivando maior controle foram desenvolvidos em roedores para investigar os efeitos da obesidade. A administração de dieta de cafeteria é um modelo experimental consolidado que reproduz a ingestão alimentar de sociedades modernas, capaz de induzir obesidade, intolerância à glicose e inflamação em ratos (FEIJÓ et al., 2019). Nesta revisão buscamos selecionar as melhores evidências científicas para confirmar se na obesidade induzida experimentalmente em roedores também ocorre hiperleptinemia, alteração do sangue periférico associada ao aumento da adiposidade e celularidade da MO.

1.1 Revisão de literatura

Foi realizada uma revisão de literatura, nas bases de dados: PubMed Central (PMC), Scopus e Web of Science, utilizando os seguintes descritores: *Obesity, bone marrow, adiposity, hyperleptinemia, hematopoiesis e complete blood count*.

O critério utilizado para inclusão das publicações foi conter descritores no título, nas palavras-chaves ou ter explícito no resumo que o estudo se relaciona com a obesidade em roedores, hiperleptinemia, alterações do sangue periférico, da celularidade e adiposidade medular. Não houve limitação quanto ao idioma. Com base na análise dos títulos e resumos das publicações foram selecionadas 141 produções, sendo que 12 atenderam aos objetivos.

1.2 Resultados e discussão

A maioria das investigações sobre obesidade em roedores foram estudos experimentais controlados em camundongos. Apenas dois estudos foram realizados em ratos, sendo um randomizado (Tabela 1). Em todos os estudos a obesidade foi induzida com sucesso com dieta rica em gordura. O aumento de adipócitos na MO descrito em humanos obesos foi adequadamente reproduzido em camundongos com obesidade induzida com dieta rica em gordura (ADLER et al., 2014, STYNER et al., 2014; LUO et al., 2016, BORNSTEIN et al., 2017), porém não em ratos (Tabela 1). Três dos quatro estudos que aumentam a adiposidade da MO, indicam que seis semanas de consumo de dieta rica em gordura são suficientes para aumentar a adiposidade medular em camundongos (Tabela 1).

Em humanos obesos tem sido relatada leucocitose por estímulo mieloide e aumento da linfopoiese associada com aumento de leptina (VUONG et al., 2014). Os estudos que confirmam aumento da adiposidade medular não mensuraram os níveis de leptina plasmática dos camundongos obesos (Tabela 1), dois igualmente descrevem aumento da mielopoiese, porém ambos relatam diminuição da linfopoiese (ADLER et al., 2014; LUO et al., 2016). Dentre os três estudos que quantificaram aumento de leptina plasmática em camundongos obesos, apenas um observou aumento mieloide e dois aumento da linfopoiese (Tabela 1), demonstrando significativa diferenças entre os estudos de camundongos obesos com e sem confirmação de hiperleptinemia. Um estudo realizado com camundongos obesos após aplicação da leptina, promoveu aumento da mielopoiese

e linfopoiese, enquanto que camundongos com deficiência de leptina ocorre diminuição da linfopoiese (CLAYCOMBE et al., 2018). Outras divergências em camundongos obesos são descritas na literatura (Tabela 1), como aumento (CALIXTO et al., 2010) ou diminuição (BOLUS et al., 2018) de eosinófilos, além de aumento da eritropoiese (BENNETT et al., 1996) e trombocitose (VERA et al., 2013).

Estudos similares em ratos são raros. Em ratos Wistar, a obesidade induzida com dieta rica em gordura, diferentemente de outras espécies, promoveu aumento da leptina plasmática, leucocitose por neutrofilia devido ao aumento da linhagem mieloide, sem afetar a linfopoiese (DO CARMO et al., 2013).

Tabela 1. Características dos estudos sobre a relação entre hiperleptinemia, alterações do hemograma, adiposidade e celularidade medular de roedores obesos

(Continua)

Autor	Tipo de Estudo	Espécie/tamanho amostral	Dieta de base ou condição inicial	Intervenção ou fator de exposição	Resultados
Bennett et al.; (1996)	Ensaio clínico	Camundongos db/db machos adultos / 15	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	-	↑ Leptina ↑ Mielopoiese ↑ Linfopoiese ↑ Eritropoiese
Calixto et al.; (2010)	Ensaio clínico randomizado	Camundongos machos adultos / 12	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 10 semanas	↑ Leptina ↑ Eosinófilos da MO
Trottier et al.; (2012)	Ensaio clínico	Camundongos machos adultos / 16	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 25 semanas	↑ Leptina ↑ Linfopoiese
do Carmo et al.; (2013)	Ensaio clínico randomizado	Ratos Wistar / 18	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 12 semanas	↑ Leptina ↑ Leucócitos ↑ Neutrófilos ↑ Mielócitos
Vera et al.; (2013)	Ensaio clínico	Ratos Zucker / 10	Ração LabDiet® 5008 e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 12 semanas	↑ Plaquetas
Adler et al.; (2014)	Ensaio clínico	Camundongos machos adultos / 10	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 6 semanas	↑ Adiposidade da MO ↑ Mielopoiese ↓ Linfopoiese
Singer et al.; (2014)	Ensaio clínico	Camundongos machos adultos / 36	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 16 semanas	↑ Mielopoiese

Tabela 1. Características dos estudos sobre a relação entre hiperleptinemia, alterações do hemograma, adiposidade e celularidade medular de roedores obesos

(conclusão)

Autor	Tipo de Estudo	Espécie/tamanho amostral	Dieta de base ou condição inicial	Intervenção ou fator de exposição	Resultados
Styner et al.; (2014)	Ensaio clínico randomizado	Camundongos machos adultos / 20	Dieta rica em gordura	Exercícios / 6 semanas	↑ Adiposidade da MO
Luo et al.; (2015)	Ensaio clínico	Camundongos machos adultos /10	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 6 semanas	↑ Adiposidade da MO ↑ Mielopoiese ↓ Linfopoiese
Bornstein et al.; (2017)	Ensaio clínico randomizado	Camundongos machos adultos / 40	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 15 semanas	↑ Adiposidade da MO
Claycombe et al.; (2018)	Ensaio clínico	Camundongos machos adultos /32	Dieta rica em gordura	Injeção de Leptina/ 1 semana	Obesos com Def. de Leptina ↑ Eritroblasto ↑ Monócitos ↓ Linfopoiese Obesos c/ injeção Leptina ↑ Linfopoiese ↑ Mielopoiese
Bolus et al.; (2018)	Ensaio clínico	Camundongos machos adultos / 54	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em gordura / 12 semanas	↓ Eosinófilos

Não está claro se a leptina está direta ou indiretamente envolvida na mielopoiese ou linfopoiese, sendo necessários mais estudos para definir o efeito da obesidade na hematopoiese, em especial em ratos. Embora a obesidade induzida por dieta de cafeteria e dieta rica em gordura sejam bem aceitas para avaliar a obesidade em roedores (SAMPEY et al., 2011), os resultados hematológicos ainda são divergentes e não bem estabelecidos, em especial quanto a dieta hipercalórica a base de refrigerante de cola, um importante constituinte da dieta de cafeteria.

Com base nesses dados, realizamos um estudo experimental randomizado cego a fim de investigar a hipótese de que em ratos obesos com hiperleptinemia o aumento da adiposidade da MO altera a celularidade medular e do sangue periférico.

2 CAPÍTULO 1 AUMENTO DA CELULARIDADE MIELOIDE E ADIPOSIDADE MEDULAR EM RATOS OBESOS COM HIPERLEPTINEMIA

INCREASED MYELOID CELLULARITY AND MEDULLARY ADIPOSITY IN OBESE RATS WITH HYPERLEPTINEMIA

Franciele Rodrigues Macedo^{1a}, Murilo Catelani Ferraz^{1a}, Ariana Aparecida Ferreira Pereira^{1a}, Amanda Regina Pinatti Menezes^{1a}, Suely Regina Mogami Bomfim^{2b}, Paulo César Ciarlini^{2b}

^{1a}Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brasil.

