

**Universidade Estadual de Campinas - Unicamp  
Faculdade de Ciências Médicas**

---

**Adriana da Silva Santos Duarte**

**Efeito da Hidroxiuréia e Progesterona  
na Regulação da Transcrição do Gene  
da Gama Globina**

Campinas – SP

2002

Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

**Faculdade de Ciências Médicas**

---

# **Efeito da Hidroxiuréia e Progesterona na Regulação da Transcrição do Gene da Gama Globina**

**Adriana da Silva Santos Duarte**

**Orientadora: Profa. Dra. Sara T. O. Saad**

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica.*

Campinas – SP

2002

ii

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

INIDADE BC  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
D85e  
V EX  
TOMBO BCI 49387  
PROC 16-837/102  
C DX  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 05/06/102  
Nº CPD                     

CM00168294-4

BIB ID 242723

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

D85e Duarte, Adriana da Silva Santos  
Efeito da hidroxiuréia e progesterona na regulação da transcrição do gene da gama globina. / Adriana da Silva Santos Duarte. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Progesterona. 2. Anemia falciforme. 3. Hemoglobina fetal. I. Sara Teresinha Olalla Saad. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a):** *Profa. Dra. Sara Teresinha Ollala Saad*

---

*Sara Teresinha Ollala Saad*

---

**Membros:**

---

1. Professora Doutora Sandra de Fátima Menossi Gualandro

*Sandra de Fátima Menossi Gualandro*

2. Professor Doutor Fernando Ferreira Costa

*Fernando Ferreira Costa*

---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

*2002.4700*

---

**Data: 27.02.2002**

---

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

*“Não é a força, mas a perseverança  
que realiza grandes coisas”*

*(S.Johnson)*

*Aos meus pais, Francisco e Marinilha pelo amor, incentivo,  
confiança e pelas lições de vida;  
Às minhas irmãs, Aislan e Andréa, pela amizade, apoio e otimismo;*

*Ao meu marido Fernando, por todo amor, compreensão, ajuda,  
incentivo e companheirismo ao longo dessa caminhada.*

## *Agradecimentos*

À Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad pela orientação, ensinamentos, apoio, confiança e principalmente pela oportunidade de realizar com muita satisfação esse trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Dr Fernando Ferreira Costa pelo apoio durante a realização do trabalho.

À Manoela pela grande amizade e pelos exemplos de honestidade, força e perseverança.

À Lena pela amizade, carinho e cuidados.

À Angela pela amizade, companheirismo e solidariedade.

À Dulcinéia pela solução dos problemas de informática, pela amizade e positividade.

Ao Prof. Dr. José Mengel pelo grande auxílio com a citometria de fluxo.

Ao Roberto Zulli pelas muitas horas dedicadas a estatística desse trabalho.

À Silvana Bordin, Mônica Melo e Daniela Bassères pelo apoio, confiança e pelos ensinamentos de biologia molecular.

À Dilmara e Tereza pelo exemplo de competência técnica.

À Dra Simone Gilli e à Dra Angela Luzo pela amizade, carinho e incentivo desde o início dessa jornada.

Aos amigos do laboratório Edna, Flávia, Tatiana, Simone, Roberta, Artemis, Aline, Heloísa, Ucha, Marcela, Paulo, Tiago, Anderson, Marcelo, Edson, Nicola, Patrícia, Raquel, André, Natasha e a todos os outros aqui não mencionados, mas que fizeram parte de uma alegre convivência.

Aos profissionais dos laboratórios de citogenética, citometria de fluxo, fracionamento, hematologia e comunicação social por todo auxílio prestado.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e para meu amadurecimento como pesquisadora e desenvolvimento como ser humano.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

|                                                                                                                                                                 |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Lista de Abreviaturas .....</b>                                                                                                                              | <b>viii</b> |
| <b>Lista de Figuras, Tabelas e Gráficos .....</b>                                                                                                               | <b>x</b>    |
| <b>Resumo .....</b>                                                                                                                                             | <b>xiii</b> |
| <b>Introdução .....</b>                                                                                                                                         | <b>15</b>   |
| <b>Objetivos .....</b>                                                                                                                                          | <b>24</b>   |
| <b>Metodologia .....</b>                                                                                                                                        | <b>26</b>   |
| Proliferação e Maturação dos Progenitores Eritróides Humano em Cultura<br>Líquida de Duas Fases .....                                                           | 26          |
| Preparo do meio condicionado da linhagem de células 5637 .....                                                                                                  | 30          |
| Extração RNA total, quantificação e eletroforese .....                                                                                                          | 32          |
| RT-PCR semiquantitativo para verificação da expressão dos fatores de<br>transcrição envolvidos no crescimento e diferenciação da linhagem eritróide ....        | 35          |
| Citometria de Fluxo para quantificação de células contendo HbF e análise do<br>padrão de expressão dos marcadores glicoforina A e receptor de transferrina .... | 39          |
| Método para marcação intracitoplasmática .....                                                                                                                  | 39          |
| Método para marcação de superfície celular .....                                                                                                                | 39          |
| Aquisição dos dados no citômetro .....                                                                                                                          | 40          |
| Análise Estatística .....                                                                                                                                       | 43          |
| <b>Resultados .....</b>                                                                                                                                         | <b>44</b>   |
| Crescimento e Diferenciação de Progenitores Eritróides do Sangue Periférico<br>Humano em Cultura Líquida de Duas Fases .....                                    | 45          |
| Titulação do meio condicionado de células da linhagem 5637 .....                                                                                                | 45          |

|                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Sistema de cultura líquida em duas fases .....                                                                                                          | 46        |
| Expressão do mRNA dos Fatores de Transcrição GATA-1, GATA-2, NF-E2 e<br>do gene $\gamma$ -globina em células tratadas com a droga Hidroxiuréia .....    | 48        |
| Expressão do mRNA dos Fatores de Transcrição GATA-1, GATA-2, NF-E2 e<br>do gene $\gamma$ -globina em células tratadas com o hormônio progesterona ..... | 54        |
| Deteção de Células F e Quantificação de HbF por Citometria de Fluxo .....                                                                               | 60        |
| Efeitos da Hidroxiuréia na síntese de HbF <i>in vitro</i> .....                                                                                         | 60        |
| Efeitos da Progesterona na síntese de HbF <i>in vitro</i> .....                                                                                         | 63        |
| Expressão dos marcadores glicoforina A e receptor de transferrina .....                                                                                 | 66        |
| Efeitos da Hidroxiuréia sobre o padrão de expressão dos marcadores de<br>membrana celular .....                                                         | 68        |
| Efeitos da Progesterona sobre o padrão de expressão dos marcadores de<br>membrana celular .....                                                         | 71        |
| <b>Discussão .....</b>                                                                                                                                  | <b>74</b> |
| <b>Conclusões .....</b>                                                                                                                                 | <b>82</b> |
| <b>Summary .....</b>                                                                                                                                    | <b>84</b> |
| <b>Referências Bibliográficas .....</b>                                                                                                                 | <b>86</b> |

|                         |                                                             |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>HbS</b>              | Hemoglobina S                                               |
| <b>HbF</b>              | Hemoglobina F                                               |
| <b>HU</b>               | Hidroxiuréia                                                |
| <b>RT-PCR</b>           | Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase          |
| <b>BFU-E</b>            | Unidade formadora do burst eritróide                        |
| <b>LCR</b>              | Região controladora do locus                                |
| <b>IMDM</b>             | Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium                         |
| <b>EDTA</b>             | Ácido etilenodiaminotetracético                             |
| <b>CHCL<sub>3</sub></b> | Clorofórmio                                                 |
| <b>PE</b>               | Ficoeritrina                                                |
| <b>FITC</b>             | Fluoresceína isotiocianato                                  |
| <b>Epo</b>              | Eritropoietina                                              |
| <b>CFU-E</b>            | Unidade formadora de colônia eritróide                      |
| <b>RNA</b>              | Ácido ribonucleico                                          |
| <b>mRNA</b>             | RNA mensageiro                                              |
| <b>cDNA</b>             | DNA complementar                                            |
| <b>G-CSF</b>            | Fator estimulador do crescimento de granulócitos            |
| <b>GM-CSF</b>           | Fator estimulador do crescimento de granulócitos-macrófagos |
| <b>M-CSF</b>            | Fator estimulador do crescimento de monócito                |
| <b>SCF</b>              | Fator estimulador de crescimento de células tronco          |
| <b>IL-1</b>             | Interleucina 1                                              |

|             |                                          |
|-------------|------------------------------------------|
| <b>dNTP</b> | Desoxiribonucleotídeos trifostato        |
| <b>BSA</b>  | Soro Albumina Bovina                     |
| <b>DTT</b>  | Ditiotreitol                             |
| <b>FSC</b>  | Forward Light Scatter                    |
| <b>SSC</b>  | Right angle light scatter (side scatter) |
| <b>RPM</b>  | Rotações por minuto                      |
| <b>HRE</b>  | Elemento Responsivo a Hormônio           |
| <b>PR</b>   | Receptor de Progesterona                 |
| <b>PRE</b>  | Elemento Responsivo a Progesterona       |

**Figuras**

|                |                                                                                                                                          |    |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fig. 1</b>  | Esquema do mecanismo de ação de hormônios esteróides .....                                                                               | 19 |
| <b>Fig. 2</b>  | Figura parcial tridimensional do fator de transcrição GATA-1.....                                                                        | 23 |
| <b>Fig. 3</b>  | Esquema da cultura em duas fases.....                                                                                                    | 29 |
| <b>Fig. 4</b>  | Proliferação de células hematopoiéticas em meio semi-sólido .....                                                                        | 31 |
| <b>Fig. 5</b>  | Gel de agarose desnaturante para RNA total .....                                                                                         | 34 |
| <b>Fig. 6</b>  | Monitoração da cinética de reação em cadeia da polimerase .....                                                                          | 36 |
| <b>Fig. 7</b>  | Monitoração da cinética de reação em cadeia da polimerase .....                                                                          | 37 |
| <b>Fig. 8</b>  | Gráfico de pontos SSCxFSC e histogramas do controle e HbF .....                                                                          | 41 |
| <b>Fig. 9</b>  | Gráfico de pontos SSCxFSC, controle, glicoforina A e CD71 .....                                                                          | 42 |
| <b>Fig. 10</b> | Esquema da diferenciação eritróide .....                                                                                                 | 46 |
| <b>Fig. 11</b> | Células eritróides em diferentes tempos da Fase II da cultura.....                                                                       | 47 |
| <b>Fig. 12</b> | Análise por RT-PCR semiquantitativo da expressão dos fatores de<br>transcrição em células tratadas com HU.....                           | 49 |
| <b>Fig. 13</b> | Análise por RT-PCR semiquantitativo da expressão dos fatores de<br>transcrição em células tratadas com progesterona .....                | 55 |
| <b>Fig. 14</b> | Análise de células positivas para HbF através de histogramas de<br>sobreposição de células tratadas e não tratadas com HU.....           | 61 |
| <b>Fig. 15</b> | Análise de células positivas para HbF através de histogramas de<br>sobreposição de células tratadas e não tratadas com progesterona..... | 64 |
| <b>Fig. 16</b> | Padrão de expressão dos marcadores glicoforina A e CD 71 .....                                                                           | 67 |
| <b>Fig. 17</b> | Citometria de fluxo para glicoforina A e CD 71 em células tratadas e<br>não tratadas com HU.....                                         | 69 |
| <b>Fig. 18</b> | Citometria de fluxo para glicoforina A e receptor de transferrina em                                                                     |    |

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| células tratadas e não tratadas com progesterona..... | 72 |
|-------------------------------------------------------|----|

## Tabelas

|               |                                 |    |
|---------------|---------------------------------|----|
| <b>Tab. 1</b> | Quantificação de RNA total..... | 33 |
|---------------|---------------------------------|----|

|               |                                           |    |
|---------------|-------------------------------------------|----|
| <b>Tab. 2</b> | Titulação do meio condicionado 5637 ..... | 45 |
|---------------|-------------------------------------------|----|

## Gráficos

|                     |                                                                                                           |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Graf.1,2,3,4</b> | Representação dos resultados obtidos por RT-PCR e densitometria em células tratadas e não tratadas com HU |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                   |    |
|-------------------|----|
| Gama Globina..... | 50 |
|-------------------|----|

|              |    |
|--------------|----|
| GATA-1 ..... | 51 |
|--------------|----|

|              |    |
|--------------|----|
| GATA-2 ..... | 52 |
|--------------|----|

|             |    |
|-------------|----|
| NF-E2 ..... | 53 |
|-------------|----|

|                     |                                                                                                                     |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Graf.5,6,7,8</b> | Representação dos resultados obtidos por RT-PCR e densitometria em células tratadas e não tratadas com progesterona |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                   |    |
|-------------------|----|
| Gama Globina..... | 56 |
|-------------------|----|

|              |    |
|--------------|----|
| GATA-1 ..... | 57 |
|--------------|----|

|              |    |
|--------------|----|
| GATA-2 ..... | 58 |
|--------------|----|

|             |    |
|-------------|----|
| NF-E2 ..... | 59 |
|-------------|----|

|               |                                                                                                                                         |    |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Graf.9</b> | Representação gráfica dos resultados positivos para HbF obtidos por citometria de fluxo em células tratadas e não tratadas com HU ..... | 62 |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                |                                                                                                                                                   |    |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Graf.10</b> | Representação gráfica dos resultados positivos para HbF obtidos por citometria de fluxo em células tratadas e não tratadas com progesterona ..... | 65 |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                |                                                                                                                     |    |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Graf.11</b> | Padrões de expressão dos marcadores glicoforina A e CD 71 em células tratadas e não tratadas com HU.....            | 70 |
| <b>Graf.12</b> | Padrões de expressão dos marcadores glicoforina A e CD 71 em células tratadas e não tratadas com progesterona ..... | 73 |

## ***Resumo***

A anemia falciforme é uma doença hereditária com alta incidência na população, causada por um defeito estrutural na cadeia da  $\beta$ -globina que origina a HbS. Essa hemoglobina anômala, sob baixas tensões de oxigênio, forma polímeros intracelulares, provocando a deformação dos eritrócitos que por sua vez bloqueiam a microcirculação, ocasionando infarto de vários órgãos. Estudos clínicos demonstraram que a HbF possui a capacidade de inibir a polimerização da HbS e reduzir a falcização, melhorando assim o quadro clínico.

A indução farmacológica por vários compostos químicos, dentre os quais a hidroxiuréia (HU), 5-azacitidina, butirato e os hormônios esteróides, aumentam a síntese de HbF em pacientes com anemia falciforme. A regulação da expressão da HbF está relacionada à presença de elementos ativos ligados em “cis” ao complexo da  $\beta$ -globina, bem como de proteínas regulatórias do processo de transcrição gênica denominadas fatores de transcrição, como as proteínas GATA-1, GATA-2 e NF-E2, expressas principalmente na linhagem eritróide.

Esse projeto teve por objetivo estudar o efeito da HU e do hormônio progesterona na modulação da expressão gênica pelos fatores de transcrição GATA-1, GATA-2 e NF-E2 e do gene  $\gamma$  globina, em células da linhagem eritróide obtidas através da cultura de duas fases a partir de sangue periférico de doadores de sangue atendidos no Hemocentro da Unicamp. A expressão dos genes destes fatores de transcrição foi determinada por RT-PCR semiquantitativo e quantificação por densitometria.

Os nossos resultados mostraram que nas células tratadas com HU ou progesterona houve aumento significativo da expressão do fator de transcrição GATA-1 e do gene  $\gamma$  globina a partir de 96hs da Fase II do sistema de cultura líquida em duas fases até o seu término com 216hs, quando comparada com as células sem tratamento ( $P < 0,05$ , teste de Wilcoxon). A expressão do fator de transcrição NF-E2 não demonstrou sofrer influência pela administração de HU e progesterona durante todo o processo de diferenciação eritróide e ambos os fármacos não exerceram qualquer influência de caráter significativo sobre a expressão do fator de transcrição GATA-2 ( $P > 0,05$ , teste de Wilcoxon).

## ***Introdução***

A anemia falciforme, uma das doenças hereditárias mais comuns, origina-se de um defeito estrutural na cadeia da  $\beta$ -globina, ou seja, uma mutação devido à substituição do aminoácido ácido glutâmico para valina na posição 6 da cadeia  $\beta$ , originando a HbS. A HbS é insolúvel e forma cristais quando exposta a baixas tensões de oxigênio levando à sua polimerização. As células vermelhas falcizadas podem bloquear diferentes áreas da microcirculação causando infartos de vários órgãos (Pissard et al, 1994, Rodgers, 1997).

A gravidade clínica dessa doença varia muito. Os pacientes afetados apresentam anemia hemolítica crônica, atraso no crescimento, infecções repetidas, obstrução vascular e infartos dolorosos em vários tecidos. O efeito da doença sobre a sobrevivência é variável. Estudos clínicos mostraram uma relação inversa entre a gravidade da doença e o nível de Hemoglobina Fetal (HbF) (Pissard et al, 1994, Rodgers, 1997).

Em humanos adultos normais, somente 0,5-1% da hemoglobina total nas células vermelhas é HbF, estando restrita a uns poucos eritrócitos denominados células F. Estudos clínicos demonstraram que o aumento da HbF, constituída por 2 cadeias  $\alpha$  e 2 cadeias  $\gamma$ , melhora os sintomas clínicos dos indivíduos com anemia falciforme pelo aumento da solubilidade da hemoglobina e da afinidade pelo oxigênio, reduzindo dessa maneira a polimerização dos tetrâmeros de hemoglobina contendo  $\beta^s$  globina (Kaufman, 1992, Charache et al, 1995, Epstein et al, 1996, Buller et al, 1999).

Essas observações sugerem que um tratamento estratégico, capaz de reativar a expressão da HbF após o nascimento, poderia ser explorado (Olivieri et al, 1998). Para isso, é necessário entender os mecanismos básicos da regulação no locus da  $\beta$ -globina, e os fatores que modulam a expressão da  $\gamma$ -globina (Cunningham et al, 1996).

Fatores como a indução farmacológica podem alterar a síntese de HbF (Saleh et al, 1997). Vários agentes farmacológicos que alteram a expressão de HbF têm sido testados em animais e em pacientes com anemia falciforme e talassemia beta. Dentre os mais conhecidos, seguro e de fácil manipulação está a Hidroxiuréia (HU), um agente citotóxico, não carcinogênico, utilizado na terapêutica de doenças mieloproliferativas e que nos últimos anos vem sendo administrada a pacientes com anemia falciforme visando induzir a síntese de HbF e consequentemente amenizar os sintomas que caracterizam a doença (Kaufman, 1992, Charache et al, 1995, Rodgers, 1997, Yang et al, 1997, Saleh et al, 1998).

Vários efeitos foram observados durante o tratamento com HU em pacientes com anemia falciforme. Além do aumento dos níveis de HbF, foi constatado também o aumento do número de células F e de reticulócitos F, assim como dos valores da massa corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média. Observou-se também aumento da sobrevivência do eritrócito e da afinidade pelo oxigênio e uma melhora na deformabilidade e hidratação da célula eritróide (Kaufman, 1992, Stamatoyannopoulos *et al*, 1994, Yang *et al*, 1997).

Muitas hipóteses vêm sendo formuladas na tentativa de explicar os efeitos ou mecanismos de ação da HU na cinética celular. A rápida regeneração dos precursores eritróides após a fase de citoredução na manipulação farmacológica *in vivo* tem sido sugerida como um dos principais mecanismos envolvidos no estímulo da produção de HbF (Mankad *et al*, 1994, Rodgers, 1995, Yang *et al*, 1997). Esse mecanismo é possível em virtude da HU ser capaz de interromper a síntese de DNA nas células precursoras eritróides em estágios mais avançados da diferenciação, através da inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, o que leva a uma breve suspensão da hematopoese. O restabelecimento da eritropoese se dá com o stress hematopoético, que consiste no recrutamento de progenitores eritróides jovens que possuem a sua capacidade conservada de produzir HbF, os quais podem sofrer acelerada diferenciação e maturação. Portanto, os eritrócitos maduros originam-se de progenitores que continuam a expressar ativamente o gene  $\gamma$ -globina, resultando no aumento da produção de HbF (Kaufman, 1992, Stamatoyannopoulos *et al*, 1994, Yang *et al*, 1997, Saleh *et al*, 1998).

A habilidade de responder ao tratamento com HU pode depender da reserva de medula óssea, ou da capacidade da mesma em resistir a moderadas doses de HU com mielotoxicidade aceitável. A mielossupressão é determinada por uma interação entre os efeitos mielotóxicos da droga e a capacidade proliferativa da medula óssea. O aumento de HbF, durante o tratamento com HU, pode ocorrer em indivíduos com medula óssea contendo reserva suficiente para responder à mielotoxicidade desse agente, pela diferenciação de uma população de eritroblastos produtores de HbF (Steinberg, 1997).