^{2b}Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brasil.

*Autor para correspondência: Franciele Rodrigues Macedo, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, Rua Clóvis Pestana, 793, Dona Amélia, CEP 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil; E-mail: franrmacedo@outlook.com; Telefone: +55 18 99137-7232.

Disponibilidade de dados

Os dados serão disponibilizados no repositório científico da Universidade Estadual Paulista (<https://repositorio.unesp.br>).

Fonte de Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2019/22881-5).

Conflitos de interesse

Todos os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Declaração de aprovação de ética

Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (FOA 00545-2017).

Contagem total das palavras do texto, excluindo resumo, referências bibliográficas, tabelas e legendas das figuras: 2.325

Contagem total das palavras do resumo: 227

Número de tabelas: 01

Número de figuras: 01

2.1 Resumo

A obesidade e suas complicações estão cada vez mais frequente na população humana e animal. Complicações relacionadas à obesidade têm sido reproduzidas em roedores, porém não há concordância quanto às alterações hematológicas associadas ao aumento de leptina plasmática e de adipócitos na medula óssea (MO). O objetivo do presente trabalho foi investigar a hipótese de que em ratos obesos com hiperleptinemia ocorre o aumento da adiposidade da MO, altera a celularidade medular e sangue periférico. Um estudo experimental controlado e cego foi realizado com 30 ratos Wistar divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (C) e obeso (Ob). A obesidade foi induzida com dieta hipercalórica. Após 120 dias de tratamento, a concentração aumentada de leptina plasmática, índice de Lee e Índice de Massa Corporal (IMC) foram adotados como critérios para exclusão do grupo C (n= 15) e de inclusão no grupo Ob (n= 15). Em ratos obesos a porcentagem de gordura da MO foi significativamente maior ($p<0,05$). Este aumento da adiposidade medular teve correlação positiva com o aumento da relação M:E ($r=0,7794$, $p=0,0047$) e leptina plasmática ($r=0,7760$, $p=0,0083$). As alterações da MO associadas à obesidade e hiperleptinemia não promoveram alteração no perfil hematológico do sangue periférico. Concluiu-se que o acúmulo de gordura na MO de ratos Wistar obesos com hiperleptinemia aumenta a população de células mieloide sem comprometer outras linhagens e o perfil hematológico do sangue periférico.

Palavras-chave: Hematopoiese. Medula óssea. Hemograma. Obesidade. Leptina.

2.2 Abstract

Obesity and its complications are increasingly frequent in human and animal populations. Obesity-related complications have been reproduced in rodents, but there is no agreement on the hematological changes associated with increased plasma leptin and adipocytes in bone marrow (BM). The objective was to investigate the hypothesis that in obese rats with hyperleptinemia, increased adiposity of BM alters bone marrow cellularity and peripheral blood. A controlled, blinded experimental study was performed with 30 Wistar rats randomly divided into two groups: control (C) and obese (Ob). Obesity was induced with a hypercaloric diet. After 120 days of treatment, increased plasma leptin concentration, Lee index and Body Mass Index (BMI) were adopted as criteria for exclusion from group C (n= 15) and for inclusion in group Ob (n= 15). In obese rats the fat percentage of the BM was significantly higher ($p<0.05$). This increased medullary adiposity had a positive correlation with increased M:E ratio ($r=0.7794$, $p=0.0047$) and plasma leptin ($r=0.7760$, $p=0.0083$). The changes in BM associated with obesity and hyperleptinemia did not promote changes in the hematological profile of peripheral blood. It was concluded that fat accumulation in the BM of obese Wistar rats with hyperleptinemia increases the myeloid cell population without compromising other lineages and the hematological profile of peripheral blood.

Keywords: Hematopoiesis. Bone marrow. CBC. Obesity. Leptin.

2.3 Introdução

A obesidade é uma doença inflamatória crônica de baixo grau (1) e constitui um importante problema de saúde e fator de risco para diversas enfermidades (2). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2021), a prevalência da obesidade global quase triplicou entre 1975 e 2016 (3).

Na obesidade humana o aumento da adiposidade da MO interfere no sistema imunológico e no microambiente hematopoiético, alterando os precursores mielóides e desregulando a população de linfócitos B (4, 5). A obesidade promove inflamação, aumento da secreção da adipocina e do estresse oxidativo em tecidos periféricos (6).

A MO é composta por células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais em diversos estágios de maturação e diferenciação (7). Na obesidade o aumento no tamanho e no número dos adipócitos pode lesionar a MO (8). Este tecido é dividido em medula vermelha hematopoieticamente ativa e a medula amarela, preenchida por tecido adiposo (7). Os adipócitos possuem um papel importante na secreção de adipocinas como a leptina que regula a captação de calorias e a sensibilidade à insulina (9).

Na obesidade mórbida humana ocorre leucocitose (10), aumento e ativação dos neutrófilos (11) e os eosinófilos apresentam atividade anti-inflamatória prejudicada em condições de ganho de peso elevado (12,13). Ratos Zucker obesos apresentaram aumento na contagem de plaquetas (14).

A obesidade em ratos induzida com dieta de cafeteria tem sido considerada um modelo experimental adequado para reproduzir as alterações metabólicas do acúmulo de gordura descritas em humanos (15). É sabido que o consumo de açúcar e refrigerantes aumentam a ocorrência de doenças crônicas como obesidade, diabetes, câncer, artrite, dislipidemia e aterosclerose (17). Embora seja um importante componente na dieta de cafeteria (16), poucos estudos investigaram a obesidade induzida pelo consumo de refrigerante de cola.

Camundongos alimentados com dieta rica em gordura, apresentaram aumento de leptina (18). O consumo de alimentos ricos em gordura tem sido relacionado à resistência à leptina (19, 20). A leptina é secretada principalmente pelo tecido adiposo estando envolvida na regulação da gordura corporal (21) possuindo um papel importante na

preservação da linfopoiese e mielopoiese (22), podendo também comprometer a eritropoiese, atuando nas células progenitoras e células-troncos hematopoiéticas (23).

O aumento de adipócitos na MO tem sido adequadamente reproduzido em camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura (4, 5), porém não em ratos com obesidade induzida com refrigerante de cola.

Em humanos, a contagem de leucócitos foi positivamente correlacionada com a leptina e porcentagem de gordura corporal (24). Achado similar tem sido descrito em camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura, que observou um aumento da linfopoiese e mielopoiese (25). Uma diminuição da linfopoiese B na MO é descrita em camundongos com obesidade induzida por dieta igualmente rica em gordura (4). Em ratos Wistar submetidos à uma dieta rica em gordura por 12 semanas foi observado neutrofilia e hiperleptinemia (2).

Considerando que o consumo de refrigerante e sedentarismo são fatores predisponentes para o desenvolvimento da obesidade (26), nós delineamos um experimento randomizado às cegas e com mascaramento em ratos Wistar obesos para testar nossa hipótese de que em ratos Wistar obesos com hiperleptinemia o aumento da adiposidade da MO altera a celularidade medular e sangue periférico.

2.4 Material e métodos

Foi realizado um estudo experimental controlado, randomizado e cego aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (FOA 00545-2017).

2.4.1 Delineamento

Trinta ratos Wistar machos de quatro meses, homogêneos quanto ao peso inicial, foram mantidos em gabinete com ambiente controlado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa entre $55 \pm 10\%$, ciclo claro-escuro de 12h/12h e em número de três por gaiola. A dieta de base, administrada por todo o período do experimento, foi composta por água mineral e ração comercial (Presence® - Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil) *ad libitum*.