Estudos recentes demonstraram uma forte relação linear inversa entre o número total de colônias BFU-E e níveis de HbF em pacientes com anemia falciforme tratados com HU. Isto sugere que a droga estimula a síntese de HbF através da alteração cinética do ciclo celular,

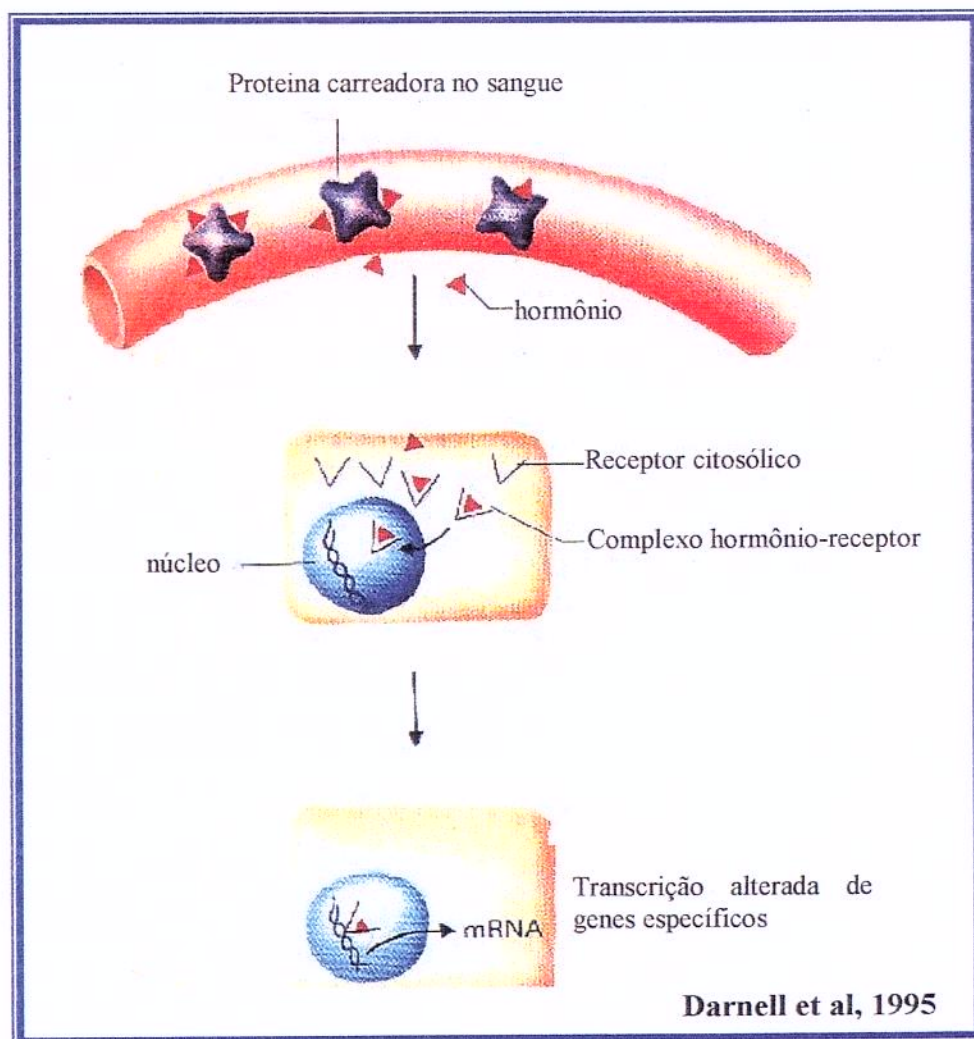
reforçando a hipótese de que a indução de HbF está ligada à rápida regeneração eritróide (Yang et al, 1997, Baliga et al, 2000).

Além da HU, outros agentes farmacológicos, indutores da síntese de HbF, estão sendo analisados quanto à eficiência na indução de HbF e quanto ao nível de toxicidade. Os hormônios esteróides, dentre os quais o hormônio sexual progesterona, modulam um grande número de processos biológicos em células animais através da ligação a receptores intracelulares específicos e a ativação de vários genes (Truss et al, 1993, Beato et al, 1996).

Os progestágenos incluem o hormônio progesterona natural e numerosos compostos sintéticos. São bastante lipofílicos e difundem-se livremente nas células, onde se ligam ao receptor da progesterona (Figura 1). O receptor da progesterona é um fator de transcrição nuclear ativado pelo ligante, que interage com um elemento responsivo a progesterona presente em genes-alvo para regular a expressão dos mesmos (Hardman et al, 1999).

De acordo com a literatura, em situações como gravidez ou uso do contraceptivo injetável Medroxiprogesterona, por pacientes com anemia falciforme, os níveis de HbF aumentam, ocasionando dessa maneira a melhora do quadro clínico das pacientes com anemia falciforme (Ceulaer et al, 1982, Lavrijsen et al, 1984). Essas informações sugerem o envolvimento dos hormônios sexuais na determinação do conteúdo de HbF no sangue de adultos, sob determinadas situações (Ceulaer et al, 1982, Lavrijsen et al, 1984).

Os mecanismos moleculares pelos quais esses compostos produzem aumento nos níveis de HbF ainda não foram esclarecidos. No entanto, tais informações seriam de grande auxílio na formulação de novas drogas com baixa toxicidade, bem como uma maior eficácia na estimulação da síntese de HbF (Smith et al, 2000).



**Figura 1:** Representação esquemática do mecanismo de ação dos hormônios esteróides. Os hormônios esteróides, sendo lipofílicos, são transportados por proteínas carreadoras no sangue. Após a dissociação desses carreadores, tais hormônios se difundem através da membrana celular e se ligam a receptores específicos no citoplasma ou núcleo. O complexo hormônio-receptor então se liga ao DNA nuclear para alterar a transcrição de genes específicos.

Sabe-se que a regulação da expressão da HbF está relacionada a elementos ativos ligados em “cis” ao complexo da globina  $\beta$ , assim como à presença de proteínas regulatórias do processo de transcrição gênica, denominadas fatores de transcrição (elementos em “trans”).

Os elementos ligados em “cis” constituem sequências nucleotídicas que funcionam como sítio de reconhecimento dos fatores de transcrição, e geralmente estão localizados nas regiões promotoras da expressão dos genes ou em outras regiões regulatórias distais (Orkin, 1995).

O estudo da modulação da expressão gênica pelos elementos ligados em “trans” parece ser uma linha de investigação promissora. Os fatores de transcrição pertencem a uma classe de proteínas, com papel muito importante na regulação da expressão gênica (Forget et al, 2001). Durante a eritropoese, os fatores de crescimento e diferenciação induzem uma complexa cascata de sinais, que são traduzidos pelos fatores de transcrição em mudanças na expressão dos genes eritróides, e consequentemente controlam a proliferação celular e o amadurecimento terminal das células (Shivdasani et al, 1996).

Na linhagem de células eritróides, vários fatores de transcrição vêm sendo identificados, os quais podem desempenhar papel importante na regulação dos genes relacionados à diferenciação terminal das células vermelhas do sangue (Pevny et al, 1995). Esses fatores incluem os membros da família GATA (GATA-1 e GATA-2) da classe de proteínas “zinc finger” e o fator de transcrição NF-E2 da classe de proteínas “leucine zipper” (Pevny et al, 1995, Cunningham et al, 1996, Rath et al, 1997, Pope et al, 2000).

Através de vários experimentos com genes deletados (“gene knockout”) descritos na literatura, acredita-se que o fator de transcrição GATA-1 desempenhe um dos papéis mais importantes na regulação gênica durante o desenvolvimento das células eritróides (Orkin, 1992, Pevny, et al, 1995, Takahashi et al, 1998). Esta proteína possui pelo menos uma região de ligação ao DNA nos elementos reguladores de todos os genes expressos na linhagem eritróide, atestando sua importância para o desenvolvimento e função das células vermelhas (Stamatoyannopoulos et al, 1994, Weiss et al, 1997). A ausência do fator de transcrição GATA-1 (Figura 2) nos precursores eritróides faz com que a maturação seja interrompida na fase de proeritroblasto e as células sofram apoptose (Tsang et al, 1997, De Maria et al, 1999, Orkin et al, 1999).

O fator de transcrição GATA-2, que também pertence à família GATA, parece desempenhar papel crítico na manutenção ou expansão das células hematopoéticas

multipotenciais jovens, mas é dispensável à maturação das células eritróides (Briegel et al, 1996, Shividasani, 1996, Tsai et al, 1997, Minegishi et al, 1998). Sua expressão não é observada em células eritróides maduras. Em cultura de células pode ser verificado a diminuição de sua expressão à medida que as células se diferenciavam e amadureciam (Tsai et al, 1997, Minegishi et al, 1998).

Diante dessas observações sugere-se que a expressão de GATA-2 está relacionada à proliferação celular e não à capacidade de diferenciação das células progenitoras hematopoéticas, e a supressão da atividade de GATA-2 pode ser essencial à diferenciação hematopoética (Minegishi et al, 1998, Persons et al, 1998, Ikonomi et al, 2000).

O envolvimento de GATA-2 na expansão das células hematopoéticas mais jovens contrasta com a necessidade do fator de transcrição GATA-1 na maturação terminal eritróide. A expressão recíproca desses fatores durante o desenvolvimento eritróide é paralelo à mudança da proliferação para a maturação terminal. Embora os papéis desses fatores sejam divergentes, GATA-1 e GATA-2 são co-expressos durante muito tempo do desenvolvimento eritróide e hematopoético (Tsai et al, 1997).

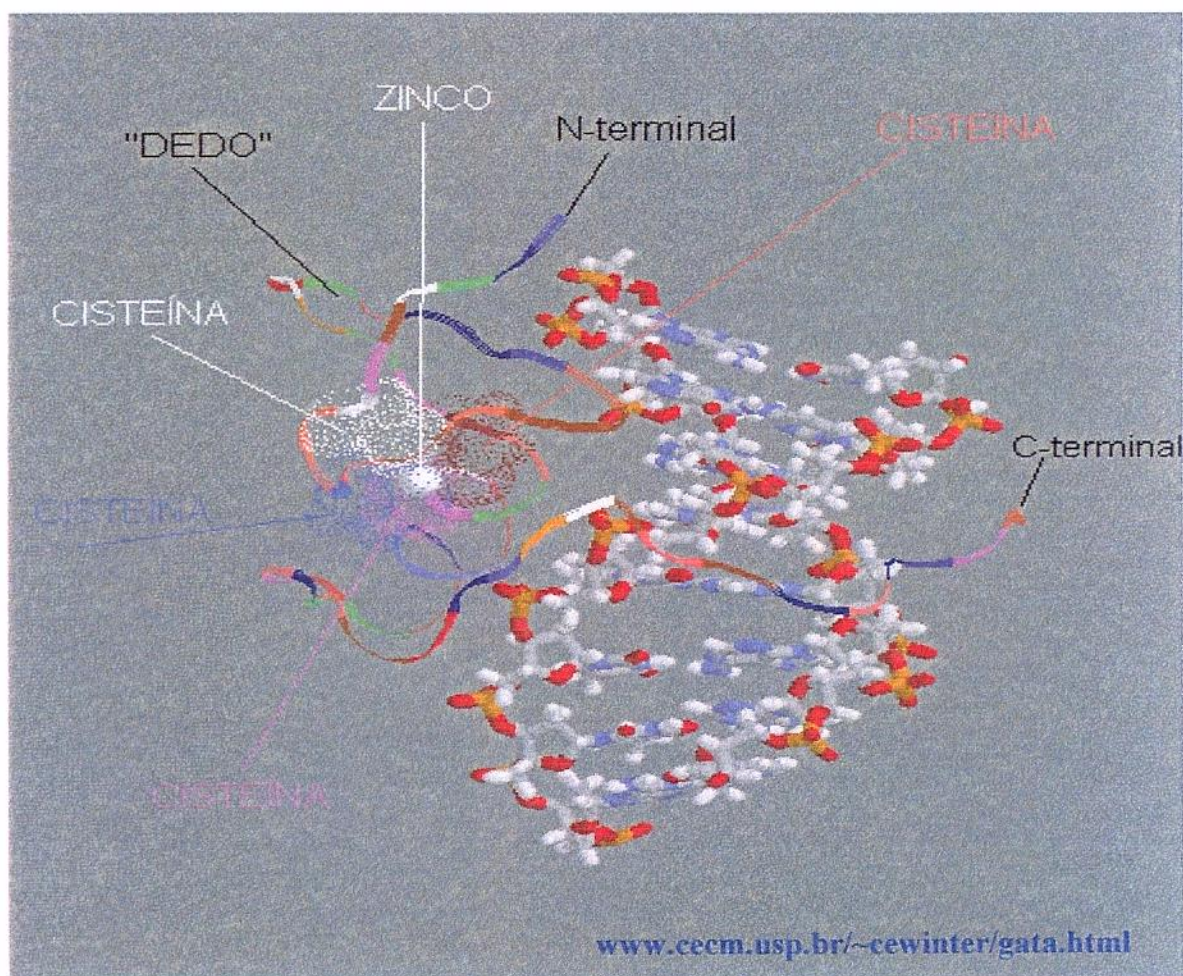
O fator de transcrição NF-E2, constituído por duas subunidades proteicas denominadas p45 e p18, parece estar envolvido em três aspectos da síntese da hemoglobina, ou seja, faz parte da regulação transcricional das cadeias de globina, está envolvido na biossíntese do heme e controla o metabolismo do ferro (Stamatoyannopoulos et al, 1994, Andrews, 1999, Toki et al, 2000).

O mecanismo de ação deste fator de transcrição ainda não está bem esclarecido, mas parece que possui a capacidade de criar sítios hipersensíveis e acessíveis à ligação de outros fatores, em sítios específicos na região controladora do locus (LCR), através da abertura e remodelamento da cromatina (Armstrong et al, 1996, Blank et al, 1997).

O padrão de expressão de NF-E2 é paralelo ao de GATA-1. Ambos são expressos em linhagens de células eritróides. Os sítios funcionais de NF-E2 são muito próximos aos de GATA-1. Esses dois ativadores transcricionais podem interagir estabelecendo um alto nível de expressão dos genes da globina nas células eritróides (Stamatoyannopoulos et al, 1994).

Elucidar os papéis de cada um desses fatores na regulação da expressão dos genes da  $\gamma$ -globina bem, como entender os mecanismos envolvidos na resposta aos agentes farmacológicos

que elevam os níveis de HbF é um problema bastante complexo. Acredita-se que os maiores efeitos dessas drogas sejam em nível transcricional. É possível que a HU, a progesterona e outros agentes farmacológicos possam induzir direta ou indiretamente a ligação dos fatores de transcrição ao promotor dos genes da  $\gamma$ -globina / e ou  $\beta$ -globina (Rachmilewitz, 1995).



**Figura 2:** Figura ilustrando parte de um fator de transcrição envolvido na expressão dos genes de globina durante o desenvolvimento de mamíferos. Por reconhecer o motivo GATA no DNA ele foi denominado fator de transcrição eritróide GATA-1. O fator GATA pertence à família dos fatores “zinc finger” (dedo de zinco). Este nome vem do fato deles possuírem um domínio na proteína delimitado por 4 cisteínas cujos grupos  $-SH$  mantêm um átomo de zinco por meio de valências de coordenação. Como pode ser visto na figura a região C-terminal é responsável pela interação com o DNA (GATA).

## ***Objetivos***

1- Caracterizar a expressão dos fatores de transcrição GATA-1, GATA-2 , NF-E2 e do gene  $\gamma$ -globina em células progenitoras eritróides tratadas com HU e progesterona através do sistema de cultura líquida em duas fases.

2- Quantificar os níveis de HbF nas células eritróides, tratadas com HU e progesterona.

3- Verificar os efeitos da HU e progesterona sobre a diferenciação e maturação das células eritróides, através da análise dos marcadores de superfície celular glicoforina e receptor de transferrina.

4- Foi também objetivo deste trabalho implantar a técnica de diferenciação *in vitro* de células eritróides.

## ***Métodos***

## **Proliferação e Maturação dos Progenitores Eritróides Humano em Cultura Líquida de Duas Fases**

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de “buffy coat” (Fibach et al, 1989) de doadores saudáveis e isoladas por centrifugação num gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/ml-Sigma) a 1.500 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. A camada de células da interface foi coletada em tubo de centrífuga estéril e lavada em meio de cultura “Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium” (IMDM; Gibco) por três vezes através de centrifugações a 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O botão de células foi ressuspenso em meio de cultura IMDM e a verificação da quantidade e viabilidade das células foi realizada através de câmara de “Neubauer” com corante azul de trypan. As células foram cultivadas numa densidade de aproximadamente  $1 \times 10^6$  céls/ml em meio de cultura IMDM (Gibco) suplementado com 20% soro bovino fetal inativado e estéril (Gibco), 10% de meio condicionado coletado da linhagem de células de carcinoma da bexiga 5637 e 1 µg/ml de ciclosporina A (Sandoz). As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera úmida com de 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias (Figura 3).

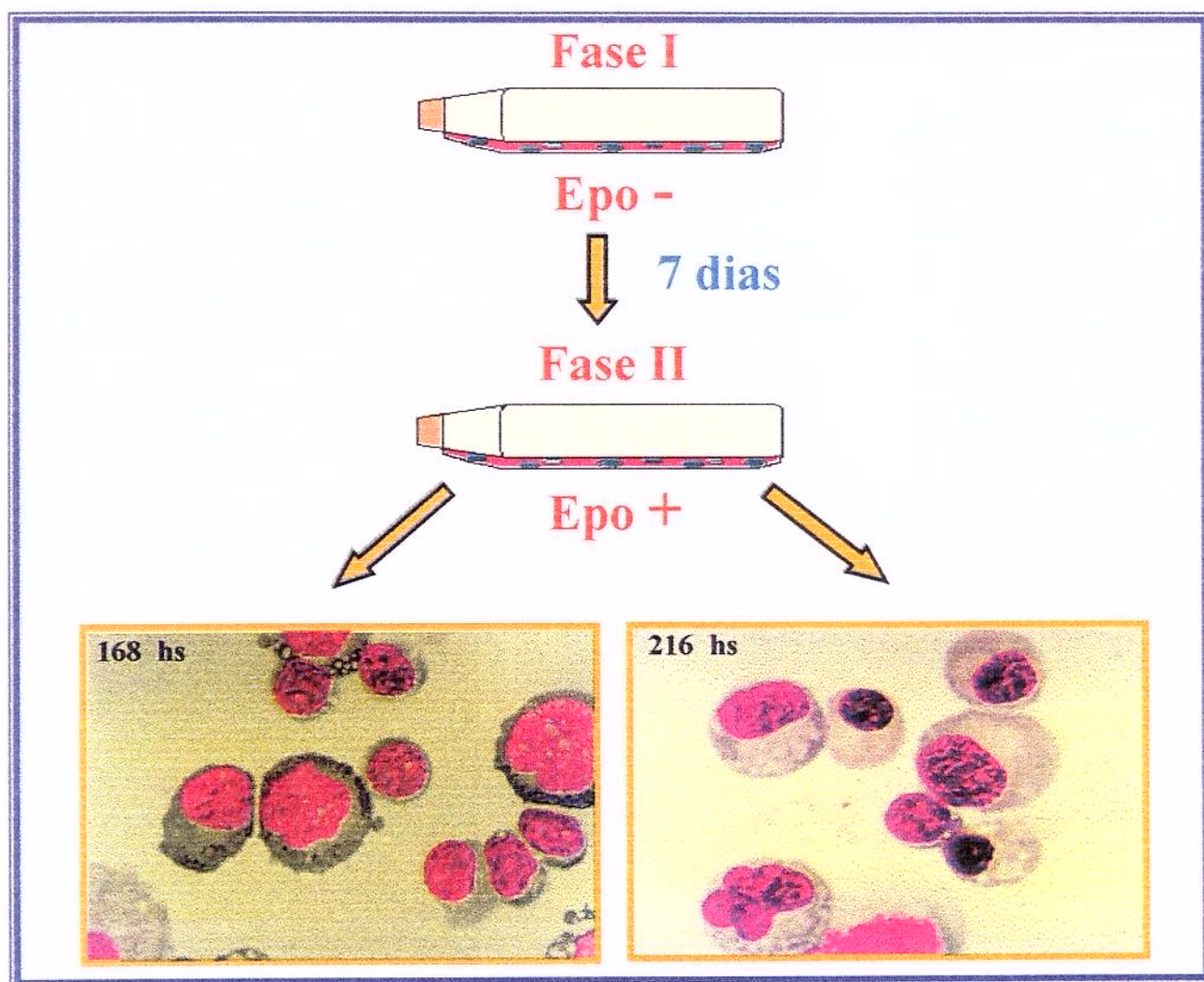
Após esse período nessa cultura primária, as células não aderentes foram coletadas e lavadas em meio de cultura IMDM através de centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram quantificadas por exclusão das células mortas em câmara de “Neubauer” com azul de trypan.

As células foram colocadas novamente em cultura, em placas de 6 “wells” numa densidade de  $0.5 \times 10^6$  céls/ml, contendo meio IMDM (Gibco) fresco suplementado com 30% de soro bovino fetal (Gibco), 1% de soro albumina bovina deionizada (BSA-Sigma),  $10^{-5}$  mol/L 2-mercaptoetanol (Sigma), 1,5 mmol/L de glutamina (Gibco),  $10^{-6}$  mol/L de dexametasona (Sigma), 300 µg/ml de transferrina saturada com ferro (Sigma), 1 U/ml de eritropoietina recombinante (Cilag), 5ng/ml de “Stem Cell Factor” (SCF-Calbiochem), 2,5 µg/ml de fungizone (Gibco), 50 µg/ml de estreptomicina (Gibco) e 25 µg/ml de gentamicina (Gibco). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>. Todos os dias a viabilidade das células foi verificada por exclusão das mortas após coradas com azul de trypan e a verificação da morfologia foi feita através de preparações de “citospin” coradas com

“Leishman”. Amostras de células também foram coletadas diariamente para extração de RNA total.

Após 4 dias de incubação na fase II, para remoção dos linfócitos, as células foram colhidas e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi reservado. O botão de células foi ressuspensão em 1 ml do sobrenadante, colocado em 2ml de Percoll (Sigma- densidade 1.0585 g/ml) e centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. A camada superior contendo os proeritroblastos foi coletada e ressuspensa no sobrenadante recuperado e prosseguiu-se à incubação por aproximadamente mais 7 dias.

Em nosso trabalho, o hormônio progesterona (Sigma) foi adicionado à cultura desde o início da fase II, numa concentração de  $10^{-7}$ M. Coletas diárias de células foram realizadas para verificação da morfologia e viabilidade celular, extração de RNA total e realização da técnica de citometria de fluxo. O mesmo foi realizado para as células tratadas com a HU (Sigma), cuja adição ocorreu após 3 dias (72 hs) da adição de eritropoietina, numa concentração de 80  $\mu$ mol/L. As concentrações utilizadas de progesterona e HU, em nosso trabalho, foram determinadas com base na literatura (Lavrijsen et al, 1984, Fibach et al, 1993) e após análise de experimentos independentes com diferentes concentrações dos dois agentes farmacológicos. Essas concentrações foram analisadas tendo em vista a não perturbação do processo de proliferação e sobrevivência das células, bem como a manutenção de suas características genéticas. Também foram analisadas de acordo com a capacidade de influenciar ou não na expressão dos genes em estudo.



**Figura 3:** Método de cultura líquida em duas fases utilizado no cultivo de células precursoras eritróides humanas. As células mononucleares são isoladas do sangue periférico humano e cultivadas por 7 dias na fase I em meio de cultura contendo soro bovino fetal, ciclosporina A e fatores de crescimento do meio condicionado coletado da linhagem de células 5637. As células são então lavadas e colocadas na fase II em meio de cultura contendo eritropoietina. Durante os próximos 10-14 dias as células continuam a proliferar e amadurecer até normoblastos ortocromáticos. Células coletadas com 168hs e 216hs da fase II. Coloração Leishman (1000x).

## **Preparo do meio condicionado da linhagem de células 5637**

As células da linhagem 5637, provenientes de carcinoma de bexiga humano, são células secretoras de citocinas capazes de promover o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos. O meio condicionado de 5637 possui altas concentrações de G-CSF, GM-CSF e estão presentes em menores concentrações embora efetivas os fatores de crescimento IL-1, M-CSF e SCF. Em razão disso, o meio condicionado é muito utilizado para suportar *in vitro* o crescimento de células hematopoiéticas normais e malignas e de linhagens de células (Quentmeier et al, 1997).

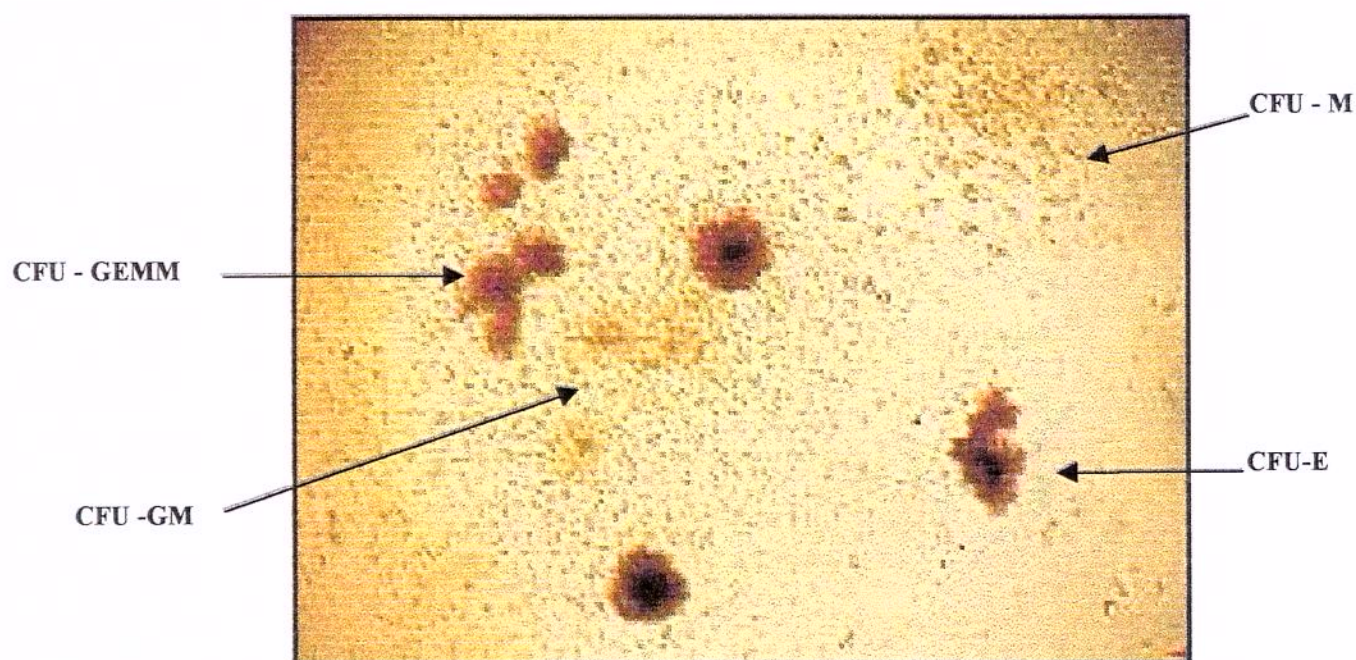
A linhagem de células 5637 que usamos em nosso laboratório foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Geralmente são cultivadas em meio de cultura IMDM suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e estéril em ambiente úmido e com 5% de CO<sub>2</sub>. Crescem rapidamente formando uma monocamada aderente em garrafa plástica própria para cultura de tecidos. A cada confluência, ou seja, quando as células preenchem cerca de 80 % a 90% da superfície da garrafa, são repicadas serialmente por tripsinização na presença de EDTA.

Para a coleta do meio condicionado, a linhagem de células 5637 foi cultivada em meio IMDM suplementado com 5% de soro bovino fetal numa densidade de  $1 \times 10^6$  céls/ml por 7 dias. Após esse período, as células foram tripsinizadas e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm à temperatura ambiente. As células foram novamente colocadas em cultura para produção de mais meio condicionado e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente para a retirada de restos celulares. O meio condicionado foi passado através de um filtro de 0.22  $\mu$ m e estocado a -20°C (Weinberg et al, 1993, Quentmeier et al, 1997).

## **Titulação do sobrenadante de 5637**

O meio condicionado das células 5637 foi titulado através de uma curva dose-resposta em cultura de medula óssea humana normal (diluições de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32). As células mononucleares foram isoladas em gradiente de separação Ficoll-Hypaque por centrifugação a

1500 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. As células da interface foram coletadas e lavadas por mais duas vezes em meio IMDM através de centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. A quantificação das células foi realizada em câmara de “Neubauer ” com azul de trypan e as mesmas foram ressuspensas numa combinação de 30% de meio IMDM 2 vezes concentrado, 50% de agar (Bacto-agar Difco) e 20% de soro bovino fetal. Volumes de 2ml dessa mistura contendo  $5 \times 10^5$  céls foram distribuídos por toda a superfície de uma placa de Petri contendo o estímulo apropriado e deixou-se gelificar. Foram feitas várias diluições do meio condicionado de 5637. As culturas foram incubadas por 14 dias a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período contou-se o nº de colônias em microscópio invertido (Perlingeiro, 1997) (Figura4).



**Figura 4:** Aspecto microscópico de diferentes tipos de colônias formadas a partir de células progenitoras, obtidas de doadores de medula óssea. Cultura realizada com o objetivo de titular o meio condicionado obtido de células da linhagem 5637.

### Extração de RNA total, quantificação e eletroforese

O RNA total das amostras de células em cultura foi extraído com o reagente Trizol (Gibco), uma solução monofásica de fenol e guanidina isocianato. Ao botão de células contendo de  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células foi acrescentado 1 ml de Trizol e homogeneizou-se a amostra através de várias pipetagens até que se tornasse bastante fluida.

Durante a homogeneização, o reagente Trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares.

Após a homogeneização, no caso das células da cultura líquida de duas fases, acrescentou-se juntamente com o reagente Trizol, 250 µg de glicogênio, que é um carreador de moléculas e muito utilizado na extração de RNA total de pequenas quantidades de amostras.

A solução de células com Trizol foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Acrescentou-se às amostras homogeneizadas 200 µl de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) que foram em seguida vigorosamente agitadas. Nova incubação foi realizada por mais 3 minutos à temperatura ambiente e as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.500 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C. A fase aquosa, onde fica o RNA, foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga e acrescentou-se 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA. A solução foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 13.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1 ml de etanol 75% ao RNA precipitado. Novamente a amostra foi centrifugada a 11.500 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado.

As amostras de RNA total foram ressuspensas em água com dietilpirocarbonato (DEPC) e incubadas por 10 minutos a 55°C para inativação de alguma RNase restante. As amostras de RNA foram estocadas a -80°C.

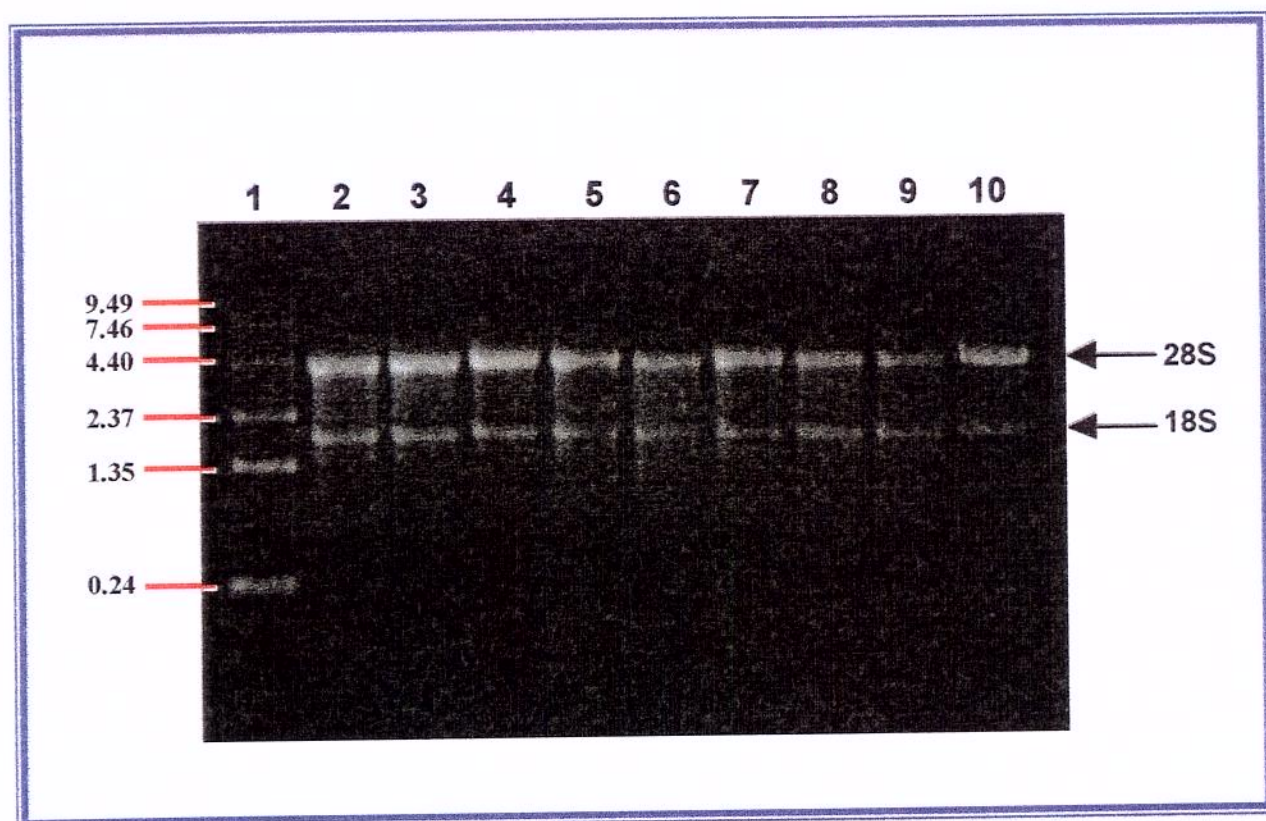
A quantificação das amostras de RNA foi realizada através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Para uma amostra de RNA ser considerada extremamente pura a relação  $A_{260}/A_{280}$  deve variar de 1.7 a 2.0 (Tabela 1).

A integridade e qualidade das amostras de RNA total extraídas das culturas em questão foi verificada através da eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% com formaldeído. A

observação dos RNAs ribossomais eucarióticos 28S e 18S numa razão próxima de 2:1 foi indicativa de que não houve degradação significativa das amostras de RNA (Figura 5).

**Tabela 1:** Quantificação do RNA total extraído das células em cultura líquida de 2 fases

| <b>Amostra</b> | <b>260nm</b> | <b>280nm</b> | <b>260/280nm</b> | <b>Pureza</b> | <b>µg/µl</b> |
|----------------|--------------|--------------|------------------|---------------|--------------|
| 24 hs          | 1746         | 0966         | 1532             | 85%           | 1,18         |
| 48 hs          | 1480         | 0939         | 1588             | 89%           | 1,17         |
| 72 hs          | 0430         | 0343         | 1252             | 69%           | 0,34         |
| 96 hs          | 1952         | 1111         | 1760             | 97%           | 1,56         |
| 120 hs         | 2210         | 1259         | 1764             | 98%           | 1,76         |
| 144 hs         | 2361         | 1391         | 1703             | 94%           | 1,88         |
| 168 hs         | 0606         | 0461         | 1313             | 72%           | 0,48         |
| 192 hs         | 1902         | 1074         | 1792             | 99%           | 1,5          |
| 216 hs         | 1904         | 1152         | 1665             | 92%           | 1,51         |
| 240 hs         | 1596         | 0977         | 1651             | 91%           | 1,25         |
| 268 hs         | 1643         | 0897         | 1834             | 100%          | 2,62         |



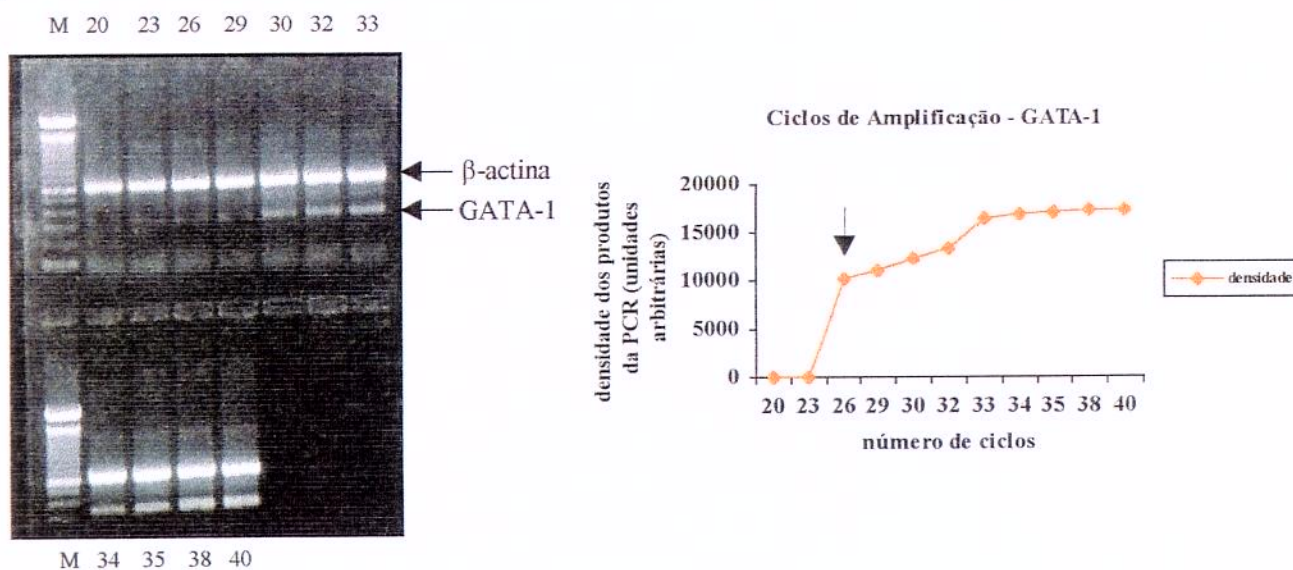
**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% com formaldeído, mostrando a qualidade do RNA total extraído (3 $\mu$ g) da células em cultura líquida de duas fases. Na linha 1 encontramos o marcador Ladder para RNA 0.24-9.5 Kb, e nas linhas de 2 a 10 temos o RNA total das amostras de células coletadas em 24, 48, 96, 120, 144, 192, 216, 240 e 268 horas da cultura respectivamente. A seta superior indica a banda 28S e a inferior a banda 18S do RNA total.

## **RT-PCR semiquantitativo para verificação da expressão dos fatores de transcrição envolvidos no crescimento e diferenciação da linhagem eritróide**

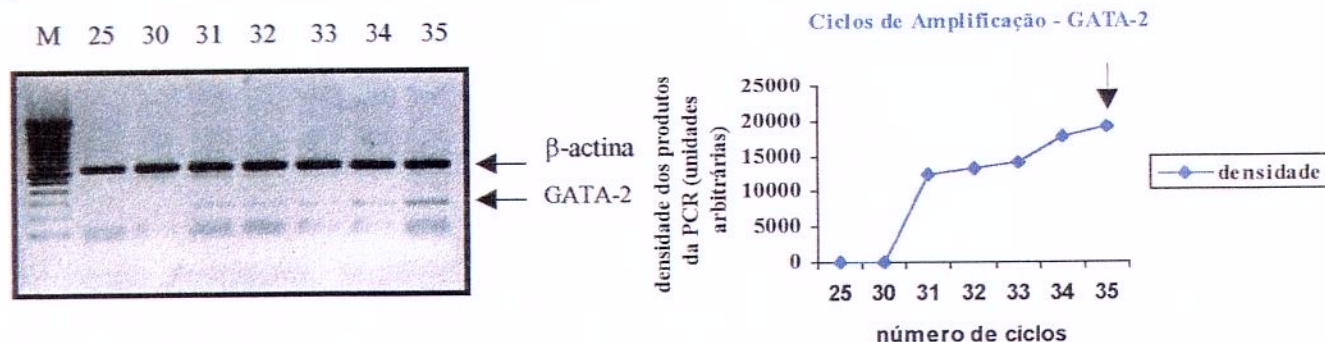
As amostras de RNA total extraídas das células em cultura líquida de duas fases foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) numa reação de volume final de 30 µl, contendo 5 µg do RNA total, 15U da enzima transcriptase reversa AMV (USB) que catalisa a reação de extensão da fita complementar iniciada a partir da hibridização do “primer” oligo (dT) com a cauda poliadenilada do RNA, 5 µl de oligo (dT)<sub>12-18</sub> 230ng/ml (Promega), 30U de inibidor de RNase (RNasin-Promega), 2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 6 µl do tampão de reação 5x contendo 250mM Tris-HCl (pH8.3), 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 250mM NaCl, 5 mM DTT. Essa mistura foi incubada por 90 minutos a 42°C e 30 minutos a 52°C. As amostras de RNA foram desnaturadas a 65°C por 5 minutos antes do uso como molde na reação, para eliminar possíveis estruturas secundárias. As reações de transcrição foram realizadas com um controle negativo, ou seja, uma reação normal sem a enzima transcriptase reversa para verificação de contaminação por DNA genômico.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador automático (Perkin Elmer Cetus, Norwalk,CT) bem como as reações de transcrição reversa. Para determinar as condições apropriadas da reação, ou seja, determinar a amplificação dentro do limite ascendente (fase exponencial), onde possamos avaliar com uma certa segurança a expressão do gene a ser estudado, testes preliminares foram realizados e consistiram de reações com diferentes números de ciclos e concentrações de amostras de cDNA. Determinou-se para GATA-1 26 ciclos, NF-E2 30 ciclos, GATA-2 35 ciclos e  $\gamma$ -globina 20 ciclos (Figuras 6 e 7).