Com auxílio de um programa computacional (27) foi calculado o tamanho amostral e os 30 ratos foram divididos em dois grupos: controle (C) tratados com a dieta de base; e obeso (Ob) tratados com dieta de base por 120 dias. Os lotes e procedência dos alimentos administrados no estudo foram os mesmo durante todo o período de experimentação. Para o cálculo do tamanho amostral foi considerando um poder de teste

de $> 0,80$, valores médios e desvios-padrão obtidos em estudos de literatura (28) que empregaram a mesma espécie e metodologia analítica deste trabalho.

2.4.2 Mascaramento, critérios de inclusão e exclusão

Todos os ratos foram identificados de maneira que só o coordenador da pesquisa pudesse diferenciá-los, garantido que toda a colheita e análise laboratorial das amostras fossem realizadas às cegas.

Ao final do experimento quatro ratos que consumiram refrigerante de cola foram excluídos por não atender os critérios de obesidade definidos por $IMC > 0,73 \text{ g/m}^2$ (29); de $Lee > 300$ (30) e de hiperleptinemia $> 16 \text{ ng/dL}$ (31). Utilizando os mesmos critérios, todos os ratos do grupo controle foram considerados não obesos, sendo um excluído devido a amostra de medula obtida ser imprópria (excesso de anticoagulante).

2.4.3 Coleta das amostras

Os ratos em jejum alimentar (12 horas) foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg). Foi realizada punção cardíaca e o sangue obtido (8 mL) foi transferido para tubos heparinizados e centrifugado a $1000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . O plasma foi removido por aspiração e em seguida congelado (-80°C) até o momento das análises laboratoriais. Para coleta do sangue para o hemograma, parte do sangue obtido (1 mL) foi transferido para tubos contendo EDTA disódico. Para coleta da MO os ratos foram colocados em decúbito lateral esquerdo e submetidos a coleta de MO por punção da crista ilíaca. O material medular foi imediatamente espalhado em lâminas de vidro a partir da técnica de *Squash* e corado com Leishmann[®] (Laborclin, Brasil) para posterior análise morfológica.

2.4.4 Avaliação da medula óssea

A relação M:E foi mensurada por microscopia óptica a partir da diferenciação morfológica de um total de 500 células (32).

Para maior exatidão da estimativa da porcentagem de gordura medular, foi utilizado o programa computacional Opticam High Definition (OPTHD, versão 3.7). A metodologia consistiu na utilização das ferramentas de segmentação e contagem do software. A função “Color Cube” preenche a dimensão de todas as estruturas de mesma cor em imagens de microscopia capturadas pelo programa. O campo “R.G.B” foi utilizado para aumentar a tolerância de pixels de 10 (valor inicial) para 30, diminuindo a

probabilidade de que estruturas semelhantes com variações discretas de coloração não fossem interpretadas em conjunto. Este cuidado contribuiu para que os erros de demarcações fossem minimizados. A ferramenta “Count Results” foi então empregada para calcular a área total preenchida (A) em μm .

Inicialmente, a área total média do campo microscópico (AC) foi mensurada pela fórmula $AC = \frac{SA}{n}$, onde SA é a soma de n determinações de A, realizadas em campos limpos diferentes e no aumento de 100x, e n é o número de campos avaliados (n=5). O valor de AC, dado em μm , corresponde a 100% do espaço que pode ser ocupado por gordura.

Posteriormente, foram capturadas cinco imagens por rato de campos distintos de lâminas de medula óssea coradas com Leishmann® (Laborclin, Brasil). Para tal, foi utilizado o aumento de 100x, sendo priorizadas as regiões próximas de espículas medulares. Após a demarcação dos locais de coloração mais clara, interpretados como tecido adiposo, a área total média ocupada por gordura na medula óssea (AG) foi calculada a partir da fórmula $AG = \frac{SAG}{n}$, onde SAG é a soma da área total de gordura mensurada em todos os campos analisados e n é o número de determinações (n=5). Por fim, a porcentagem de gordura na medula óssea (PG) foi obtida em cada rato pela fórmula $PG = \frac{AG \times 100}{AC}$.

2.4.5 Hemograma

A contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), contagem do número total de leucócitos, de plaquetas e volume plaquetário médio (VPM) foram obtidas com auxílio de contador eletrônico de células sanguíneas (BC-2800 Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Nanshan, China). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em distensões sanguíneas tingidas com corante hematológico comercial Panótico Rápido® (Laborclin, Brasil) segundo as recomendações e critérios de Jain (33).

2.4.6 Análise imunoenzimática

A concentração plasmática de leptina foi processada em duplicata a partir da metodologia previamente estabelecida (34) (Leptina–ELISA, Millipore, Missouri, USA) e com auxílio de uma leitora automática de microplacas de 96 poços e absorbância 540 nm (Readwell Touch, Robonik PVT LTD, Thane, Índia), conforme orientação do fabricante.

2.4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do programa GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software, Inc). Os dados foram avaliados quanto à normalidade da distribuição (Teste Kolmogorov-Smirnov). Para detectar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos foi aplicado o teste t não pareado. Para estimar a correlação entre as variáveis foi calculado o coeficiente de Pearson. Para determinar as associações entre o aumento da porcentagem de gordura na MO, hiperleptinemia, a relação M:E e nos parâmetros hematológicos foram determinadas pelo teste de Fisher, sendo empregados valores de referência (35). O cálculo de Odds (IC 95%) foi realizado para estimar a chance de ocorrência das alterações observadas.

2.5 Resultados

Doze semanas de dieta rica em açúcares foi suficiente para aumentar a quantidade de gordura na medula óssea e hiperleptinemia na maioria dos ratos (Figura 1).

A adiposidade da MO em ratos obesos com hiperleptinemia foi significativamente ($p = 0,0083$) maior (Figura 1).

O aumento da adiposidade medular apresentou correlação positiva ($r = 0,7760$ $p = 0,0083$) com a leptina plasmática (Figura 1). Estimamos, com base no cálculo de Odds (17,00) que ratos obesos com hiperleptinemia possuem aproximadamente 17 vezes mais chances de aumentar a adiposidade medular.

Observamos também que a porcentagem de gordura da MO em ratos obesos com hiperleptinemia tem uma correlação positiva ($r = 0,7794$ $p = 0,0047$) com o aumento da relação M:E (Figura 1). Com base no cálculo de Odds (1,400) a chance de ocorrer alteração da relação M:E aumenta em ratos com maior adiposidade medular.

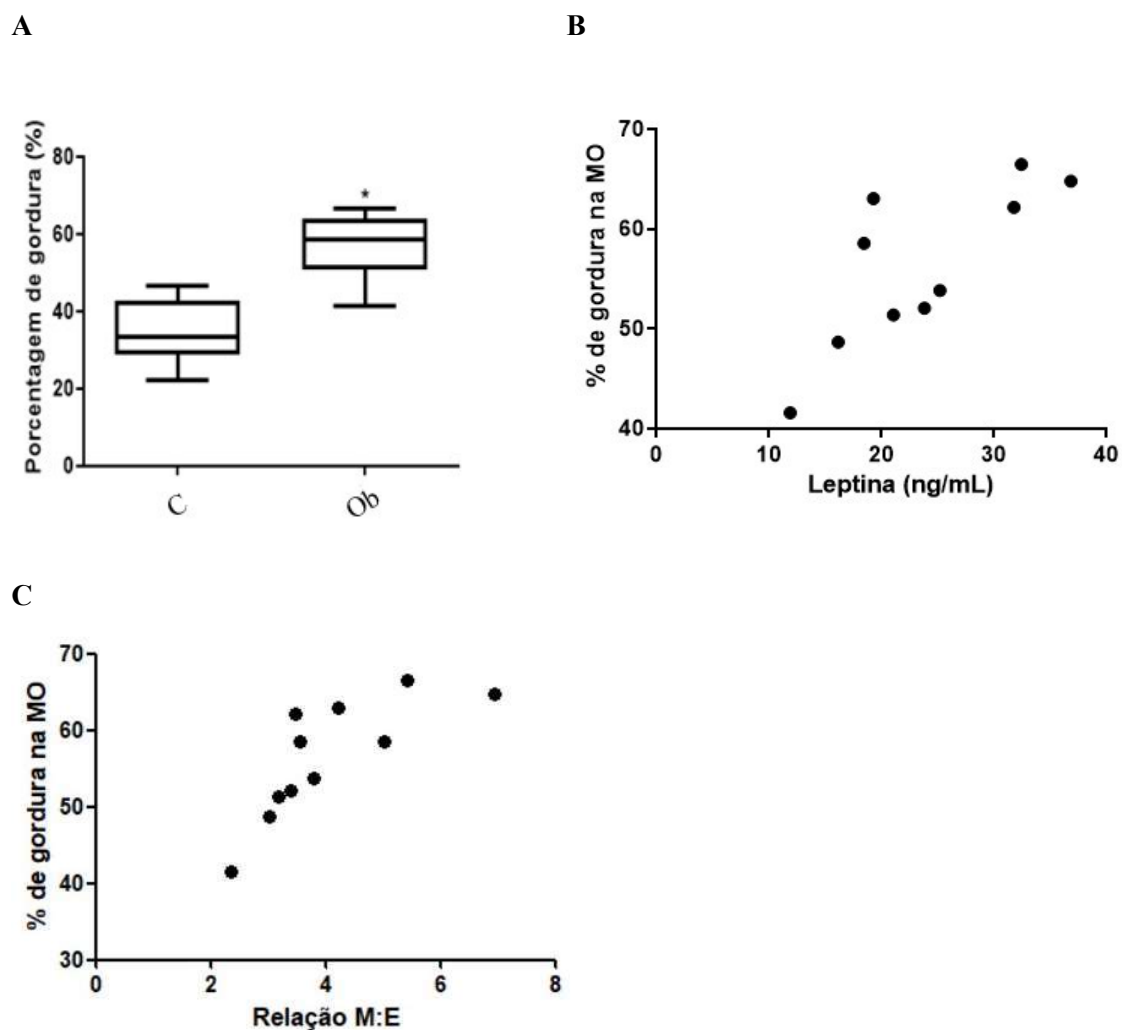


Figura 1 – (A) Avaliação da porcentagem de gordura na medula óssea de ratos Wistar do grupo controle (C) e obeso (Ob). Plot box & Wisker com respectivos quartis (Q1, Q2 e Q3, valores máximos e mínimos). A linha central representa a média. * representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$; teste t não pareado) em relação ao grupo C e Ob. (B) Correlação da leptina com a porcentagem de gordura da medula óssea de ratos Wistar obesos ($r = 0,7760$ $p = 0,0083$). (C) Correlação entre a relação mieloide-eritroide e a porcentagem de gordura da medula óssea de ratos Wistar obesos ($r = 0,7794$ $p = 0,0047$).

2.5.1 Em ratos obesos com hiperleptinemia o aumento da adiposidade medular não promove alteração hematológica quantitativa no sangue periférico.

Os parâmetros do hemograma dos grupos C e Ob não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Tabela 2), entretanto uma correlação positiva ($r = 0,6419$ $p = 0,0332$) entre a contagem absoluta de linfócitos e a porcentagem de gordura da MO foi observada.

Tabela 2 – Hemograma (média±desvio padrão) do grupo C e de ratos Wistar obesos.

<i>Parâmetros</i>	Controle	Obesos	p-valor*
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,01±0,63	8,25±0,67	0,3961
Hemoglobina (g/dL)	13,83±0,73	14,16±0,53	0,2844
Hematócrito (%)	43,47±4,01	45,65±3,01	0,0845
VCM (fL)	54,43±4,19	56,21±5,47	0,2500
CHCM (g/dL)	31,89±1,81	31,05±1,30	0,1626
HCM (pg)	17,26±0,92	17,36±1,20	0,8478
RDW (%)	12,76±1,15	13,07±1,05	0,1543
Leucócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	5275±1937	4400±1886	0,4114
Bastonetes ($\times 10^9/\text{L}$)	12,10±28,57	16,55±30,00	0,7206
Segmentados ($\times 10^9/\text{L}$)	1472±491	1379±759	0,5545
Linfócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	3418±1479	2763±1141	0,5114
Monócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	102±98,4	72±70,8	0,3552
Eosinófilos ($\times 10^9/\text{L}$)	269±240	168±131	0,3246
Plaquetas ($\times 10^3/\text{L}$)	897±180	813±200	0,3062
VPM (fL)	5,39±0,22	5,63±0,42	0,1349

2.6 Discussão

Apesar de ser aceito que o consumo de açúcar e refrigerantes aumentam a ocorrência de doenças crônicas como obesidade (17), a maioria das evidências de alterações hematológicas associadas ao acúmulo de gordura corporal em humanos foram obtidas de estudos observacionais (36) com limitações quanto a falta de controle de diversos fatores que podem influenciar a resposta hematopoiética (padrão de alimentação, medicações, doenças concomitantes, idade etc) da população obesa. A maioria dos estudos controlados foram realizados em camundongos com obesidade induzida com dieta rica em gordura (4, 37, 38, 39), e observaram aumento da adiposidade medular (4, 37, 38, 39), alteração esta que não foi relatada em ratos (2).

Diante de tais divergências, comparamos a adiposidade e celularidade da MO de ratos obesos com hiperleptinemia à um grupo controle. Nossos resultados são uma forte

evidência de que o aumento da adipocidade medular já descrita em camundongos com obesidade induzida com dieta rica em gordura (4, 37, 38, 39) também ocorre em ratos com obesidade induzida pelo consumo de bebidas açucaradas como refrigerante de cola. Este resultado é uma forte evidência de que o aumento da adiposidade medular independe da composição da dieta ser rica em lipídeos ou açúcares.

Também observamos que em ratos obesos, o aumento da adiposidade medular está diretamente correlacionado com a concentração plasmática de leptina, fortalecendo evidência anterior de que esta adipocina secretada por adipócitos está envolvida na regulação da gordura corporal (21).

De acordo com a taxa Odds, estimamos que em ratos obesos o acúmulo de gordura medular aumenta o risco de alterar a relação M:E. Comprovamos que o aumento da adiposidade medular tem correlação direta com os níveis plasmático de leptina e com o aumento da relação M:E. Nosso modelo experimental, evidenciou que ratos obesos com hiperleptinemia possuem aproximadamente 17 vezes mais chances de aumentar a adiposidade medular, portanto, potencialmente mais susceptíveis as discrasias hematológicas e suas complicações.

Há evidências em humanos (40) e camundongos (22, 25) de que a leptina exerce também um papel importante na mielopoiese, linfopoiese e eritropoiese (23). Entretanto não há concordância sobre o efeito da obesidade e hiperleptinemia sobre tais alterações hematológicas, sejam da mesma espécie ou espécies diferentes. Por exemplo, em ratos Wistar obesos submetidos à uma dieta rica em lipídeos foi relatada neutrofilia e hiperleptinemia, porém não houve aumento da linfopoiese (2) descrita em camundongos (22, 25).

Ao contrário de estudos em humanos (36) e camundongos (22; 25), em ratos com obesidade induzida com refrigerante de cola, o acúmulo de gordura e aumento da relação M:E na MO, não alterou significativamente o perfil eritrocitário, leucocitário e plaquetário do sangue periférico. Acredita-se que a leptina desempenha um importante papel na linfopoiese e manutenção do componente linfopoiético do sangue periférico (22, 25), o que pode justificar a correlação positiva que observamos entre a contagem absoluta de linfócitos e adiposidade medular de nossos ratos obesos com hiperleptinemia.