1)

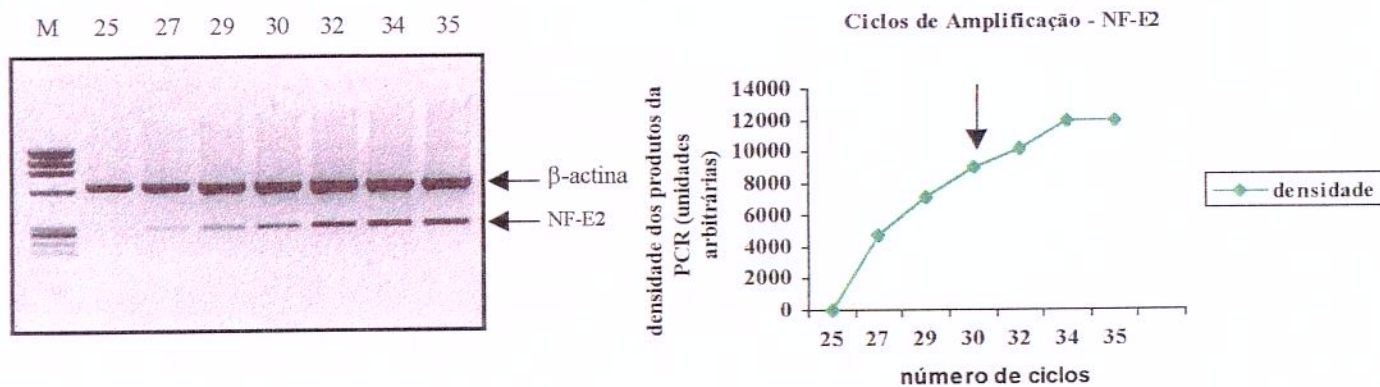


2)

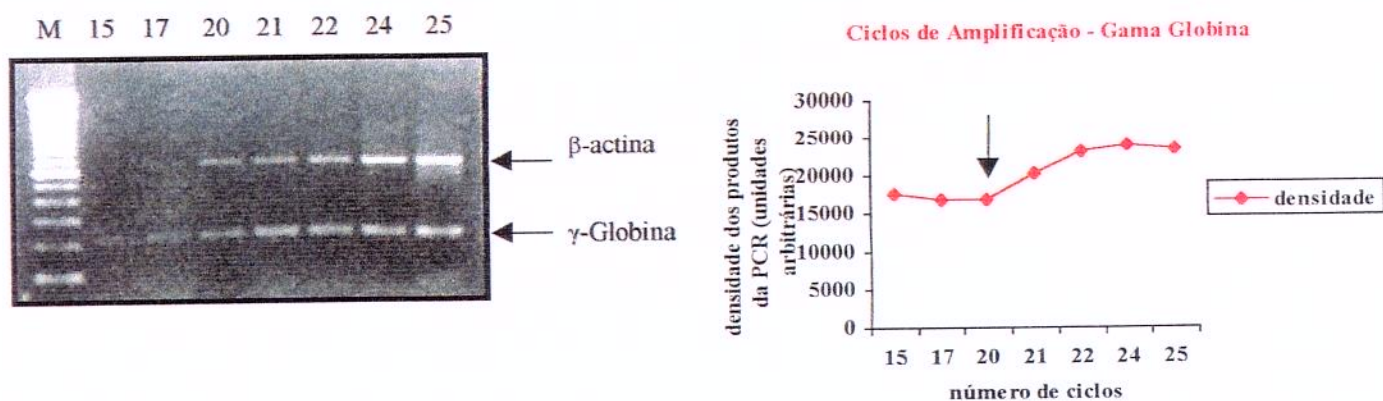


**Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose 1,6% mostrando os produtos de RT-PCR das amostras de cDNA de 2 fases obtidos através de monitoração da cinética da reação. (1) Amostras coletadas com 20, 23, 26, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 38 e 40 ciclos para o fator de transcrição GATA-1. (2) Amostras dos produtos de PCR coletados com 25, 30, 31, 32, 33, 34 e 35 ciclos para o fator de transcrição GATA-2.

1)



2)



**Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose 1,6% mostrando os produtos de RT-PCR das amostras de cDNA de 2 fases obtidos através de monitoração da cinética da reação. (1) Amostras dos produtos de PCR coletadas com 25, 27, 29, 30, 32, 34 e 35 ciclos para o fator de transcrição NF-E2. (2) Amostras dos produtos de PCR coletadas com 15, 17, 20, 21, 22, 24 e 25 ciclos para o gene  $\gamma$  globina.

Aliquotas de cDNA (1 µl) foram amplificadas por PCR numa reação de volume final de 50 µl contendo 1mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0.8 µl de cada “primer” (10 pmol), 5 µl do tampão de reação 10x contendo 75nM Tris-HCl (pH9.0), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 1.5U da enzima Taq polimerase (Gibco). As amostras foram desnaturadas inicialmente por 5 minutos a 94°C e em seguida submetidas a 20-35 ciclos de amplificação com desnaturação de 30 segundos a 94°C, anelamento de 45 segundos a 56°C-58°C e extensão de 45 segundos a 72°C seguidos de extensão final prolongada por 7 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,5% e visualizados sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo. As reações de PCR também foram realizadas com um controle negativo, onde no lugar da amostra foi acrescentado somente água, para verificação de algum contaminante da reação.

Os produtos de PCR foram quantificados através de densitometria utilizando-se o programa versão 3.2 do EagleSight Stratagene (La Jolla, CA).

O gene  $\beta$ -actina foi utilizado como um controle interno endógeno de expressão constitutiva, cujo resultado da quantificação foi usado para normalizar os resultados obtidos do gene de interesse, corrigindo assim diferenças nas concentrações de cDNA utilizadas na reação de PCR e o efeito da presença de inibidores de amplificação. Os resultados foram apresentados como quantidades relativas dos cDNAs de GATA-1, GATA-2 NF-E2 e  $\gamma$ -globina em relação ao cDNA de  $\beta$ -actina.

## **Citometria de Fluxo para quantificação de células contendo HbF e análise do padrão de expressão dos marcadores Glicoforina A e receptor de Transferrina**

A técnica de citometria de fluxo consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, com um anticorpo marcado com um fluocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocinato (FITC). Este fluocromo ao ser estimulado por um feixe de laser emite um fóton que é captado por sensores no aparelho. O citômetro de fluxo faz análises tanto qualitativas (quanto de certo produto é expresso por célula) como quantitativas (quantas células expressam este produto), da mesma amostra (Owens et al, 1995).

### ***Procedimentos***

#### **Método para marcação intracitoplasmática**

Para a marcação da HbF utilizamos o Kit Cytofix / Cytoperm Plus (Pharminutosgen), onde as células foram fixadas e permeabilizadas com 250 µl da solução cytoperm / cytofix por 20 minutos a 4° C e lavadas por 2 vezes com 1 ml da solução Perm / Wash 1X. Essa solução mantém as células permeáveis. Para a marcação intracelular, as células fixadas e permeabilizadas foram ressuspensas em 50 µl da solução Perm / Wash contendo 2.5 µl do anticorpo para anti-HbF (Caltag) e num segundo tubo 5 µl do isotipo controle não relacionado (anticorpo mouse IgG-1- Caltag). As células com o anticorpo foram incubadas a 4° C por 30 minutos no escuro, lavadas 2 vezes com a solução Perm /Wash (1ml) e ressuspensas em 1ml da solução de PBS contendo 1% de soro bovino fetal inativado e 0,09% de azida sódica. As células marcadas foram conservadas a 4° C no escuro até o momento da aquisição no citômetro de fluxo (FacsCalibur – Becton Dickinson).

#### **Método para marcação de superfície celular**

Para a dupla marcação dos antígenos de superfície celular glicoforina A e receptor de transferrina (CD71), misturamos 100 µl de suspensão celular contendo  $1 \times 10^6$  células com 5 µl de do anticorpo anti-glicoforina A conjugado com PE (Dako) e 5 µl do anticorpo anti-receptor de transferrina conjugado com FITC (Dako) e incubamos no escuro a 4°C por 30 minutos. As

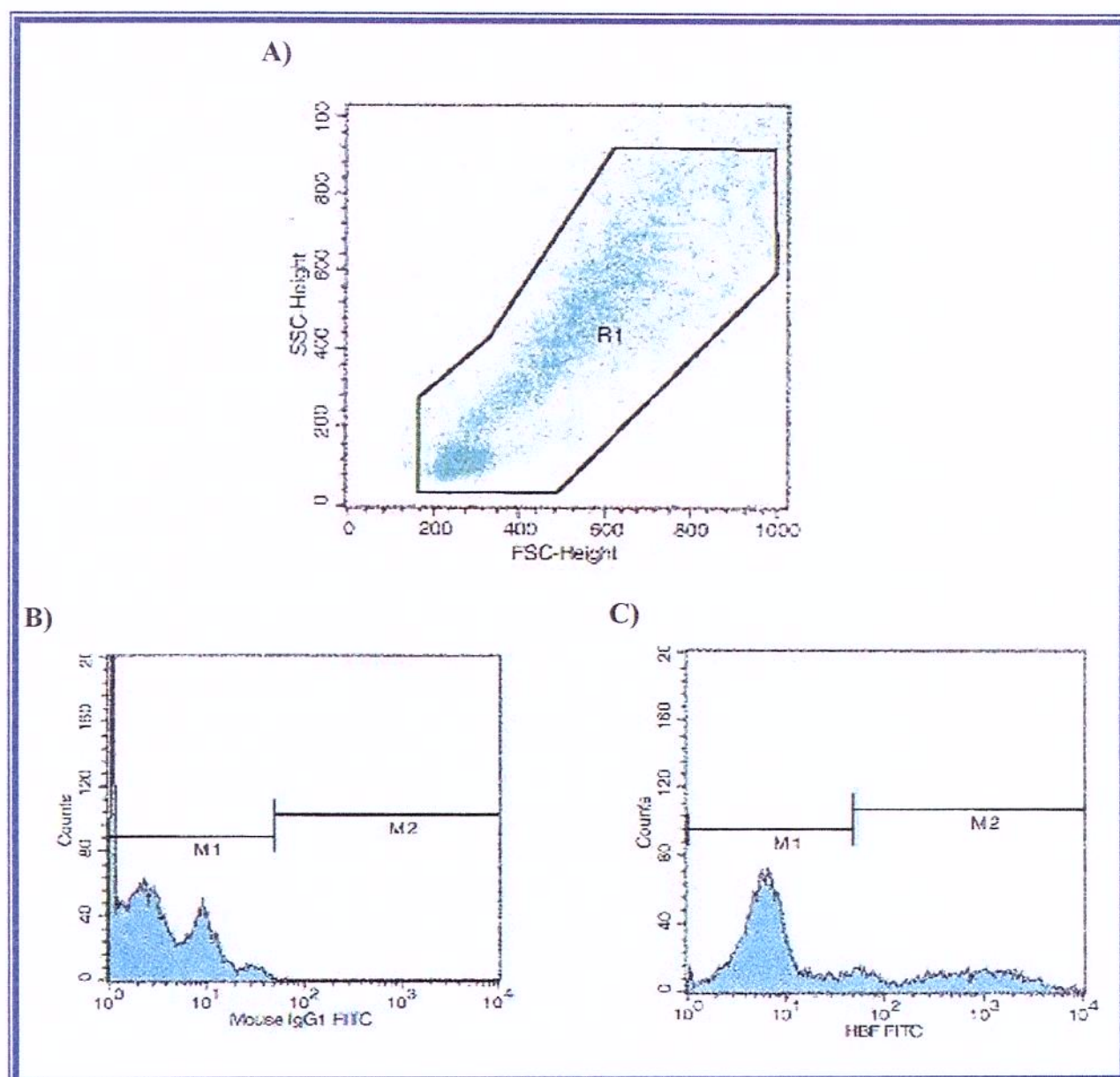
células, devidamente marcadas, foram lavadas com uma solução de PBS, contendo BSA e azida sódica, fixadas com solução de paraformaldeído 1x e conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição no citômetro.

### **Aquisição dos dados no citômetro**

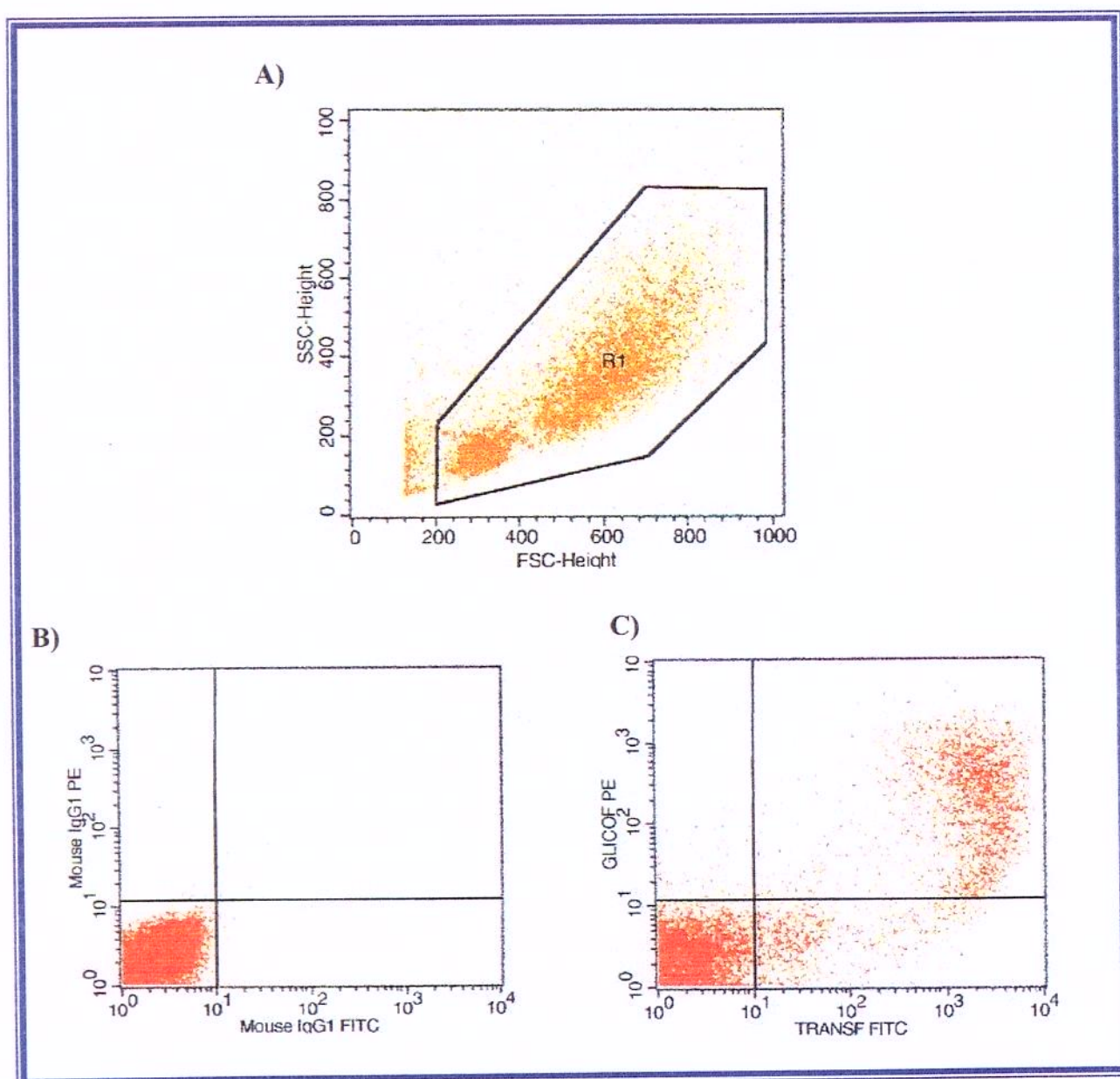
Para a análise dos dados relacionados as células tratadas com progesterona ou com hidroxiuréia, e as células sem tratamento, marcadas com o anticorpo para HbF, obteve-se um gráfico de pontos Tamanho vs Granulosidade (FSC vs SSC). A partir deste gráfico foram desenhadas janelas para seleção de células eritróides e a análise foi realizada colocando-se os dados referentes ao isotipo controle, específico de cada anticorpo, em um histograma fluorescência vs número de células e os dados referentes ao anticorpo HbF em um outro histograma. Para sabermos qual foi o nível de expressão da proteína HbF nas células tratadas e não tratadas com hidroxiuréia ou progesterona foi descontada a fluorescência lida no histograma do isotipo controle da fluorescência lida no histograma da proteína (para a exclusão do “background”) (Figuras 8 A, B e C).

No caso da dupla marcação com os anticorpos para Glicoforina A e Receptor de Transferrina (CD 71), os dados selecionados através da janela desenhada no gráfico de pontos FSC vs SSC foram colocados em outros gráficos de pontos para a fluorescência do isotipo controle e dos marcadores de membrana Glicoforina A e Receptor de Transferrina. Assim, foi possível a análise dos dados pertinentes aos progenitores da linhagem eritróide tratados com progesterona ou HU em relação às células sem tratamento (Figuras 9 A, B e C).

Foram adquiridos, para ambas as análises, 10.000 eventos no total e os dados foram analisados através do programa de computador CellQuest.



**Figura 8:** A) Gráfico de pontos mostrando tamanho celular (FSC) por granulosidade (SSC); R1: área de seleção dos dados (Janela); B) e C) Histograma dos dados do anticorpo a ser estudado, a área M1, em C, representa o desconto do isotipo controle (Mouse IgG1) marcado no gráfico B; M2 representa a positividade real do anticorpo.



**Figura 9:** A) Gráfico de pontos mostrando tamanho celular (FSC) por granulosidade (SSC); R1: área de seleção dos dados (Janela); B) e C) Gráficos de pontos para fluorescência do isotipo controle (Mouse IgG1) e dos marcadores de membrana Glicoforina A e Receptor de Transferrina (CD71), respectivamente.

---

## **Análise Estatística**

### **Objetivos**

Descrever os grupos estudados (controle/progesterona e controle/hidroxiuréia).

Comparar cada medida: GATA-1, GATA-2, NF-E2 e  $\gamma$ -globina entre os grupos em cada tempo avaliado (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216hs).

### **Metodologia Estatística**

As variáveis do estudo rejeitaram a hipótese de normalidade sendo necessária a utilização de testes não paramétricos.

Para verificar a existência de diferença significativa entre os dois grupos em cada tempo foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas (Conover , 1971, Altmann, 1991).

O nível de significância adotado foi de 5%.

### **Programa Computacional**

S-Plus 2000 Professional Release 1 Copyright © 1988-1999 Math Soft, Inc.

## ***Resultados***

## Crescimento e Diferenciação de Progenitores Eritróides do Sangue Periférico Humano em Cultura Líquida de Duas Fases

### Titulação do meio condicionado de células da linhagem 5637

O meio condicionado obtido a partir da linhagem celular 5637 é capaz de promover o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos. A menor concentração de fator estimulador, na qual clones podem ser observados, atribui-se a concentração de 1 unidade (Perlingeiro, 1997). Em nossos resultados, essa concentração foi atingida com uma diluição de 1:32 do sobrenadante da linhagem 5637. O “plateau” de resposta supramáxima foi obtida numa diluição de 1:4 (Tabela 2) que corresponde a concentração de 6.4 unidades, a qual foi utilizada na cultura líquida de duas fases.

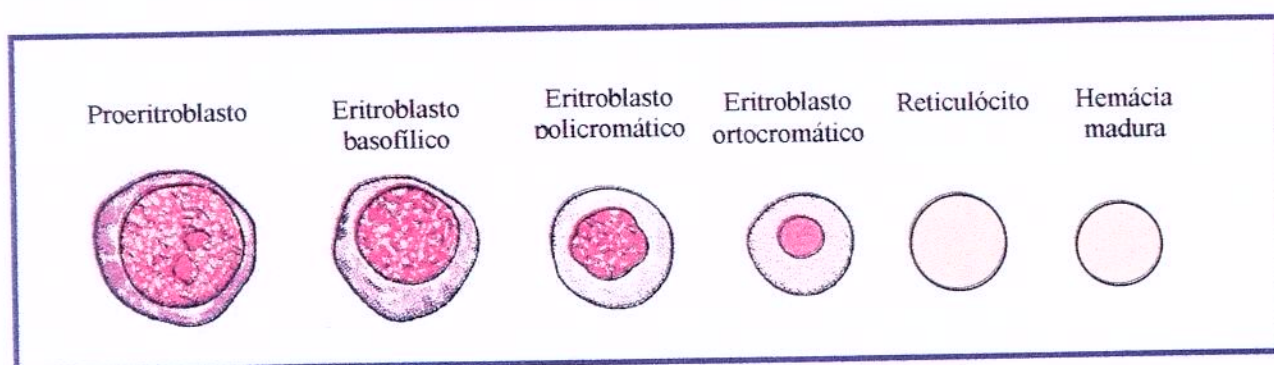
**Tabela 2:** Expressão em unidades dos resultados obtidos na titulação do sobrenadante da linhagem celular 5637 (média das duplicatas)

| Diluição do Meio 5637 | Nº Colônias CFU-C 14º dia | Unidades |
|-----------------------|---------------------------|----------|
| 1:1                   | 81                        | 3        |
| 1:2                   | 125                       | 4.6      |
| 1:4                   | 173                       | 6.4      |
| 1:8                   | 149                       | 5.5      |
| 1:16                  | 100                       | 3.7      |
| 1:32                  | 27                        | 1        |

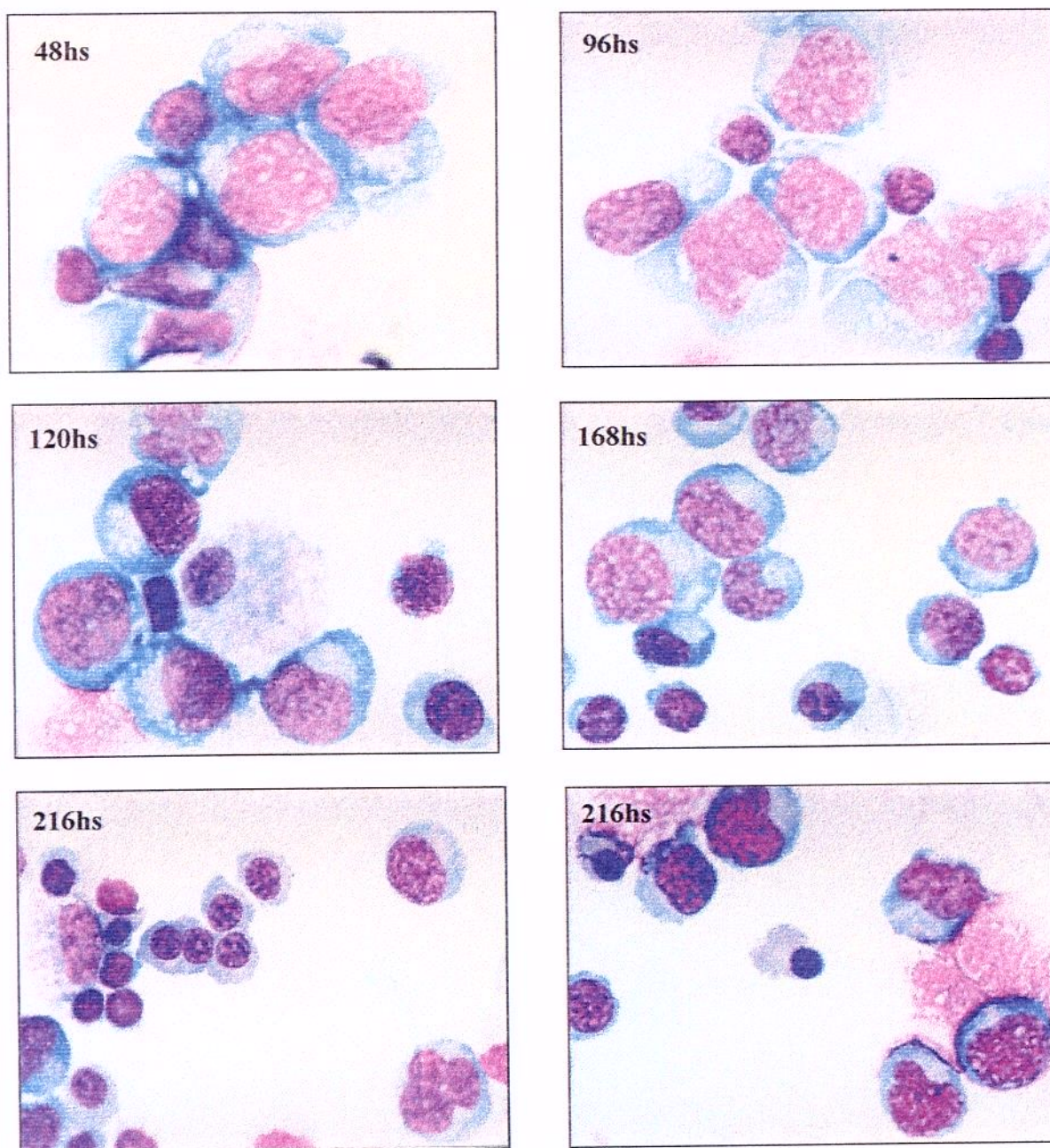
### Sistema de Cultura Líquida em Duas Fases

O sistema de cultura líquida em duas fases suporta o crescimento e maturação dos progenitores eritróides humanos e, por permitir a manipulação das condições e componentes da cultura, esse sistema pode facilitar a análise quantitativa da cinética do crescimento bem como a caracterização imunológica, molecular e bioquímica da célula eritróide em desenvolvimento (Fibach et al, 1989).