A leptina possui efeito mais marcante nas células progenitoras, contribuindo para rápida ativação das linhagens mieloides e linfoides, porém não da eritroide (22). Nós observamos que concomitante ao acúmulo de gordura na MO e o aumento da população

mieloide altera a relação M:E sem comprometer a série eritroide e nem promover a neutrofilia descrita em ratos com obesidade induzida com dieta rica em lipídeos (2). Considerando que ambos estudos, foram realizados em ratos Wistar machos, com idades similares, é possível que tal divergência quanto a não ocorrência de neutrofilia resulte de uma possível diferença entre a dieta açucarada e com alto teor de lipídeos. Colaborando com esta hipótese, a hiperlipidemia pós-prandial pode produzir um estado pró-inflamatório que desencadeia estresse oxidativo sistêmico em humanos (41) e cães (42).

2.7 Conclusão

O acúmulo de gordura corporal e hiperleptinemia induzida pelo o consumo de bebida açucarada a base cola causa aumento da adiposidade medular e da linhagem mieloide sem comprometer a celularidade do sangue periférico.

2.8 Referências bibliográficas

1. Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, Inflammation and Diet. *PGHN*. 2013;16(3):143-152.
2. do Carmo LS, Rogero MM, Paredes-Gamero EJ, Nogueira-Pedro A, Xavier JG, Cortez M, Borges MC, Fujii TM, Borelli P, Fock RA. A high-fat diet increases interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor production by bone marrow cells and triggers bone marrow hyperplasia and neutrophilia in wistar rats. *Exp Biol Med*. 2013;238(4):375–384.
3. World Health Organization. Obesity and overweight. World Health Organization; (2021, 09 June).
4. Adler BJ, Green DE, Pagnotti GM, Chan ME, Rubin CT. High fat diet rapidly suppresses B lymphopoiesis by disrupting the supportive capacity of the bone marrow niche. *PloS One*. 2014;9:e90639.
5. Singer K, DelProposto J, Morris DL, et al. Diet-induced obesity promotes myelopoiesis in hematopoietic stem cells. *Mol Metab*. 2014;3(6):664–675.
6. Morris VM, Edwards MC. Adipokines, adiposity and bone marrow adipocytes: dangerous accomplices in multiple myeloma. *J Cell Pgysiol*. 2018;233:9159–9166.
7. Boroumand P, Klip A. Bone marrow adipose cells – cellular interactions and changes with obesity. *J Cell Sci*. 2020;133(5), jcs238394.
8. Adler BJ, Kaushansky K, Rubin CT. Obesity-driven disruption of haematopoiesis and bone marrow niche. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(12):737–748.
9. Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM. Marrow fat and the bone microenvironment: Developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19(2):109-124.

10. Herishanu Y, Rogowski O, Polliack A, Marilus R. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. *Eur J Haematol.* 2006;76(6):516–520.
11. Brotfain E, Hadad N, Shapira Y, Avinoah E, Zlotnik A, Raichel L, et al. Neutrophil functions in morbidly obese subjects. *Clin Exp Immunol.* 2015;181(1):156–163.
12. Bolus WR, Peterson KR, Hubler MJ, Kennedy AJ, Gruen ML, Hasty AH. Elevating adipose eosinophils in obese mice to physiologically normal levels does not rescue metabolic impairments. *Mol Metab.* 2018;8:86–95
13. Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol.* 2010;159(3):617–625.
14. Vera, RH, Vilahur, G, Badimon L. Obesity with insulin resistance increase thrombosis in wild-type and bone marrow-transplanted Zucker fatty rats. *Thromb Haemost.* 2013;109(02):319–327.
15. Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FRF, Almeida FQA, Galhardi CM, Filho JLVBN, et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int J Cardiol.* 2008;124(1):92–99.
16. Düsman E, Berti AP, Soares LC, Vicentini VEP. Cytotoxicity and mutagenicity of cola and grape flavored soft drinks in bone marrow cells of rodents. *Food Sci Technol Res.* 2013;33(1):122–126.
17. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity.* 2011;19(6):1109–1117.

18. Da Silva SV, Renovato-Martins M, Ribeiro-Pereira C, Citelli M, Barja-Fidalgo C. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. *Obesity*. 2016;24(12):2522–2532.
19. Munzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metab Clin Exp*. 2015;64(1):13–23.
20. Athesh K, Jothi G. Pharmacological screening of anti-obesity potential of *acorus calamus* linn. In high fat cafeteria diet fed obese rats. *Asian J of Pharm Clin Res*. 2017;10(4):384–390.
21. Tritos NA, Mantzoros CS. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia*. 1997;40(12):1371–1379.
22. Claycombe K, King LE, Fraker PJ. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. *PNAS*. 2008;105(6):2017–2021.
23. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol*. 1996;6(9):1170–1180.
24. Wilson CA, Bekele G, Nicolson M, Ravussin E, Pratley RE. Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. *Br J Haematol*. 1997;99(2):447–451.
25. Trottier MD, Naaz A, Li Y, Fraker PJ. Enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis in diet-induced obese mice. *PNAS*. 2012;109(20):7622–7629.
26. Suglia FS, Duarte CS, Chambers EC, Boynton-Jarrett R. Social and behavioral risk factors for obesity in early childhood. *J Dev Behav Pediatr*. 2013;34(8):549–556.
27. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. *OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*. 2006;3.1.
28. Wang C, Ha X, Li W, Xu P, Gu Y, Wang T, et al. Correlation of TLR4 and KLF7 in inflammation induced by obesity. *Inflammation*. 2016;40(1):42–51.

29. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AAH, Cicogna AC, Filho N. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41(1):111-119.
30. Bernardis LL, Patterson, BD. Correlation Between “Lee Index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol.* 1968;40(4):527-528.
31. Lau E, Marques C, Pestana D, Santoalha M, Carvalho D, Freitas P, Calhau C. The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. *Ann Nutr Metab.* 2016;13(1):31.
32. Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of veterinary clinical pathology.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
33. Jain, N.C. *Schalm’s Veterinary Hematology.* 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986. p. 1221.
34. Ishioka K, Soliman MM, Sagawa M, Nakadomo F, Shibata H, Jonjoh T, et al. Experimental and clinical studies on plasma leptin in obese dogs. *J Vet Med Sci.* 2002;64(4):349–353.
35. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte.* 2015;5(1):11–21.
36. Vuong J, Qiu Y, La M, Clarke G, Swinkels DW, Cembrowski G. Reference intervals of complete blood count constituents are highly correlated to waist circumference: should obese patients have their own “normal values?”. *Am J Hematol.* 2014;89(7):671–677.
37. Bornstein S, Moschetta M, Kawano Y, Sacco A, Huynh D, Brooks D, et al. Metformin affects cortical bone mass and marrow adiposity in diet-induced obesity in male mice. *Endocrinol.* 2017;158(10):3369–3385.

38. Styner M, Thompson WR, Galior K, Uzer G, Wu X, Kadari S, et al. Bone marrow fat accumulation accelerated by high fat diet is suppressed by exercise. *Bone*. 2014; 64:39–46.
39. Luo Y, Chen GL, Hannemann N, Ipseiz N, Kronke G, Bauerle T, et al. Microbiota from obese mice regulate hematopoietic stem cell differentiation by altering the bone niche. *Cell Metab*. 2015;22(5):886–894.
40. Laharrague P, Oppert JM, Brousset P, Charlet JP, Campfield A, Fontanilles AM, Guy-Grand B, Coxberand JX, Pénicaud L, Casteilla L. High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34 + progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. *Int J Obes*. 2000; 24(9):1212–1216.
41. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol 2000*. 2013;64(1):139–153.
42. Bonatto NCM, de Oliveira PL, Mancebo AM, Costa LR, Bosculo MRM, Bosco AM, et al. Postprandial lipemia causes oxidative stress in dogs. *Res Vet Sci*. 2021;136:277–286.

APÊNDICE A “Referências da Introdução Geral”

- ADLER, B. J.; KAUSHANSKY, K.; RUBIN, C. T. Obesity-driven disruption of haematopoiesis and bone marrow niche. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 10, n. 12, p. 737–748, 2014.
- BENNETT, B. D.; SOLAR, G. P.; YUAN, J. Q.; MATHIAS, J.; THOMAS, G. R.; MATTHEWS, W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. **Curr. Biol.**, v. 6, n. 9, p. 1170–1180, 1996.
- BENOVA, A.; TENCERONA, M. Obesity-Induced changes in bone marrow homeostasis. **Front. Endocrinol.**, v. 11, p. 294, may. 2020.
- BOLUS, W. R.; PETERSON, K. R.; HUBLER, M. J.; KENNEDY, A. J.; GRUEN, M. L.; HASTY, A. H. Elevating adipose eosinophils in obese mice to physiologically normal levels does not rescue metabolic impairments. **Mol. Metab.**, v. 8, p. 86–95, 2018.
- BORNSTEIN, S.; MOSCHETTA, M.; KAWANO, Y.; SACCO, A.; HUYNH, D.; BROOKS, D. et al. Metformin affects cortical bone mass and marrow adiposity in diet-induced obesity in male mice. **Endocrinol.**, v. 158, n. 10, p. 3369–3385, 2017.
- CALIXTO, M. C.; LINTOMEN, L.; SCHENKA, A.; SAAD, M. J.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **Br. J. Pharmacol.**, v. 159, n. 3, p. 617–625, 2010.
- CAWTHORN, W. P.; SCHELLER, E. L.; LEARMAN, B.S.; PARLEE, S. D.; SIMON, B.R.; MORI, H.; et al. Bone Marrow Adipose Tissue Is an Endocrine Organ that Contributes to Increased Circulating Adiponectin during Caloric Restriction. **Cell Metab.**, v. 20, n. 2, p. 368–375, 2014.
- CLAYCOMBE, K.; KING, LE.; FRAKER, P. J. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. **PNAS.**, v. 105, n. 6, p. 2017–2021, 2008.
- DA SILVA, S. V.; RENOVATO-MARTINS, M.; RIBEIRO-PEREIRA, C.; CITELLI, M.; & BARJA-FIDALGO C. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. **Obesity**, v. 24, n. 12, p. 2522–2532, 2016.

DIB, L. H., ORTEGA, M. T., FLEMING, S. D., CHAPES, S. K., & MELGAREJO, T. Bone Marrow Leptin Signaling Mediates Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation in Male Mice. **Endocrinol.**, v. 155, n. 1, p. 40–46, 2014.

DO CARMO, L. S.; ROGERO, M. M.; PAREDES-GAMERO, E. J.; NOGUEIRA-PEDRO, A.; XAVIER, J. G.; CORTEZ, M.; BORGES, M. C.; FUJII, T. M.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. A high-fat diet increases interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor production by bone marrow cells and triggers bone marrow hyperplasia and neutrophilia in wistar rats. **Exp. Biol. Med.**, v. 238, n. 4, p. 375–384, 2013.

FEIJÓ, G. S. et al. Food Selection of Cafeteria Diet Affects Memory Dysfunction Related to Obesity. **Neurochem. Res.**, v. 44, n. 8, p. 1869–1877, 2019.

GALLAGHER, K. A.; JOSHI, A.; CARSON, W. F.; SCHALLER, M.; ALLEN, R.; MUKERJEE, S. et al. Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1420–1430, 2014.

GREER, J. P. **Windrobe's Clinical hematology**. 14th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. 2019. p. 1–2312.

HALADE, G. V.; EL JAMALI, A.; WILLIAMS, P. J.; FAJARD, R. J.; FERNANDES, G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. **Exp. Gerontol.**, v. 46, n. 1, p. 43–52, 2011.

HERISHANU, Y.; ROGOWSKI, O.; POLLIACK, A.; MARILUS R. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. **Eur. J. Haematol.**, v. 76, n. 6, p. 516–520, 2006.

HINDORF, C.; GLATTING, G, CHIESA, C.; LINDEN, O.; FLUX, G.; COMMITTEE, E.D. EANM Dosimetry Committee guidelines for bone marrow and wholebody dosimetry. **Eur. J. Nucl. Med. Mol Imaging.**, v. 37, p. 1238–1250, 2010.

HOUSEKNECHT, K. L.; MANTZOROS, C. S.; KULIAWAT, R. et al. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1638–1643, 1996.

LAHARRAGUE, P.; OPPERT, J. M.; BROUSSET, P.; CHARLET, J. P.; CAMPFIELD, A.; FONTANILLES, A. M. et al. High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34 + progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. **Int. J. Obes.**, v. 24, n. 9, p. 1212–1216, 2000.

LECKA-CZERNIK B. Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism. **Bone**, v. 50, n. 2, p. 534–539, 2012.

LEE, H.; LEE, I. S.; CHOUE, R. Obesity, Inflammation and Diet. **PGHN**, v. 16, n. 3, p. 143-152, set. 2013.

LUO, Y.; CHEN, G. L.; HANNEMANN, N.; IPSEIZ, N.; KRONKE, G.; BAUERLE, T. et al. Microbiota from obese mice regulate hematopoietic stem cell differentiation by altering the bone niche. **Cell Metab.**, v. 22, p. 886–894, 2015.

MATSUSHITA, K.; DZAU, V. J. Mesenchymal stem cells in obesity: insights for translation application. **Lab. Invest.**, v. 97, n. 10, p. 1158–1166, 2017.

MORRIS, V. M.; EDWARDS, M. C. Adipokines, adiposity and bone marrow adipocytes: dangerous accomplices in multiple myeloma. **J. Cell. Physiol.**, v. 233, p. 9159–9166, 2018.

STYNER, M.; THOMPSON, W. R.; GALIOR, K.; UZER, G.; WU, X.; KADARI, S. et al. Bone marrow fat accumulation accelerated by high fat diet is suppressed by exercise. **Bone**, v. 64, p. 39–46, 2014.

TRITOS, N. A.; MANTZOROS, C. S. Leptin: its role in obesity and beyond. **Diabetologia**, v. 40, n. 12, p. 1371–1379, 1997.

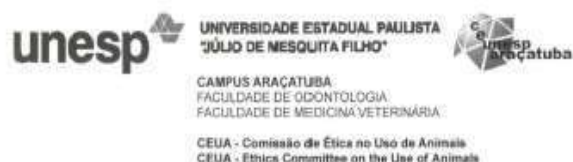
VERA, R. H.; VILAHUR, G.; BADIMON, L. Obesity with insulin resistance increase thrombosis in wild-type and bone marrow-transplanted Zucker fatty rats. **J Tromb. Haemost.**, v. 109, n. 02, p. 319–327, 2013.

VUONG, J.; QIU, Y.; LA, M.; CLARKE, G.; SWINKELS, D. W.; CEMBROWSKI, G. Reference intervals of complete blood count constituents are highly correlated to waist circumference: should obese patients have their own “normal values?”. **Am. J. Hematol.**, v. 89, n. 7, p. 671–677, 2014.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, v. 100, p. 157–168, 2000.

WILSON, C. A.; BEKELE, G.; NICOLSON, M.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E. Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. **Br. J. Haematol.**, v.99, n. 2, p. 447–451, 1997.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Eficácia do chá mate (*Ilex paraguariensis*) descafeinado no controle de estresse oxidativo, obesidade e lesão óssea em ratos Wistar". Processo FOA nº 00545-2017, sob responsabilidade de Paulo Cesar Ciarlini apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Julho de 2017.

VALIDADE DESTA CERTIFICADO: 31 de Dezembro de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 31 de Janeiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Efficacy of decaffeinated tea (*Ilex paraguariensis*) in the control of oxidative stress, obesity and bone lesion in Wistar rats", Protocol FOA nº 00545-2017, under the supervision of Paulo Cesar Ciarlini presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 05, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 31, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 31, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1150 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone: (18) 3636-3234 Email: CEUA@foa.unesp.br

ANEXO B – Normas da revista para publicação do artigo

Revista: The American Journal of Hematology

Free format submission

The American Journal of Hematology now offers free format submission for a simplified and streamlined submission process.