O procedimento envolve o cultivo de células mononucleares do sangue periférico num meio de cultura líquido contendo uma variedade de fatores de crescimento hematopoiético mas sem a presença de eritropoietina (EPO). Durante a primeira fase, os progenitores comprometidos com a linhagem eritróide mais jovens (BFU-E) proliferam e se diferenciam em progenitores mais maduros (CFU-E) que são dependentes de EPO. Na segunda fase, após remoção dos fatores hematopoiéticos, as células passam a ser cultivadas na presença de EPO que estimula somente os progenitores eritróides (Figura 10) a proliferar e amadurecer atingindo a fase de eritroblasto ortocromático, podendo-se chegar a observar a presença de alguns poucos eritrócitos anucleados (Figura 11) (Manor et al, 1997).



**Figura 10-** Esquema mostrando a diferenciação e maturação da linhagem eritróide



**Figura 11:** As células coletadas nos diferentes tempos da Fase II da cultura foram fixadas em lâminas de microscopia através de centrifugação (“citospin”) e coradas com Leishman (1000x). Observamos células da linhagem eritróide desde a fase de blastos até os primeiros estágios da expulsão do núcleo, o que caracteriza a fase final da maturação do eritrócito.

## **Expressão do mRNA dos Fatores de Transcrição GATA-1, GATA-2, NF-E2 e do gene $\gamma$ -Globina em células tratadas com a droga Hidroxiuréia.**

Através do uso combinado do sistema bifásico de cultura eritróide primária com a técnica de RT-PCR semiquantitativo nos foi possível caracterizar os efeitos da droga HU na expressão gênica da globina fetal ( $\gamma$ ) e dos fatores de transcrição GATA-1, GATA-2, NF-E2 nas células eritróides humanas obtidas de doadores de sangue, considerados indivíduos sem patologias (Figura 12). Esse procedimento nos possibilitou estudar vários aspectos da fisiologia eritróide bem como a modulação da síntese de HbF por esse agente farmacológico *in vitro*.

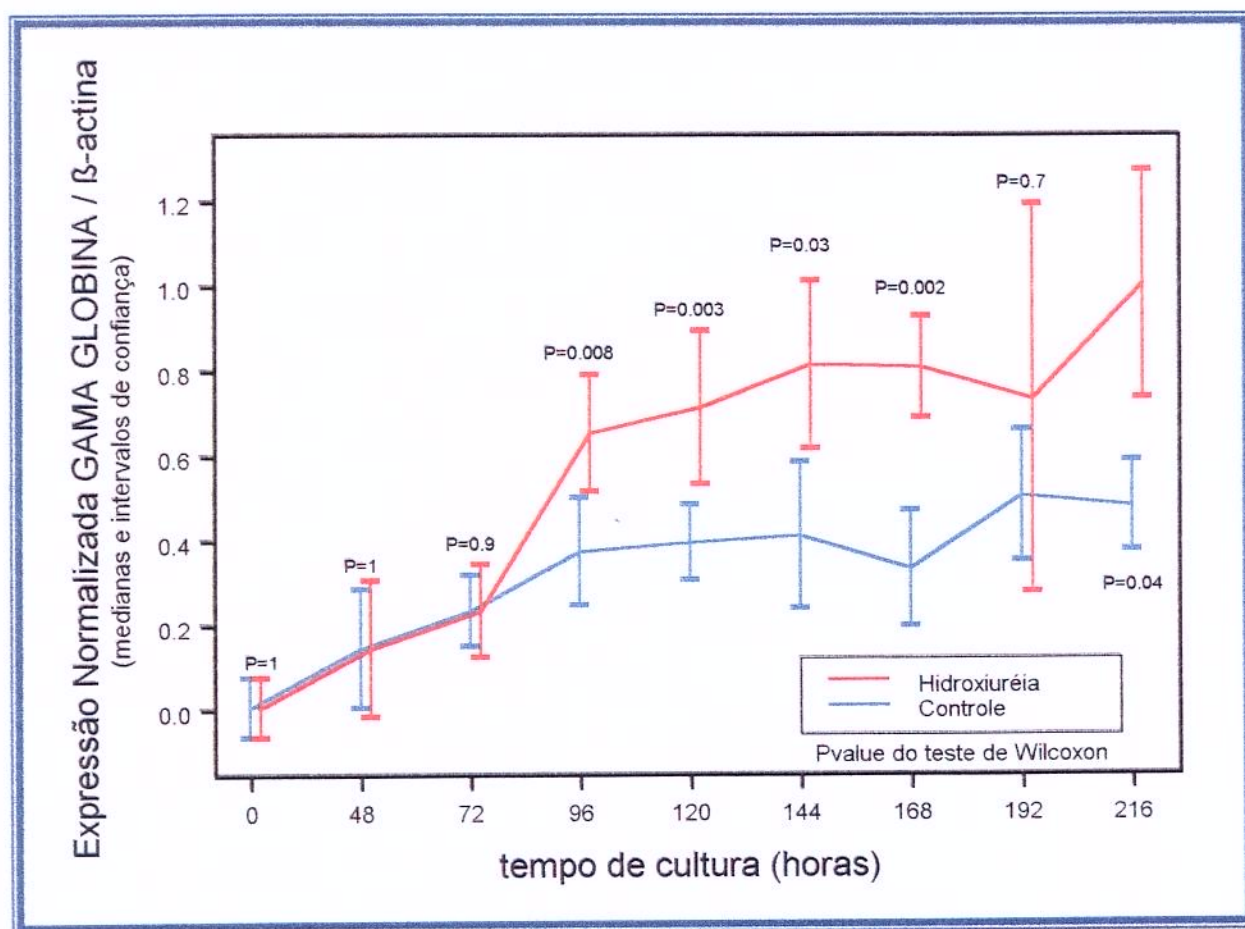
Os resultados da quantificação, por densitometria, dos produtos da RT-PCR, obtidos de 7 experimentos independentes, foram representados em gráficos, através dos quais foi possível avaliar o padrão de expressão dos fatores de transcrição e do gene  $\gamma$ -globina frente ao tratamento com a HU em comparação com células não tratadas (Gráficos 1, 2, 3, 4.).

A utilização da HU *in vitro* ocasionou aumento na expressão do mRNA do fator de transcrição GATA-1 bem como na expressão do mRNA de  $\gamma$ -globina. As mudanças na expressão de ambos os genes passaram a ser observadas 24hs após a adição de HU na Fase II da cultura. Em relação a GATA-1 o aumento da expressão variou de 1,5 vez a 2.0 vezes entre os tempos de 96hs a 216hs ( $P < 0,05$ ). O aumento do mRNA de  $\gamma$ -globina variou de 1,6 vez a 2,2 vezes no mesmo período ( $P < 0,05$ ). Não foi observada qualquer influência da HU sobre a expressão de GATA-2 e NF-E2, durante todos os estágios da maturação eritróide. Todas essas observações foram realizadas sempre tendo em vista a expressão desses fatores de transcrição e do gene  $\gamma$ -globina em células não tratadas com HU.

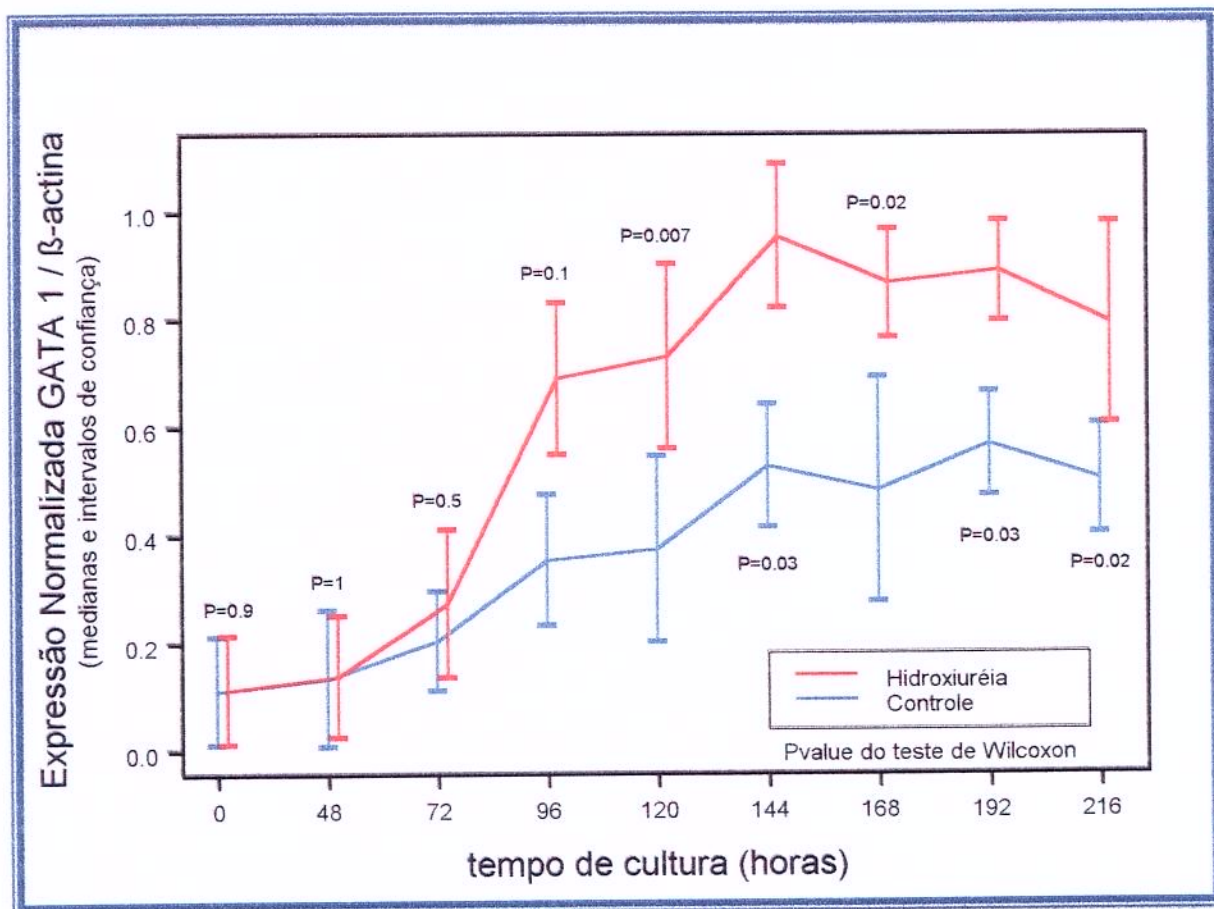
A HU foi adicionada no terceiro dia da Fase II, pois durante a Fase I ou durante os 3 primeiros dias da Fase II a HU impediu o desenvolvimento da célula eritróide. O acréscimo da droga em estágios mais tardios foi compatível com a sobrevivência e diferenciação celular, embora o número de células tenha diminuído. A HU afeta a quantidade de células em cultura principalmente pela sua capacidade de bloquear a proliferação celular.



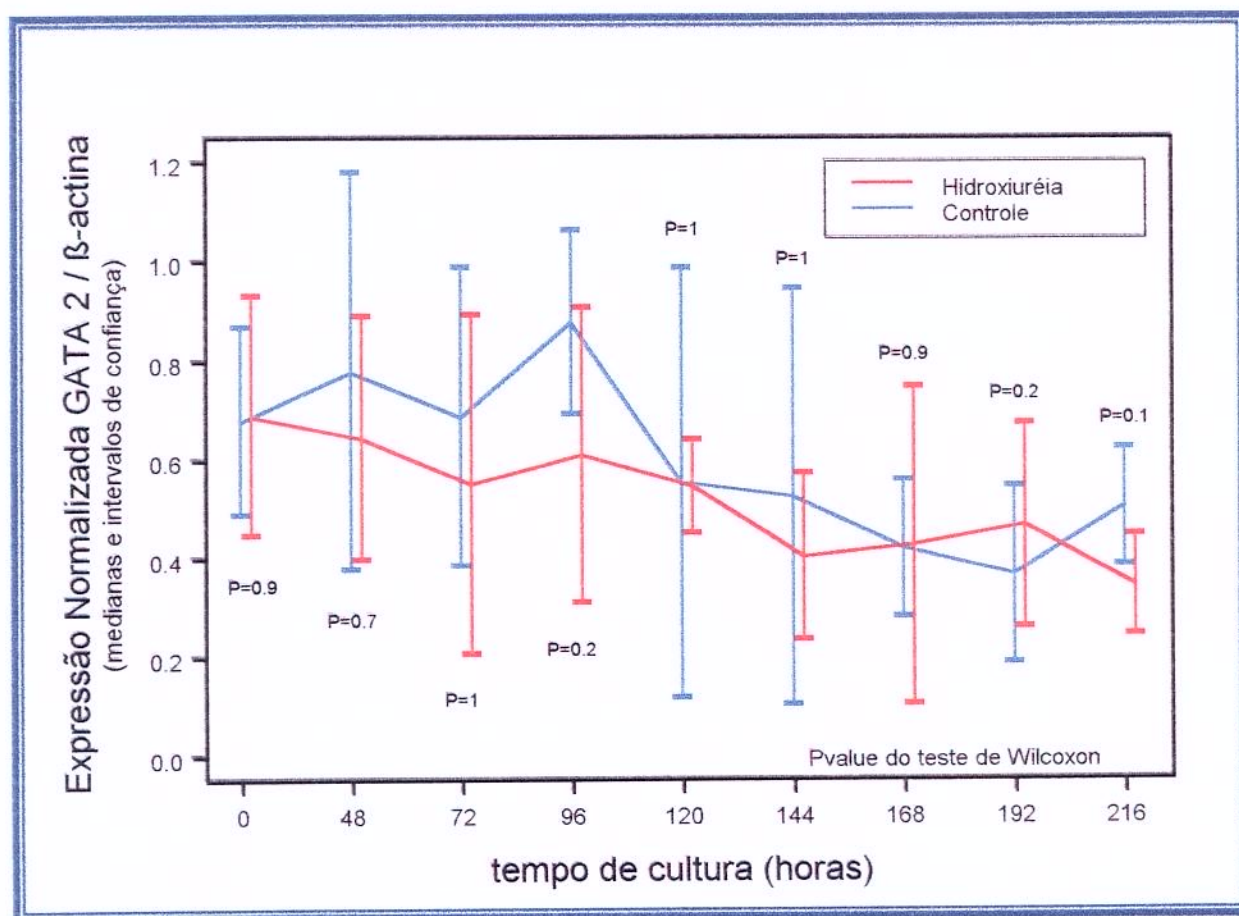
**Figura 12:** RT-PCR semiquantitativo: análise do mRNA de GATA-1, GATA-2, NF-E2 e  $\gamma$ -globina durante o desenvolvimento e diferenciação eritróide. O RNA total foi isolado de eritroblastos incubados e não incubados com 80 $\mu$ mol/L de HU, nos tempos indicados durante a diferenciação. O mRNA de  $\beta$ -actina foi usado como controle interno da reação. \*Tempo em horas.



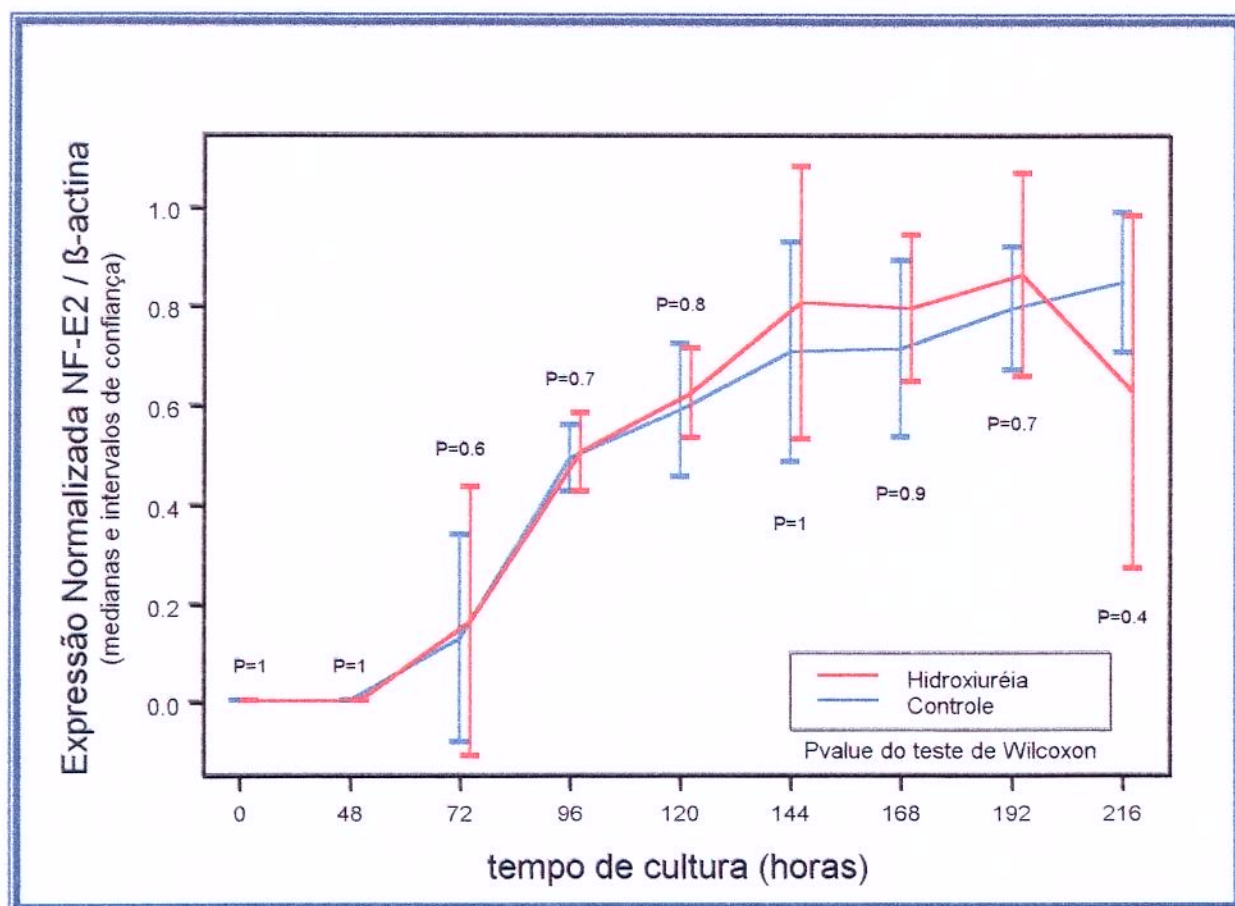
**Gráfico 1:** Expressão relativa do gene  $\gamma$ -globina durante o desenvolvimento e diferenciação das células eritróides, avaliada nos diferentes tempos da cultura em duas fases. Observamos um aumento da expressão de  $\gamma$ -globina nas amostras de células tratadas com HU a partir do tempo de 96hs após 24hs da adição de HU na Fase II da cultura. Esse aumento variou 1,6 vez a 2.2 vezes durante o tempo de 96hs a 216hs. Esses resultados, cujas diferenças foram significativas desde 96 hs ( $P < 0,05$ ) expressam a média de 7 experimentos independentes.