Before you submit, you will need:

- Your manuscript: this can be a single file including text, figures, and tables. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results, and conclusions. For all article types, with the exception of Morphology Update, a figure legend must be provided for each figure and must define all abbreviations used therein. Figure legends should be placed at the end of the manuscript text file. Do not include the labelling or legend directly in the figure file. For the article type, Morphology Update, each figure file should be named using location labeling (i.e. top right, top left, bottom left, bottom right) and cited as such in the main manuscript. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers. If your manuscript is difficult to read, the editorial office may send it back to you for revision.
- The title page of the manuscript, including statements relating to our ethics and integrity policies:
 - data availability statement
 - funding statement
 - conflict of interest disclosure
 - ethics approval statement
 - patient consent statement
 - permission to reproduce material from other sources
 - clinical trial registration

(Why is this important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication.)

- Your co-author details, including affiliation and email address. *(Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.)*
- An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. *(Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.)*

To submit, login at <https://mc.manuscriptcentral.com/ajh> and create a new submission. Follow the submission steps as required and submit the manuscript.

If you are invited to revise your manuscript after peer review, the journal will also request the revised manuscript to be formatted according to journal requirements as described below.

NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#)

For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for Wiley Online Library journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

- [Permission Request Form](#)
- [The National Institutes of Health Public Access Initiative](#)

Author Guidelines

Wiley's Journal Styles

Submission and Contact Information

American Journal of Hematology welcomes submitted manuscripts online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/ajh>

When uploading the manuscript files into the journal's online program, please ensure tables are included in the main text file. Figures can be provided in a separate file. Tables are to be numbered consecutively with Arabic numerals, with figures in Arabic as well. See also Figures (below) for specifications.

The title page should contain the complete title of the manuscript, the names, degrees, and affiliations of all authors, as well as the name, address, and email of the person to whom all correspondence should be addressed. The title page should also include the abstract word count, text word count, the number of tables and figures, a short running title, and three to six keywords to index the content.

When submitting the manuscript online, provide the names, affiliations, and email addresses of three preferred reviewers at institutions other than those of the authors.

The total number of words in the text, as well as the number of figures and tables should be listed at the bottom of the title page.

Authors are encouraged to check for an existing account. If you are submitting for the first time, and you do not have an existing account, then you must create a new account. Once you have logged in, you will be presented with the Main Menu and a link to your Author Center. Submit your manuscript from the Author Center. At the end of a successful submission, a confirmation screen with a manuscript number will appear, and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact our Help Desk at AJHadmin@wiley.com.

Editorial Office:

Erica Byrd
John Wiley & Sons
111 River Street
Hoboken, NJ 07030
E-mail: AJHAdmin@wiley.com

Editor in Chief:
Carlo Brugnara, MD
Department of Laboratory Medicine,
Children's Hospital Boston
300 Longwood Avenue, BA 760
Boston, MA 02115, USA
Phone: 617.355.6610
Fax: 617.730.0383
e-mail: Carlo.Brugnara@childrens.harvard.edu

Submission Requirements

All manuscripts submitted to the *American Journal of Hematology* must be submitted solely to this journal. Submissions may not have been published in any part or form in another publication of any type, professional or lay, or become the property of another publisher. Any material reproduced or adapted from any other published or unpublished source must be duly acknowledged. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce copyrighted material. Upon submission of a manuscript for publication, the author will be requested to sign an agreement transferring copyright to the publisher, who reserves copyright. Material published in this journal may not be reproduced or published elsewhere without the written permission of the publisher and the author. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the author who will assist the editor and publisher by reviewing proofs. No page charges will be levied against authors or their institutions for publication in this journal.

All authors should have contributed in a significant manner and be in agreement with all content in a manuscript. The corresponding author will take responsibility for upholding this requirement.

Wiley suggests that authors from non-English speaking countries have their manuscript reviewed and corrected by English Language Services before submission. Please see the following link for more information: http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp.

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

CBC Units

The journal has an approved list of CBC units which all submissions must adhere to. These are listed below – please ensure these are used in your submission.

CBC UNITS , EXAMPLES

CELL COUNTS	x 10³/μL	x 10⁹/L
WBC – white blood cell count , absolute	4.5 x 10 ³ /μL	4.5 x 10 ⁹ /L
Platelet count –	275 x 10 ³ /μL	275 x 10 ⁹ /L
	x 10⁶/μL	x 10¹²/L
RBC – red blood cell count –	5.1x 10 ⁶ /μL	5.1 x 10 ¹² /L
Reticulocyte count, absolute	10 ¹² /L	0.090 x 10 ¹² /L
	10 ⁹ /L	90 x 10 ⁹ /L
WBC differential count – percentages of total of different cell types.		55%
Reticulocytes, percentage	1.5%	
OTHER PARAMETERS		
Hemoglobin –	g/dL	12.5 g/dL
	g/L	125 g/L
Hematocrit – percentage		25%
Decimal percentage or L/L		0.25 or 0.25
L/L		
MCV – mean corpuscular volume – femtoliters		90 fL
MCH – mean corpuscular hemoglobin – picograms		24 pg
MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration –	g/dL	29 g/dL
	g/L	290 g/L
MPV – mean platelet volume – femtoliters		8.1 fL
RDW – red cell distribution width – percentage		12.5%

NOTE: Please do not use K to define thousand

Review process

Manuscripts are usually assigned to one of the Associate Editors. Every submitted manuscript will undergo a rapid in-house review to determine if it is suitable for the journal and if it has priority ranking in relationship to all other manuscript being considered for publication that would justify a review by external experts. Manuscripts will be rejected without external review if they are deemed not suitable for the journal or if they have low priority ranking. Manuscripts are usually sent out for review to at least two external, expert reviewers. *AJH* will try to follow authors' suggestions for

possible inclusion or exclusion of specific experts in the field. Authors will receive e-mail notification concerning the final editorial decision, with comments from reviewers and editors when applicable.

Rapid Review of Manuscripts Submitted Previously to Another Journal:

As stated in the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication" (<http://www.icmje.org> ; Updated February 2006): *"If the manuscript has been submitted previously to another journal, it is helpful to include the previous editor's and reviewers' comments with the submitted manuscript, along with the authors' responses to those comments. Editors encourage authors to submit these previous communications and doing so may expedite the review process."* For manuscripts previously submitted to other journals with impact factor of 14 or greater, if authors include previous editor's and reviewers' comments along with their responses, the American Journal of Hematology will guarantee a rapid (within a week) in-house assessment, with three possible outcomes:

- a) Acceptance or acceptance with minor changes (no additional external reviews needed);
- b) Rejection;
- c) Additional external review needed; in this case the authors will have the possibility of accepting the additional external review or withdrawing the manuscript.
- d) When submitting a paper for Rapid Review be sure to answer the question regarding rapid review in the affirmative, upload a Word document containing the previous review comments and your detailed responses to the reviewer(s) concerns as "Supplementary Material for Review."

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the open access option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and

Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing Open Access

If the open access option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the open access option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Disclosure statement

All authors must disclose any affiliations that they consider to be relevant and important with any organization that to any author's knowledge has a direct interest, particularly a financial interest, in the subject matter discussed. Such affiliations include, but are not limited to, employment by an industrial entity, ownership of stock, membership on a standing advisory council or committee, a seat on the board of directors, or being publicly associated with a company or its products. Other areas of real or perceived conflict of interest would include receiving honoraria or consulting fees or receiving grants or funds from corporations or individuals representing such corporations. This requirement will apply to every sort of article submitted to the *Journal*, including original research, reviews, editorials, letters to the editor, and any others, and should be disclosed at the time of submission. The simplest remedy for conflict of interest is disclosure. In the *Journal*, disclosure will henceforth be achieved by the inclusion of a short footnote with each published article. This information will be held in confidence while the paper is under review. It will not be shared with peer reviewers, and it will not influence the editorial decision to accept or reject the manuscript. When an article is accepted for publication, the editors will usually discuss with the authors the manner in which such information is to be presented.