**Gráfico 2:** Expressão relativa do fator de transcrição GATA-1 durante o desenvolvimento e diferenciação das células eritróides, avaliada nos diferentes tempos da cultura em duas fases. Observamos um aumento da expressão de GATA-1 nas amostras de células tratadas com HU, a partir do tempo de 96hs após 24hs da adição de HU na Fase II da cultura. Esse aumento variou de 1,5 a 2.0 vezes durante o tempo de 96hs a 216hs. Esses resultados, cujas diferenças foram significativas a partir de 120hs ( $P < 0,05$ ), expressam a média de 7 experimentos



**Gráfico 3:** Expressão relativa do fator de transcrição GATA-2 durante o desenvolvimento e diferenciação das células eritróides, avaliada nos diferentes tempos da cultura em duas fases. Não observamos diferenças significativas na expressão de GATA-2 nas amostras de células incubadas com HU ( $P > 0,05$ ). Esses resultados expressam a média de de 7 experimentos independentes.



**Gráfico 4:** Expressão relativa do fator de transcrição NF-E2 durante o desenvolvimento e diferenciação das células eritróides, avaliada nos diferentes tempos da cultura em duas fases. Não observamos diferenças significativas entre as amostras de células tratadas com HU e as não tratadas ( $P > 0,05$ ). Esses resultados expressam a média de 7 experimentos independentes.

## **Expressão do mRNA dos Fatores de Transcrição GATA-1, GATA-2, NF-E2 e do gene $\gamma$ -Globina em células tratadas com o hormônio Progesterona**

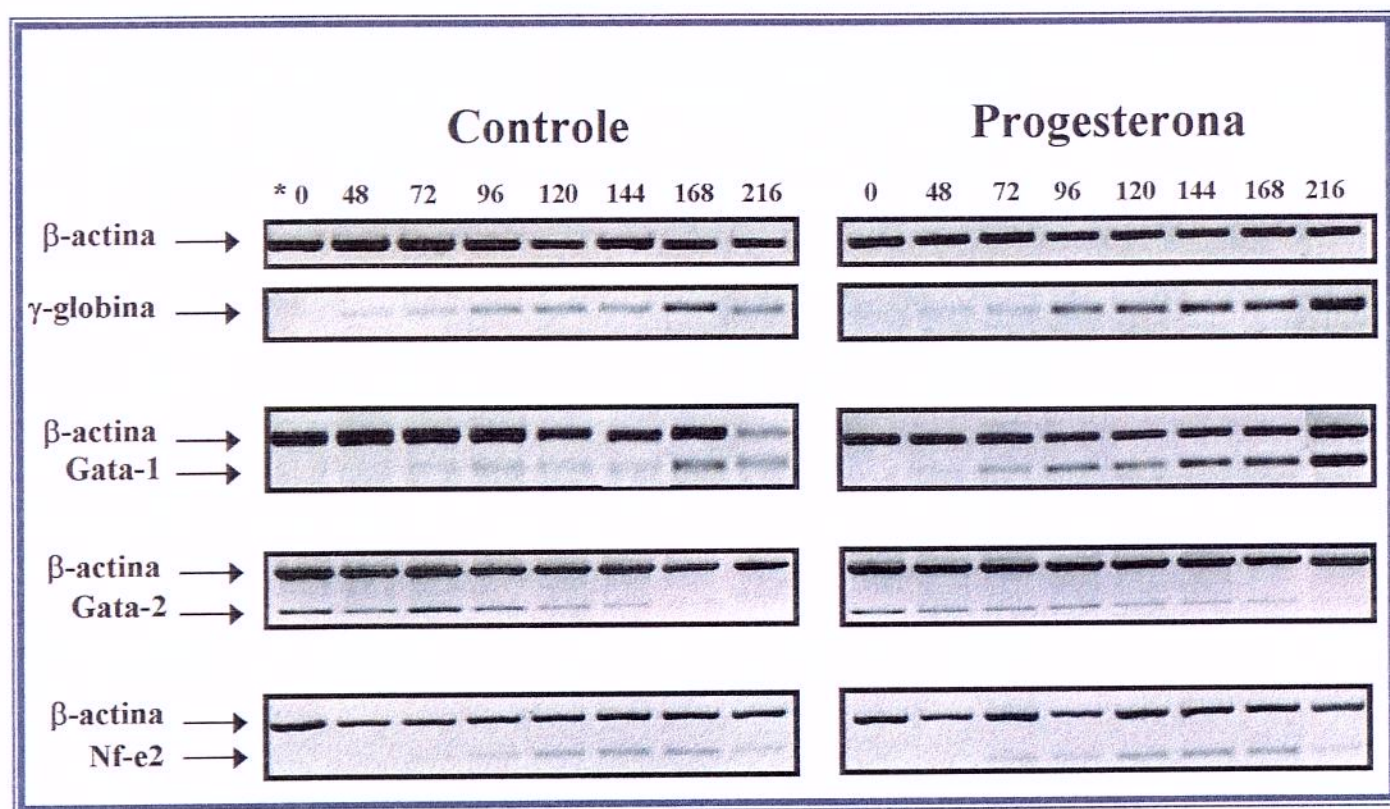
Os progenitores eritróides, obtidos de sangue periférico de doadores de sangue normais, foram cultivados em sistema de cultura líquida em duas fases e tratados com o hormônio progesterona desde o início da Fase II com o objetivo de caracterizar os seus efeitos na expressão dos fatores de transcrição GATA-1, GATA-2, NF-E2 e do gene  $\gamma$ -globina durante todo o processo de desenvolvimento e maturação das células eritróides. Com a utilização da concentração de  $10^{-7}$ M de progesterona em nossas culturas não observamos efeitos de toxicidade ou alteração no número de células.

A expressão do mRNA foi verificada através da técnica de RT-PCR semiquantitativo e quantificação dos produtos da PCR por densitometria (Figura 13).

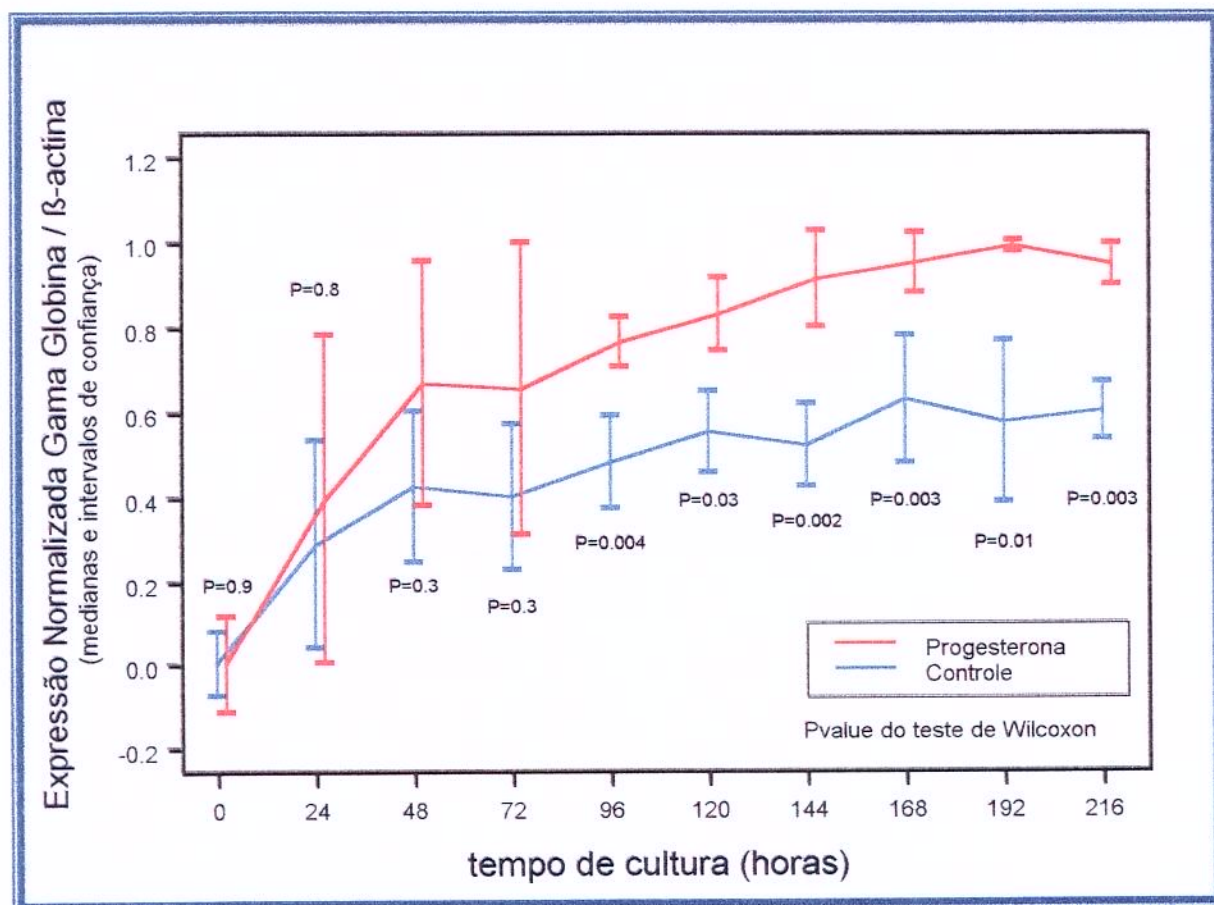
De acordo com os resultados obtidos, podemos observar um aumento significativo da expressão do fator de transcrição GATA-1 nas células tratadas com progesterona ( $P < 0,05$ ) comparando-se com as células sem tratamento. O aumento da expressão se inicia com 48hs após a adição de progesterona mas esse aumento se torna significativo somente após o tempo de 96hs e permanece até o final da cultura com 216hs (Gráfico 5).

Com relação aos fatores de transcrição GATA-2 e NF-E2 não foi observada nenhuma alteração significativa ( $P > 0,05$ ) da expressão em relação as amostras controle (Gráficos 6 e 7).

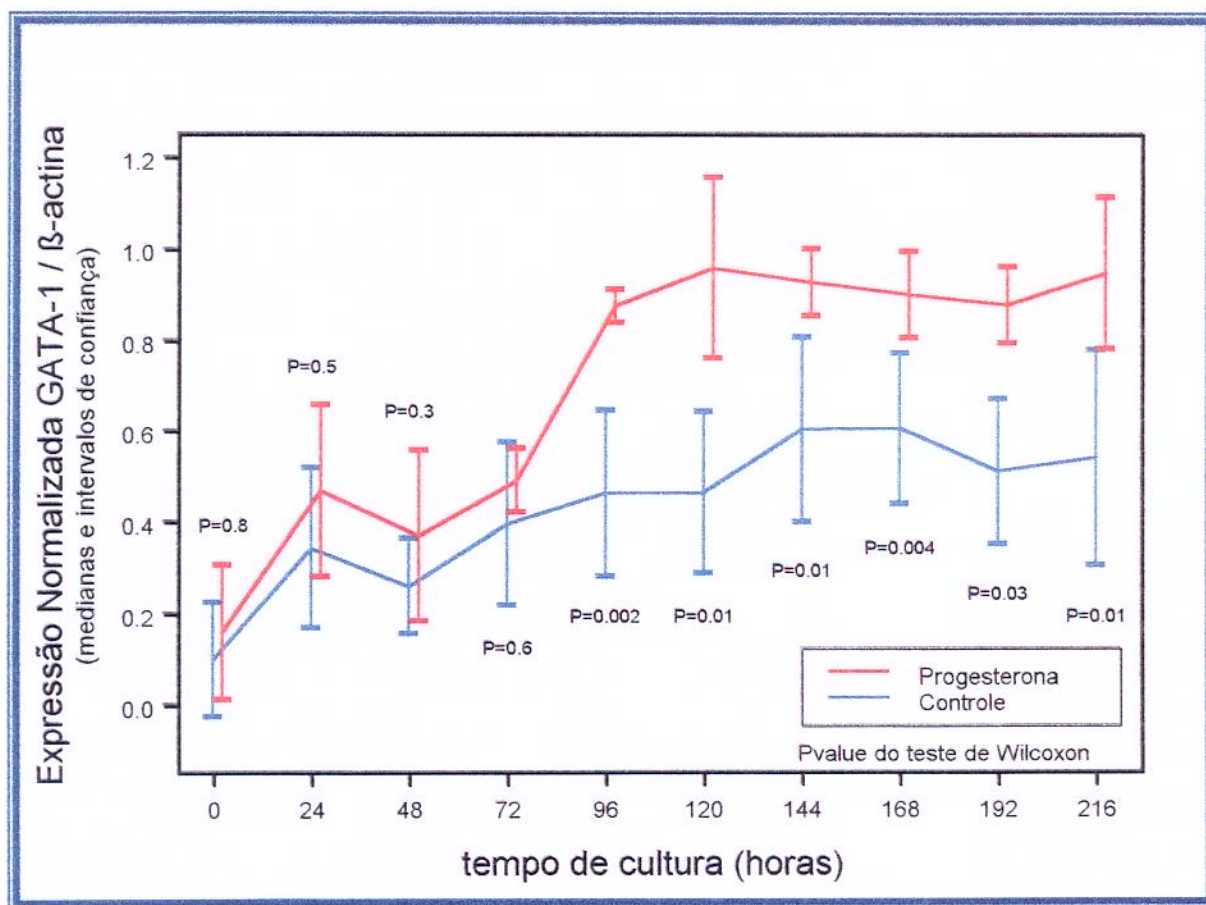
Os resultados obtidos no estudo da expressão do gene da  $\gamma$ -globina apontaram para uma maior expressão nas células tratadas com progesterona em comparação com as células sem tratamento. Esse aumento da expressão passou a ser observado após 24 hs da adição do hormônio na cultura de células, mas se tornou significativo ( $P < 0,05$ ) após o tempo de 96hs, permanecendo por todo o desenvolvimento da cultura até o seu final com 216hs (Gráfico 8). Esses resultados foram obtidos através da realização de 8 experimentos independentes utilizando células de diferentes doadores.



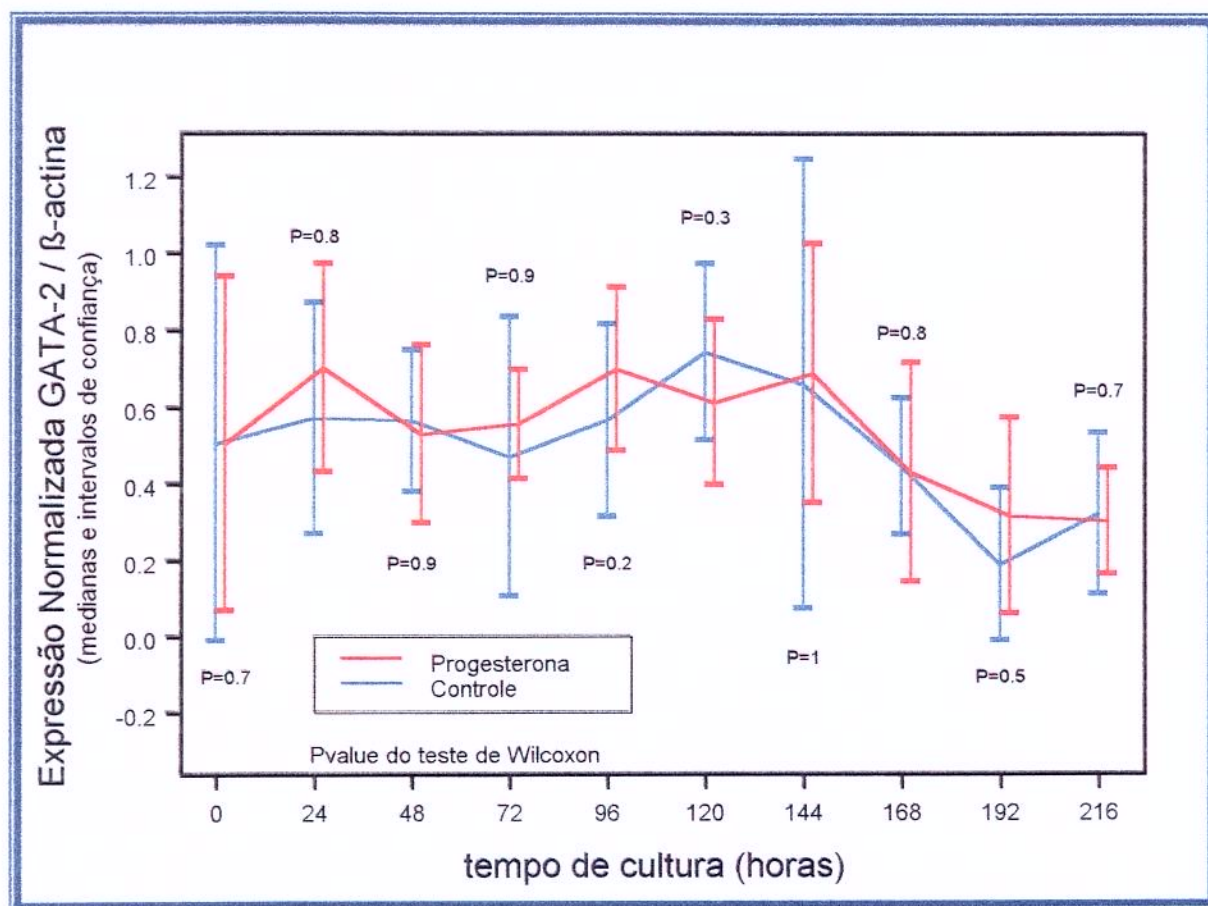
**Figura 13:** RT-PCR semiquantitativo: análise do mRNA de GATA-1, GATA-2, NF-E2 e  $\gamma$ -globina durante o desenvolvimento e diferenciação eritróide. O RNA total foi isolado de eritroblastos incubados e não incubados com  $10^{-7}$ M de progesterona, nos tempos indicados durante a diferenciação. O mRNA de  $\beta$ -actina foi usado como controle interno da reação. \*Tempo em horas.



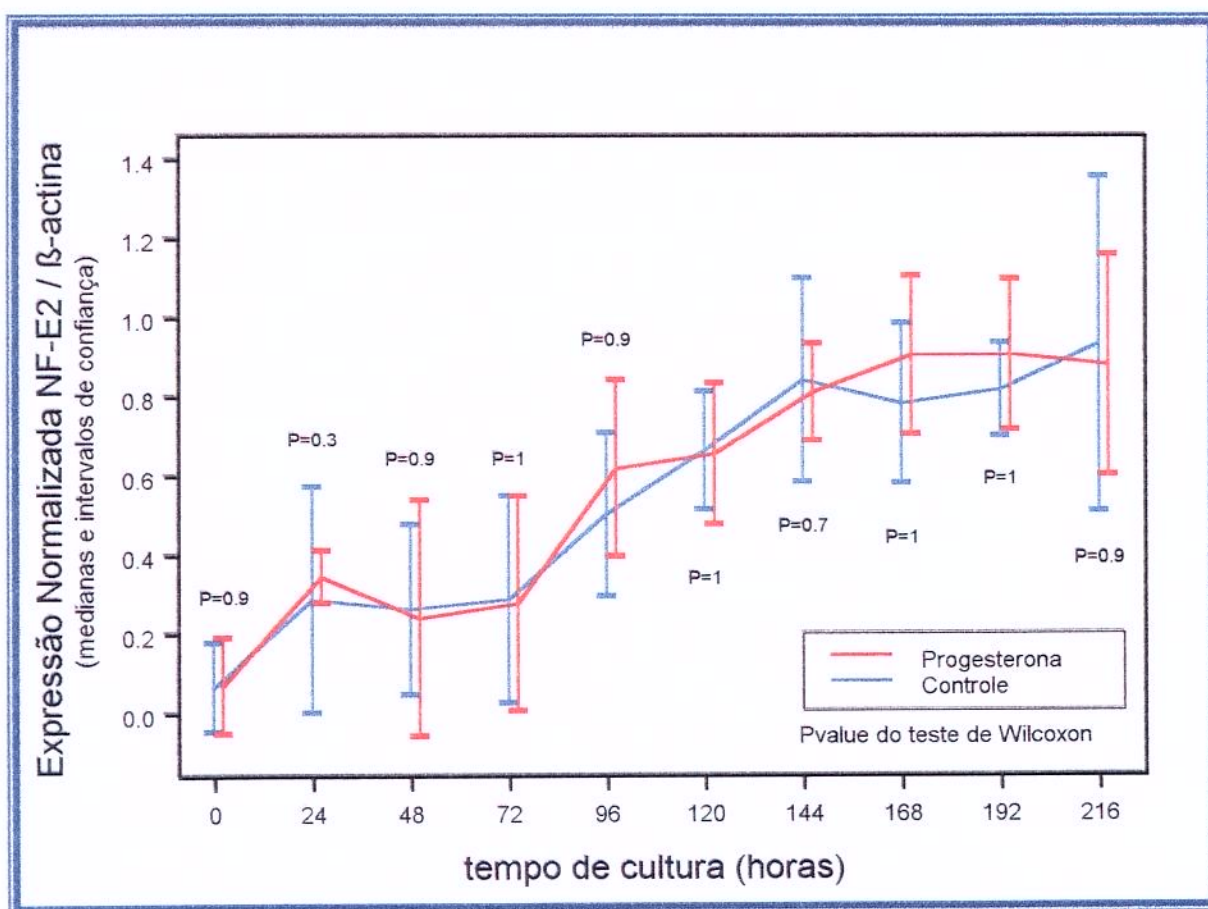
**Gráfico 5:** Expressão relativa do gene  $\gamma$ -globina durante o desenvolvimento e diferenciação das células eritróides, avaliada nos diferentes tempos da cultura em duas fases. Observamos um aumento da expressão de  $\gamma$ -globina nas amostras de células tratadas com progesterona após 24hs da sua adição na Fase II da cultura. Esse aumento (1.7 vezes) passou a ser estatisticamente significativo após 96hs de cultura e se manteve até o final com 216hs. ( $P < 0,05$ )



**Gráfico 6:** Expressão relativa do fator de transcrição GATA-1 durante o desenvolvimento e diferenciação das células eritróides, avaliada nos diferentes tempos da cultura em duas fases. Observamos um aumento da expressão de GATA-1 nas amostras de células tratadas com progesterona a partir do tempo de 48hs da adição de progesterona na Fase II da cultura. Esse aumento, que variou de 1.5 a 2.0 vezes, passou a ser significativo a partir de 96hs e permaneceu até 216hs ( $P < 0,05$ ).