Data Sharing and Data Availability

This journal expects data sharing. Review [Wiley's Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission.

RESEARCH ARTICLES. Articles should represent original and in-depth studies involving all aspects of clinical or laboratory investigations. While there is no length restriction for articles, authors are encouraged to limit the text to a maximum length of 5,000 words and references to no more than 100. The number of illustrations and tables should be appropriate for the data presented, but should not repeat information in the text.

The title page should contain the complete title of the manuscript, the names, degrees, and affiliations of all authors as well as the name, address and email of the person to

whom all correspondence should be addressed. While the number of authors should usually not exceed six, exceptions will be granted with adequate justification. The title page should also include the abstract word count, text word count, the number of tables and figures, a short running title, and three to six keywords to index the content.

Abstract. This should be a factual condensation of the entire work, including a statement of its purpose, a clear description of the findings, including numbers, and finally a concise presentation of the conclusions. The abstract may not exceed 250 words.

Color figures. Color figures may be published online free of charge; however, the journal charges for publishing figures in color in print. Upon submission of color figures at Early View publication, you will be invited to complete a color charge agreement in RightsLink for Author Services. You will have the option of paying immediately with a credit or debit card, or you can request an invoice. If you choose not to purchase color printing, the figures will be converted to black and white for the print issue of the journal.

Text. The text should follow the following format: **Introduction, Methods, Results, and Discussion (please note that this has been recently changed so that Methods is at the top of the paper, placed in between Introduction and Results).** Place Acknowledgments as the last element of the text, before references. Use subheadings and paragraph titles when possible. Authors whose first language is not English should arrange for their manuscripts to be written in idiomatic English and reviewed prior to submission by an editor facile in medical English. This will avoid disappointing delays before a paper can be sent out for review. Please see the "Submission requirements" section above for guidelines relating to language.

Patients should be referred to only by subject numbers and not with names, initials, or other potentially identifying characters. Manuscripts reporting the results of experimental investigations on human subjects must include a statement to the effect that the procedures received official institutional approval.

Use non-capitalized generic names (e.g., cyclophosphamide) for all drugs and pharmaceutical preparations. Trade names (capitalized) for appliances, etc., may be used in the Methods section, and the manufacturers should be identified by name and address.

Any tables submitted with the text should be sent/uploaded as separate Word files.

References: All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book:

2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA – American Medical Association reference style - [AMA Manual of Style](#)

Wiley's Journal Styles are Now in Endnote. EndNote is a software product that we recommend to our journal authors to help simplify and streamline the research process. Using EndNote's bibliographic management tools, you can search bibliographic databases, build and organize your reference collection, and then instantly output your bibliography in any Wiley reference style. If you already use EndNote, you can download the reference style for this journal. How to Order: To learn more about EndNote, or to purchase your own copy, [click here](#).

Technical Support: If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com, or visit <http://www.endnote.com/support>.

Manuscript

For optimal production, prepare manuscript text using Microsoft Word.

Figures

When preparing digital art, please submit your figures as separate files and consider the following:

Resolution

The minimum requirements for resolution are:

- 1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.
- 300 DPI/PPI for picture-only photographs
- 600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Formats

For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color; upon acceptance, CMYK color will be required. Delivery of production-quality files early in the review process may help facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted.

A legend must be provided for each illustration and must define all abbreviations used therein. Legends should be placed at the end of the manuscript text file or below each figure. Please be sure to submit your figures as separate files.

Authors are encouraged to submit color illustrations that highlight the text and convey essential scientific information. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print. For best reproduction, use bright, clear colors. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible. Please contact ajhprod@wiley.com for further information.

Critical Reviews

Reviews of important and timely subjects can be invited by the editorial board or submitted independently. In the latter case, it is usually helpful for the corresponding author to consult the Editor-in-Chief prior to submission. Reviews should focus on the critical aspects of a subject, linking established knowledge to areas that remain controversial or unanswered. Reviews should normally comprise less than 6,000 words, contain an unstructured abstract of 100 words or less, and use fewer than 150 references; illustrations and tables should be used only to provide summaries or a synthesis of ideas and/or data not included in the text.

REVIEWS OF BOOKS AND OTHER MEDIA FORMATS.

Reviews of books, films, or other media formats

Reviews of books, films, or other media formats relevant to the scientific or clinical practice of medicine, with particular importance to hematology/oncology, may be invited or submitted independently. In the latter case, please consult with the Editor-in-Chief prior to submission.

Correspondence

Correspondence should usually be in reference to previously published manuscripts in *American Journal of Hematology*. However, correspondence relating to important and timely publications or topics from other sources may also be appropriate. Brief descriptions of interesting laboratory or clinical observations may also be appropriate. Correspondence to the Editor should be no more 1,500 words, no more than 6 references and one table/figure.

Commentaries

Commentaries are usually invited but may be submitted independently after consultation with the Editor-in-Chief. Please limit the text to 2,500 words and fewer than 10 references. Commentaries should focus on a controversial subject arising from a recently published *American Journal of Hematology* manuscript, but they may also focus on independent and timely topics of relevance to the journal's readership. Illustrations and Tables are allowed only if they highlight or clarify points made in the text. Commentaries will be reviewed and may require changes or be rejected.

Meeting reports and supplements

Concise summaries of meetings that have important information to convey to the readers of *American Journal of Hematology* are welcomed, but consultation with the Editor-in-Chief should occur before submission. Summaries should emphasize the issues discussed at the meeting along with an explanation of how they are important or controversial. Summaries should be less than 2000 words. Illustrations and tables may be included but only when they add significantly to the text content. More extensive reports with manuscripts from the speakers are also welcomed, but early consultation with the Editor-in-Chief must take place in order to determine the type and number of manuscripts to be published, the review process, and the procurement of additional funding if required.

Test of the Month

Please consult with the Editor-in-Chief before submission. This new feature should include a discussion of a specific laboratory test/parameter that is relevant for hematologist/oncologists and for any clinicians dealing with blood disorders. It should summarize technical specifications and issues, clinical performance and pitfalls, and

provide evidence of sensitivity and specificity, particularly discussing disease conditions if available. Manuscript length should be no more than 1,500 words with no more than 25 references.

Solving Clinical Problems in Blood Disease

The format of this case presentation should be similar to that used in the Clinical problem-solving articles of the *New England Journal of Medicine* (see as an example: [Prasad M et al. New Engl J Med 2006 355:2468-2473](#)). These articles should reproduce the step-by-step process used by clinicians dealing with novel and/or unusually challenging clinical presentations of hematological diseases. Clinical information must be presented in stages (boldface type), followed by the clinical reasoning of the physician taking care of such a patient, and a final discussion of the case as it relates to disease pathophysiology, complications, treatment, and treatment outcomes. Manuscript length should be no more than 2,500 words, with no more than 25 references.

Images in Hematology

We believe that the discipline of hematology lends itself particularly well to visual case presentations. The purpose of this section of the *Journal*, therefore, is to present an interesting visual description of a defined hematological condition. The image may consist of a single photo or a series of photos that, when grouped together, give a visual description of the specific hematological entity. It is expected that the submitting authors(s) will supplement the visual "Image" with brief text as necessary to tell the full story. Whenever appropriate, we will publish the images in full color.

Diagnostic Imaging in Hematology

A variety of techniques (X-rays, CT scans, MRI, Nuclear Medicine scans and ultrasound) are routinely utilized in the diagnosis and treatment of hematological diseases. The purpose of this section of the *Journal* is to provide images of techniques which provide relevant diagnostic and clinical information for physicians managing patients affected by Blood Diseases.

Updates in Clinical Trials for Hematological Diseases

These are invited submissions, and any submissions in this category must be cleared by the editor first. If you wish to submit in this category, please contact the editorial office.