**Gráfico 7:** Expressão relativa do fator de transcrição GATA-2 durante o desenvolvimento e diferenciação das células eritróides, avaliada nos diferentes tempos da cultura em duas fases. Não observamos nenhuma alteração da expressão de GATA-2 nas amostras de células incubadas com progesterona comparando-se com a expressão nas células não tratadas com o hormônio. ( $P > 0,05$ )



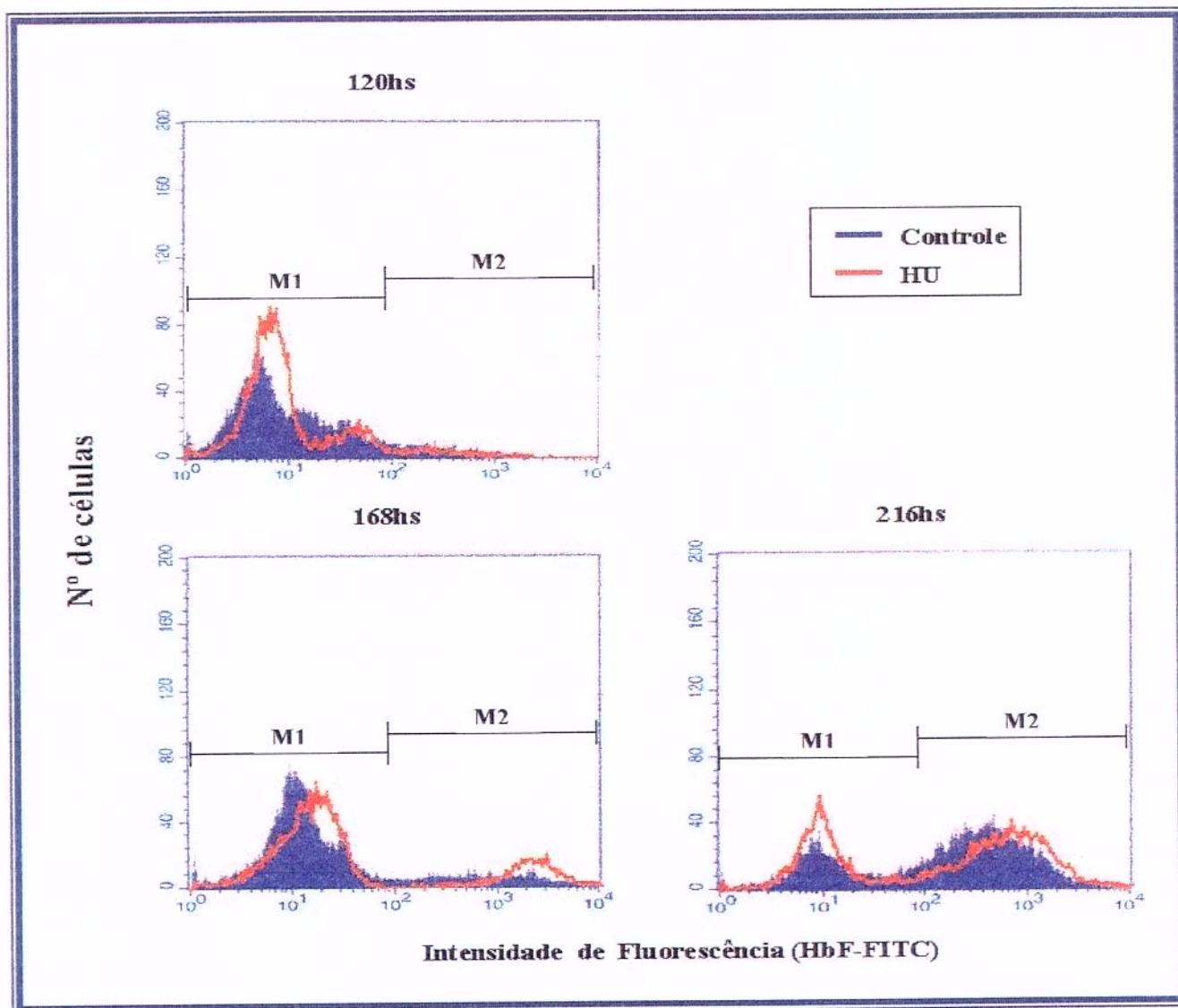
**Gráfico 8:** Expressão relativa do fator de transcrição NF-E2 durante o desenvolvimento e diferenciação das células eritróides, avaliada nos diferentes tempos da cultura em duas fases. Não observamos diferenças significativas entre as amostras de células tratadas com progesterona e as não tratadas durante todo o processo de maturação eritróide. ( $P > 0,05$ )

---

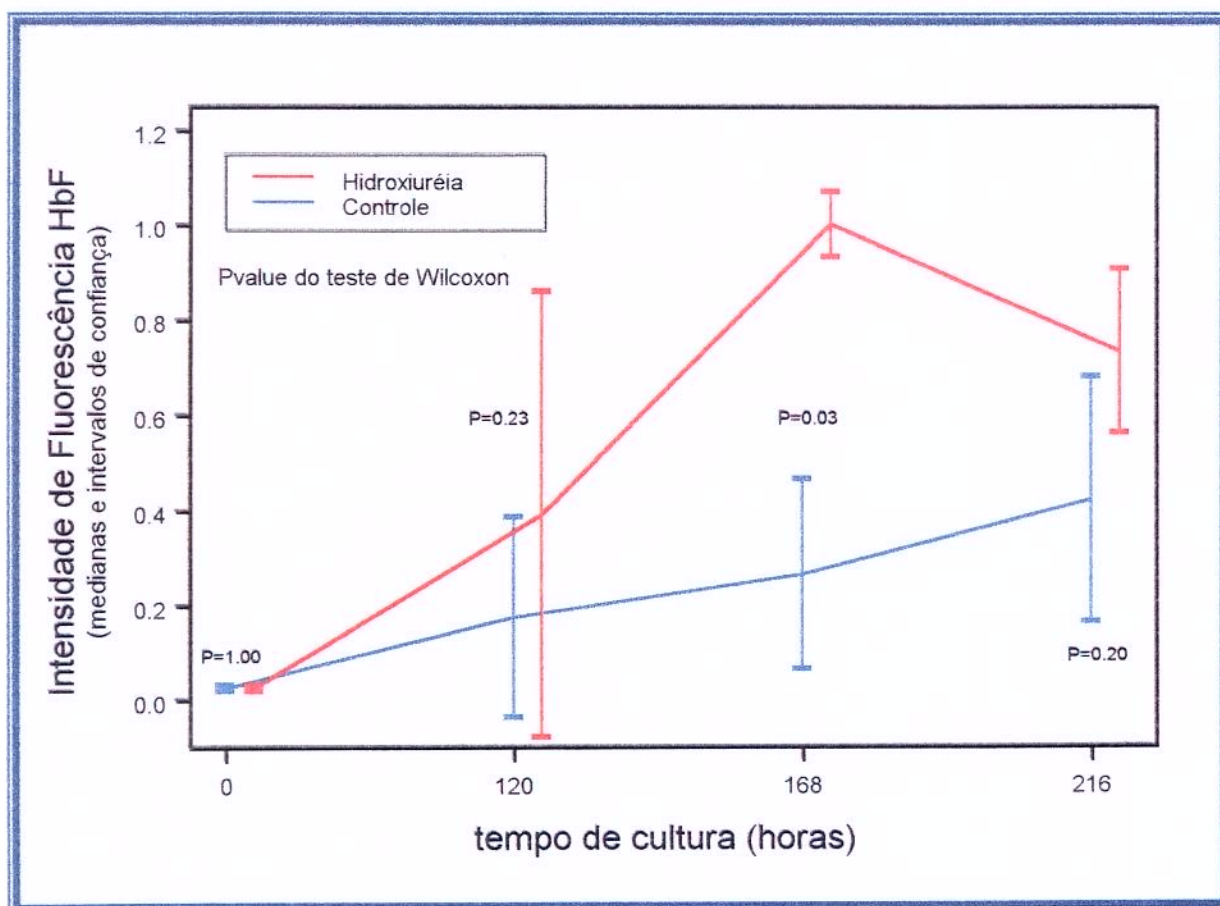
## **Detecção de Células F e Quantificação de HbF por Citometria de Fluxo**

### **Efeitos da Hidroxiuréia na síntese de HbF *in vitro***

Na citometria de fluxo observou-se que a HU não exerceu influência no número de células portadoras de HbF mas foi responsável pelo aumento da intensidade de fluorescência na população de células HbF positivas. Foram realizados 6 experimentos independentes nos quais amostras de células precursoras eritróides, coletadas em diferentes tempos da diferenciação e maturação, foram marcadas com o anticorpo anti-HbF conjugado com FITC e analisadas através de histogramas (Figura 14). Os resultados obtidos, comparando-se a intensidade de fluorescência das células tratadas e não tratadas com HU, foram apresentados em gráfico, após análise estatística (Gráfico 9).



**Figura 14:** Citometria de fluxo de precursores eritróides, marcados com o anticorpo anti-HbF humano, conjugado com FITC. Histogramas representando células HbF negativas (M1) e células HbF positivas (M2) em células progenitoras eritróides tratadas e não tratadas com HU, coletadas em diferentes tempos da Fase II da cultura em duas fases. Podemos observar uma maior intensidade de fluorescência nas células tratadas com HU (—), em relação as células controle (—), à medida que se diferenciam e amadurecem, em virtude do aumento do número de moléculas receptoras à ligação ao anticorpo HbF, por célula.

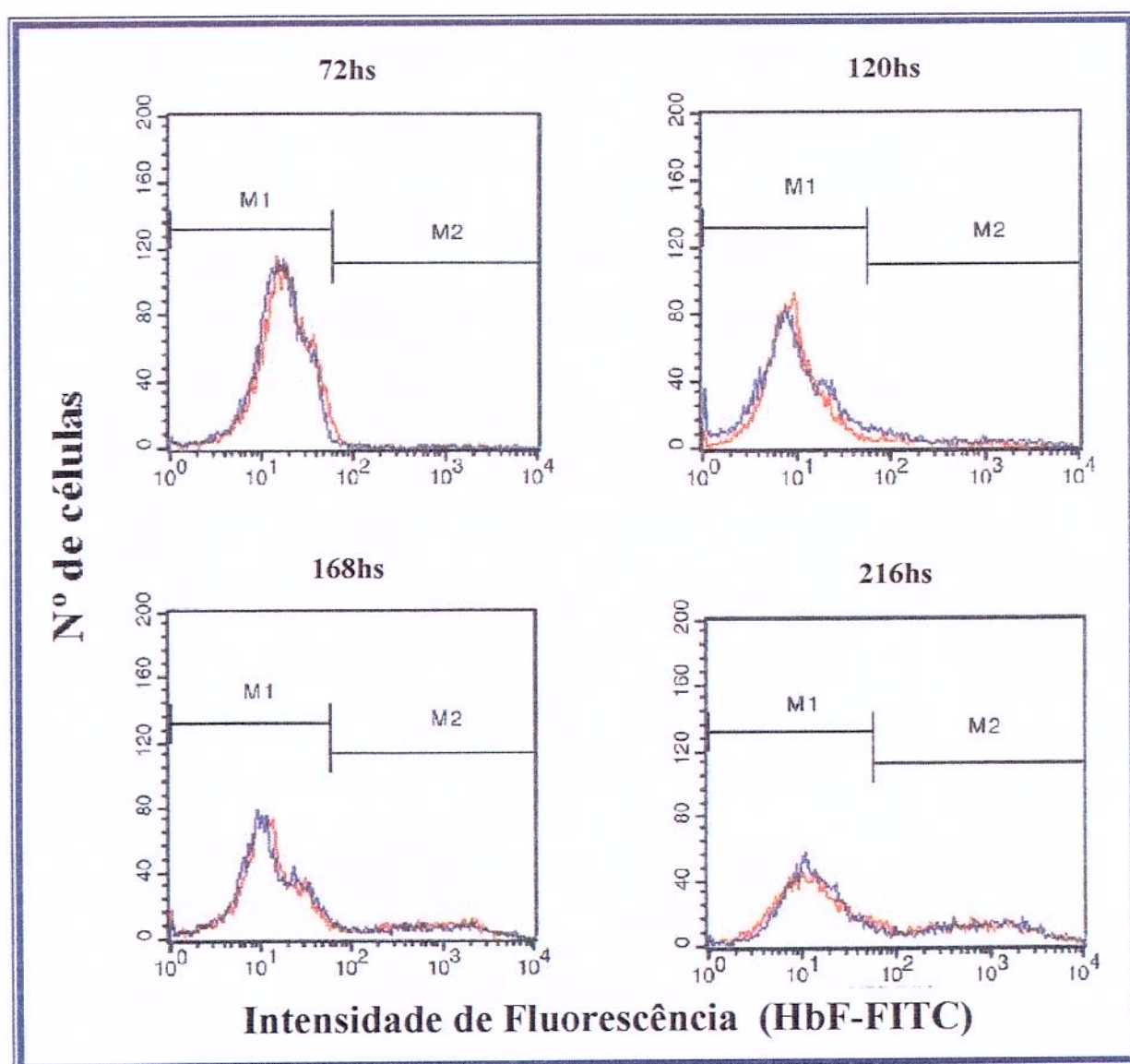


**Gráfico 9:** Representação Gráfica dos resultados obtidos através de citometria de fluxo. Esses dados representam a mediana e os intervalos de confiança de 6 experimentos realizados com a droga HU em cultura de células progenitoras eritróides do sangue periférico. As células foram coletadas em diferentes fases da diferenciação eritróide a partir do início da Fase II da cultura e marcadas com o anticorpo anti-HbF. Observou-se um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na intensidade de fluorescência das células tratadas com HU em relação as células sem tratamento no tempo de 168hs

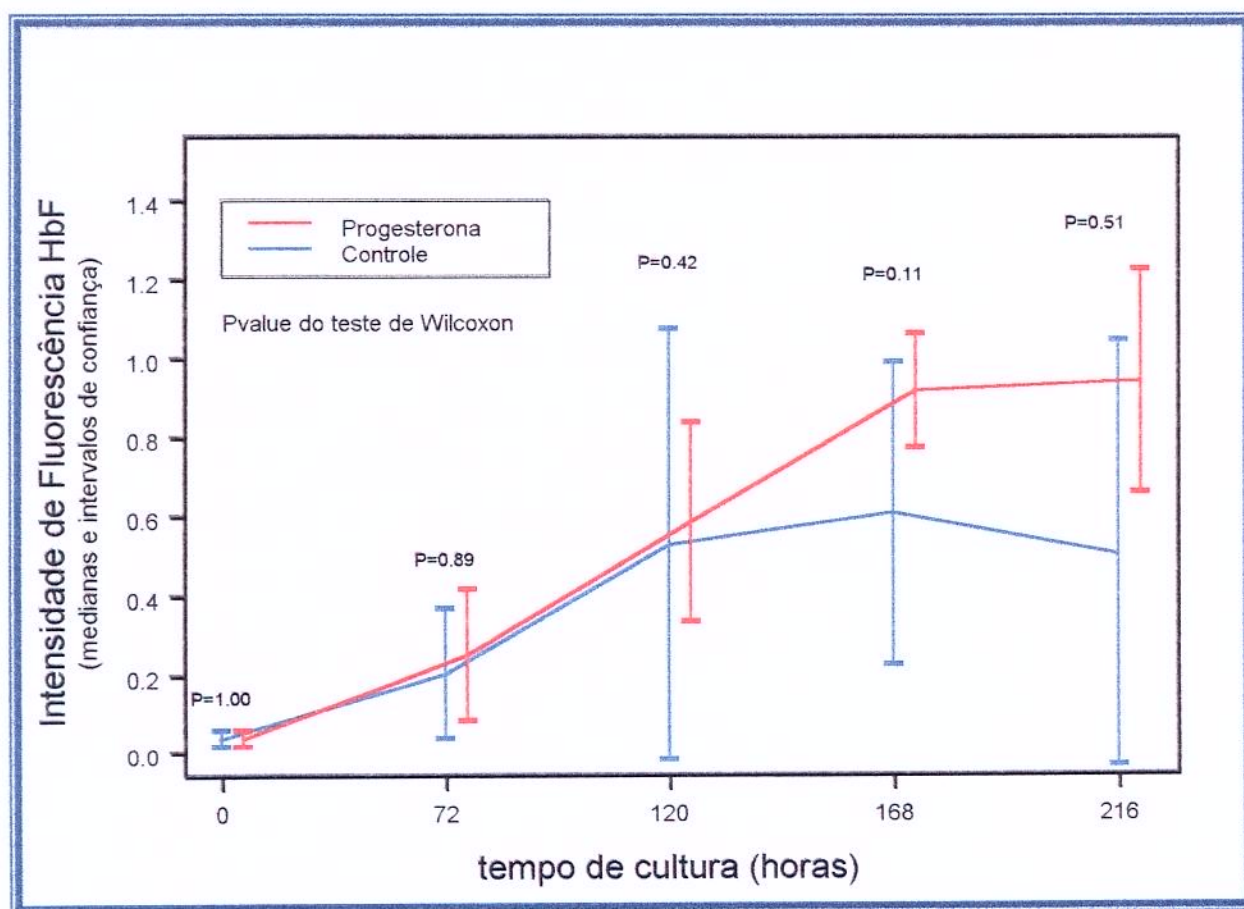
### **Efeitos da Progesterona na síntese de HbF *in vitro***

Na citometria de fluxo observou-se que a progesterona não exerceu influência no número de células portadoras de HbF mas foi responsável por um pequeno aumento da intensidade de fluorescência na população de células HbF positivas. Foram realizados 5 experimentos independentes nos quais amostras de células foram marcadas com o anticorpo anti-HbF conjugado com FITC e analisadas através de histogramas (Figura 15).

As células foram coletadas em diferentes tempos da diferenciação eritróide. Os resultados foram obtidos por comparação da intensidade de fluorescência presente nas células tratadas e não tratadas com progesterona e apresentados em gráfico para melhor análise (Gráfico10) .



**Figura 15:** Citometria de fluxo de precursores eritróides, marcados com o anticorpo anti-HbF humano, conjugado com FITC. Histogramas representando células HbF negativas (M1) e células HbF positivas (M2) em células progenitoras eritróides tratadas (—) e não tratadas (—) com progesterona, coletadas em diferentes tempos da Fase II da cultura em duas fases. Não observamos diferença significativa de intensidade de fluorescência nas células tratadas com progesterona, em relação as células controle, à medida que se diferenciam e amadurecem.



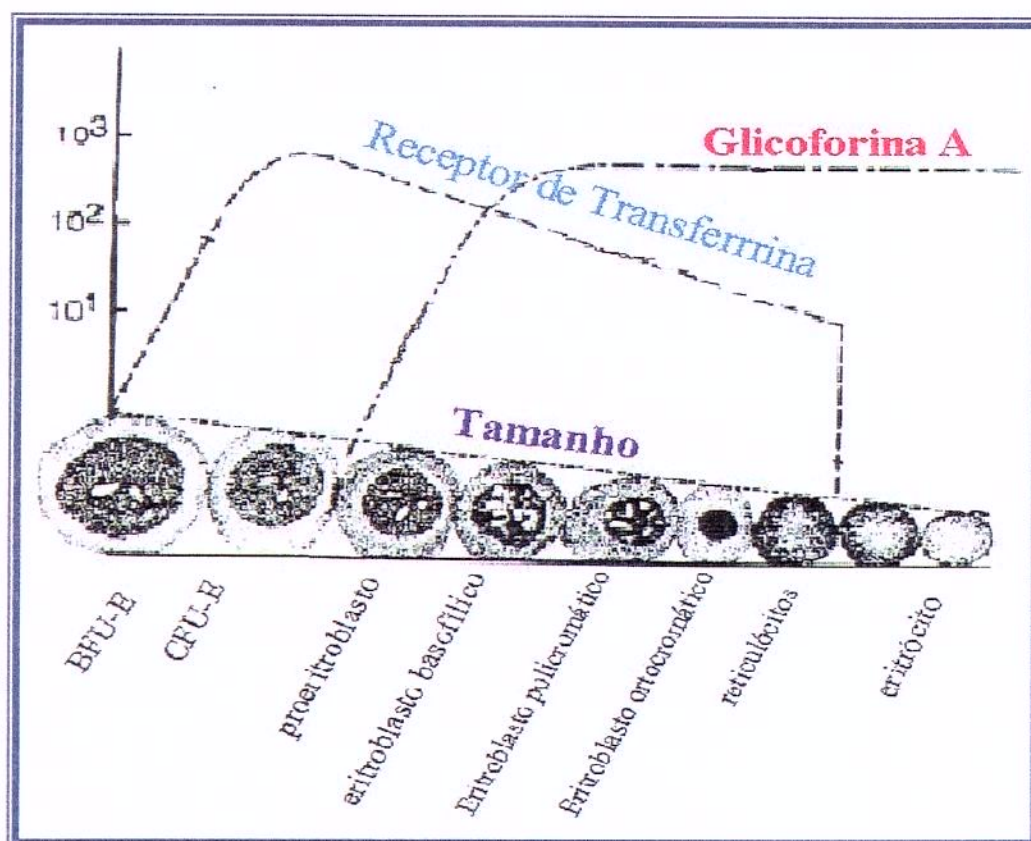
**Gráfico 10:** Representação Gráfica dos resultados obtidos através de citometria de fluxo. Esses dados representam a mediana e os intervalos de confiança de 5 experimentos realizados com progesterona em cultura de células progenitoras eritróides do sangue periférico. As células foram coletadas em diferentes fases da diferenciação eritróide a partir do início da Fase II da cultura e marcadas com o anticorpo anti-HbF. Não observou-se aumento significativo na intensidade de fluorescência das células tratadas com progesterona em relação as células sem tratamento ( $P > 0,05$ )

---

### **Análise da expressão dos marcadores de membrana Glicoforina A e Receptor de Transferrina por citometria de fluxo**

Os marcadores de superfície celular Glicoforina A e Receptor de Transferrina nos permitiram observar o processo de maturação dos progenitores eritróides em estudo e verificar os efeitos da droga hidroxiuréia e do hormônio progesterona sobre o processo de diferenciação e amadurecimento dessas células *in vitro*.

O Receptor de Transferrina começa a ser expresso na célula eritróide a partir do estágio de BFU-E, atinge o máximo de sua expressão durante a fase intermediária da diferenciação eritróide e desaparece nos estágios mais adiantados da maturação. A Glicoforina A, por sua vez, começa a ser expressa nos precursores eritróides logo que são morfologicamente reconhecíveis, ou seja, logo após o estágio de CFU-E. Ao contrário do Receptor de Transferrina, a Glicoforina A é bastante expressa em células eritróides maduras (Loken et al, 1993, Gubin et al, 1999, Miller et al, 1999) (Figura 16).

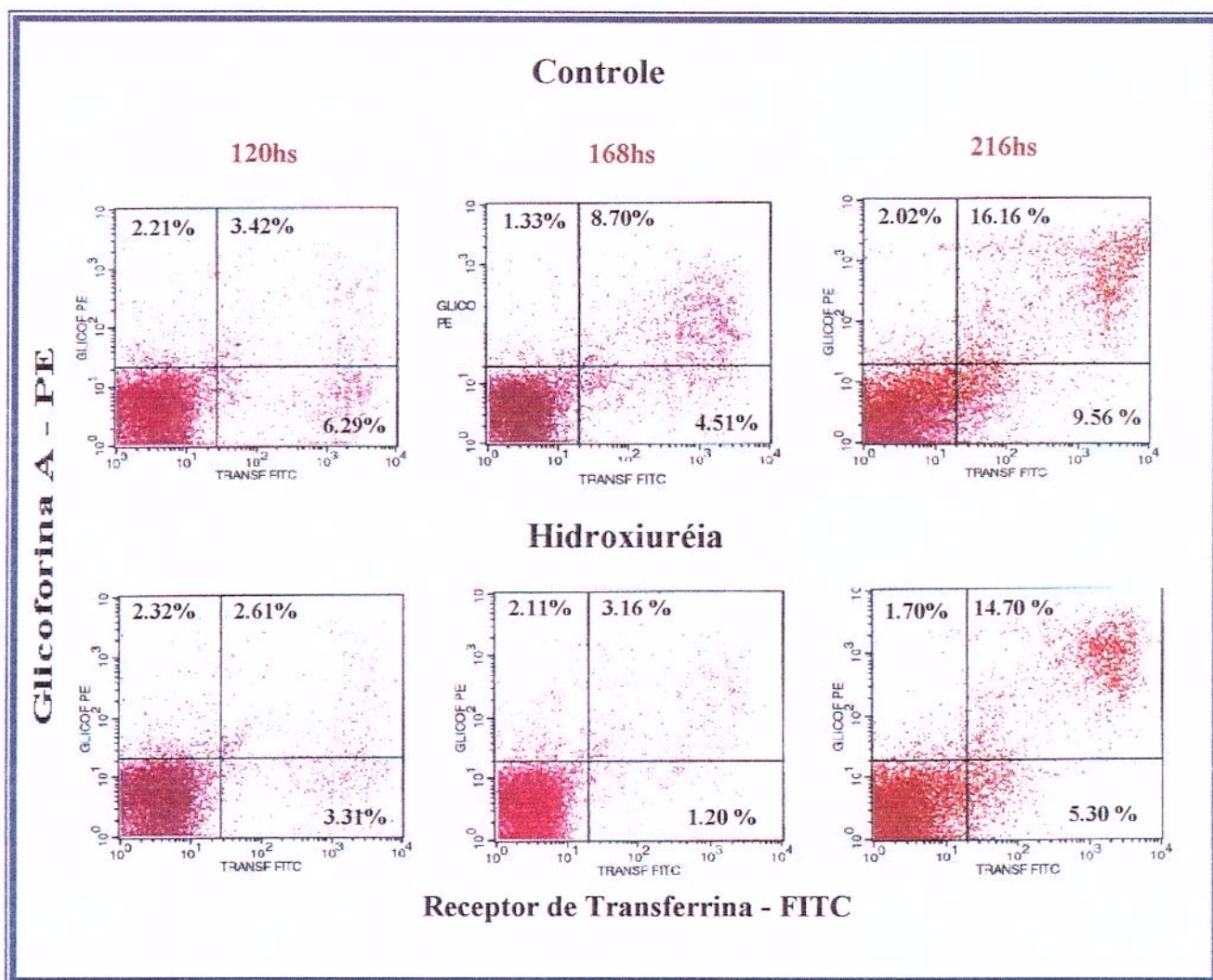


**Figura 16:** Representação esquemática sumarizando as características das células eritróides durante o desenvolvimento e maturação. As quantidades relativas dos antígenos de superfície celular estão representados na porção superior do diagrama. Estas características podem ser relacionadas com o tamanho da célula, morfologia, conteúdo de ácido nucleico e capacidade formadora de colônia eritróide.

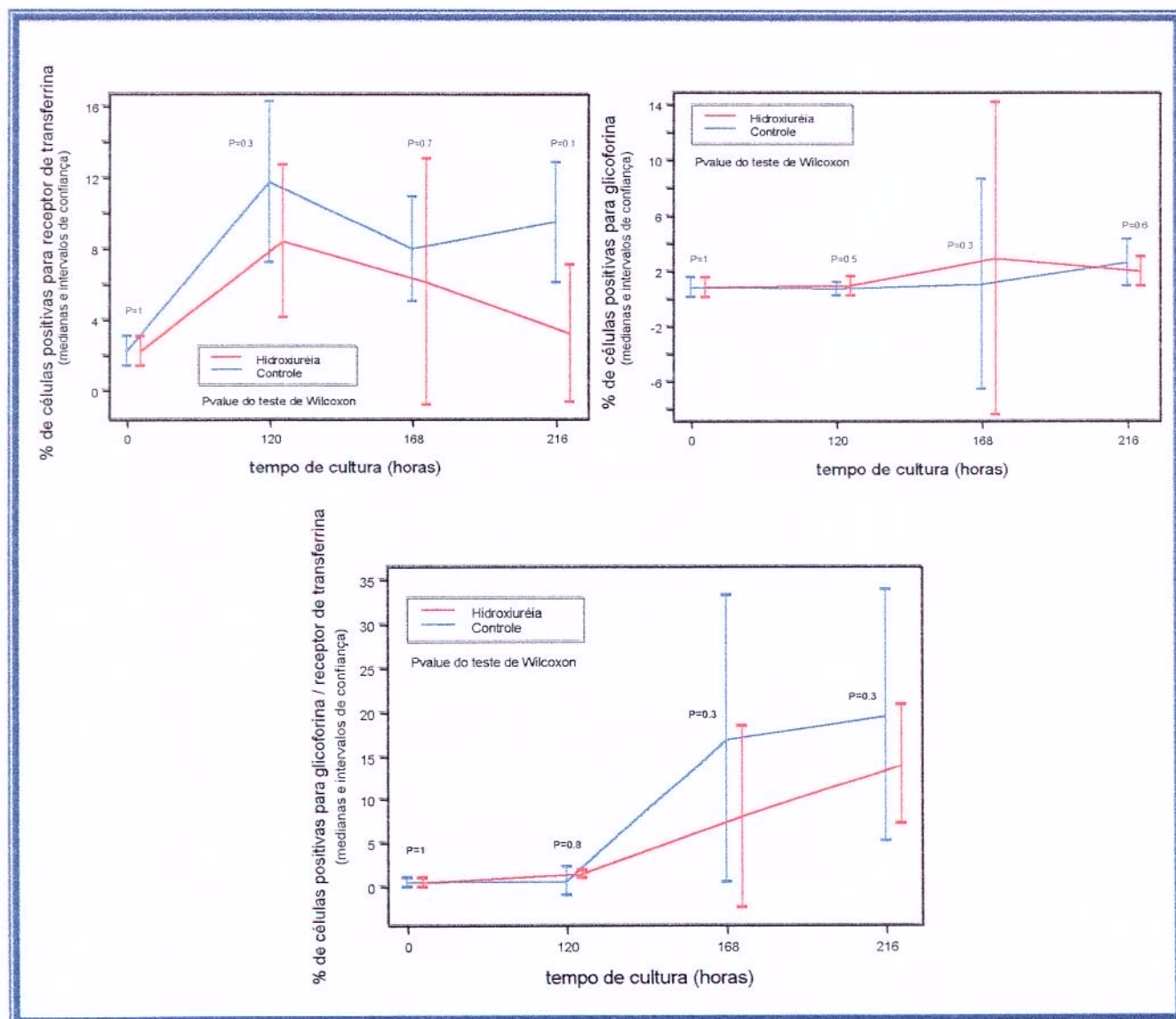
---

## **Efeitos da Hidroxiuréia sobre o padrão de expressão dos marcadores Glicoforina A e Receptor de Transferrina**

Na citometria de fluxo observou-se que a HU não alterou significativamente a porcentagem de células positivas para os antígenos Glicoforina A, Receptor de Transferrina ou para ambos. No entanto, foi possível observar uma pequena diminuição, embora não significativa, na porcentagem de células positivas para Receptor de Transferrina e para ambos os antígenos (Figura 17). Foram realizados 6 experimentos independentes onde amostras de células foram coletadas em diferentes tempos da diferenciação eritróide. Os resultados foram comparados entre células tratadas e não tratadas com HU e apresentados em gráfico para melhor análise (Gráfico 11).



**Figura 17:** Dados obtidos por citometria de fluxo representados em gráfico de pontos mostrando positividade da Glicoforina A (quadrante superior esquerdo), Glicoforina A/Receptor de Transferrina (quadrante superior direito) e Receptor de Transferrina (quadrante inferior direito) em progenitores eritróides tratados e não tratados com 80 $\mu$ M/L de HU em diferentes fases da diferenciação eritróide. No quadrante inferior esquerdo temos as células com marcação negativa para os anticorpos utilizados. Gráficos representativos de 6 experimentos independentes.

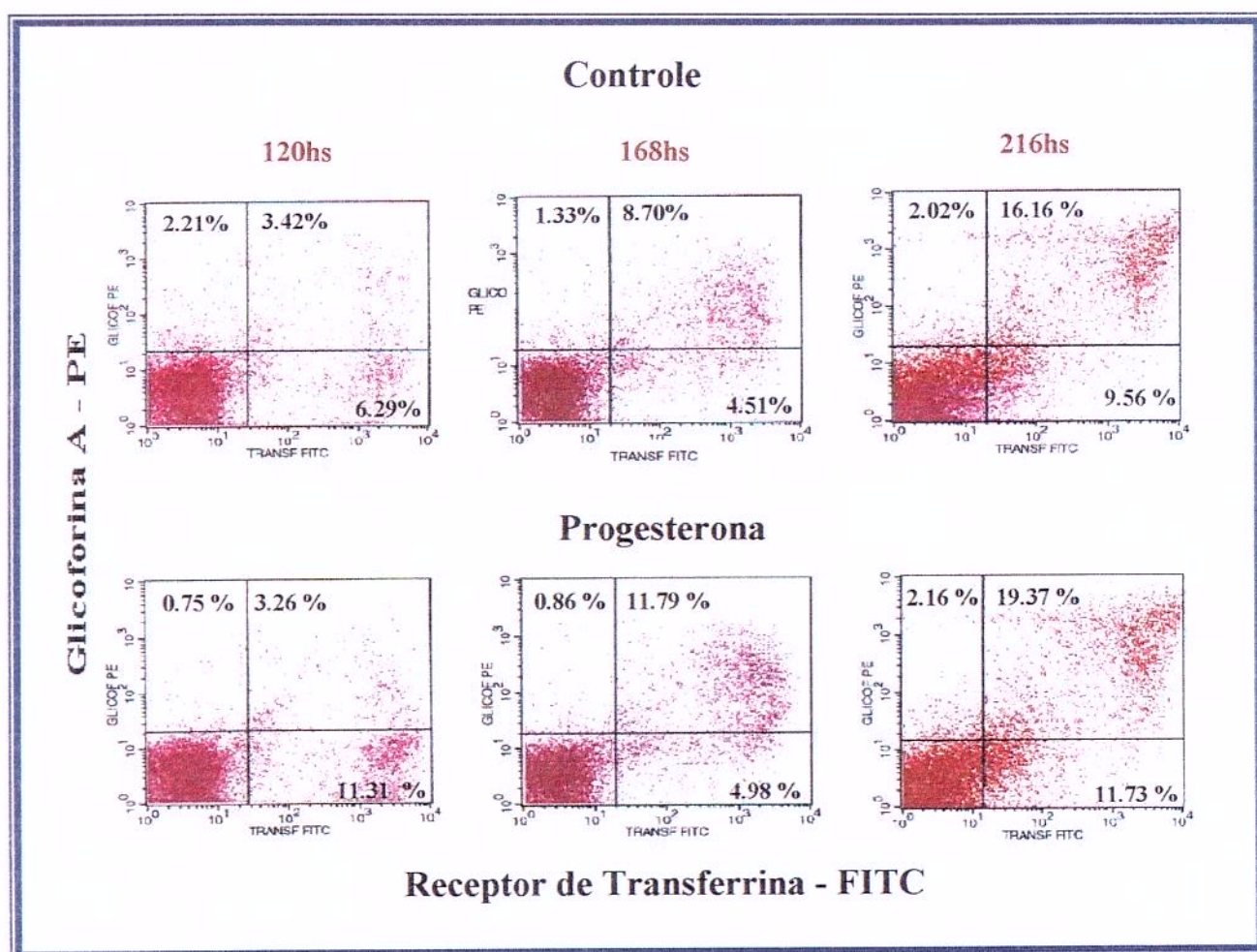


**Gráfico 11:** Representação Gráfica dos resultados obtidos através de citometria de fluxo. Esses dados representam a mediana e os intervalos de confiança de 6 experimentos realizados com hidroxiuréia em cultura de células progenitoras eritróides do sangue periférico. As células foram coletadas em diferentes fases da diferenciação eritróide a partir do início da Fase II da cultura e marcadas com os anticorpos anti-glicoforina A e anti-receptor de transferrina. Não observou-se diferença significativa no padrão de expressão dos marcadores de membrana nas células tratadas com hidroxiuréia em relação as células sem tratamento ( $P > 0,05$ ).

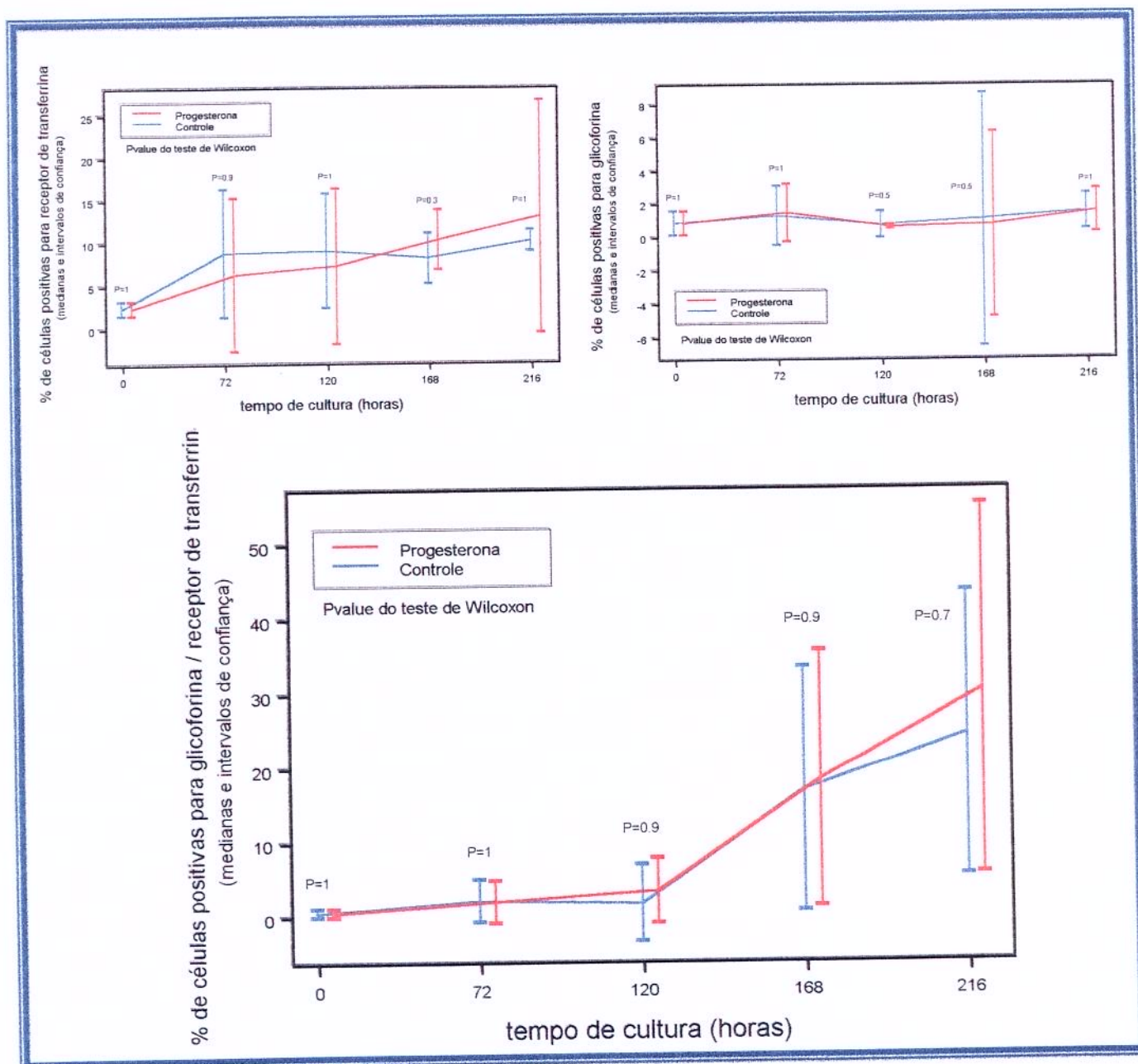
---

## **Efeitos da Progesterona sobre o padrão de expressão dos marcadores Glicoforina A e Receptor de Transferrina**

Através da citometria de fluxo não foi identificada nenhum tipo de alteração significativa no padrão de expressão dos marcadores Glicoforina A e Receptor de Transferrina entre as células progenitoras eritróides tratadas e não tratadas com o hormônio progesterona (Figura 18). Foram realizados 5 experimentos independentes onde amostras de células foram coletadas em diferentes tempos da diferenciação eritróide e os resultados foram apresentados em gráfico para melhor análise (Gráfico 12).



**Figura 18:** Dados obtidos por citometria de fluxo representados em gráfico de pontos mostrando positividade da Glicoforina A (quadrante superior esquerdo), Glicoforina A/Receptor de Transferrina (quadrante superior direito) e Receptor de Transferrina (quadrante inferior direito) em progenitores eritróides tratados e não tratados com  $10^{-7}$ M de progesterona em diferentes fases da diferenciação eritróide. No quadrante inferior esquerdo temos as células com marcação negativa para os anticorpos utilizados. Gráficos representativos de 5 experimentos independentes.



**Gráfico 12:** Representação Gráfica dos resultados obtidos através de citometria de fluxo. Esses dados representam a mediana e os intervalos de confiança de 5 experimentos realizados com progesterona em cultura de células progenitoras eritróides do sangue periférico. As células foram coletadas em diferentes fases da diferenciação eritróide a partir do início da Fase II da cultura e marcadas com os anticorpos anti-glicoforina A e anti-receptor de transferrina. Não observou-se diferença significativa no padrão de expressão dos marcadores de membrana nas células tratadas com progesterona em relação as células sem tratamento ( $P > 0,05$ )

## ***Discussão***

Durante o crescimento e diferenciação, a expressão de genes sofre ativação e repressão/silenciamento seletivos. Os genes silenciados podem, entretanto, ser reativados e expressos. Esse é o princípio básico para tratamento de certas doenças genéticas. A reativação da  $\gamma$ -globina para aumentar os níveis de HbF com a utilização de indutores farmacológicos no tratamento da anemia falciforme é um exemplo desse tipo de abordagem.

O sistema de cultura líquida em duas fases se constitui numa excelente ferramenta para estudar os vários aspectos do desenvolvimento da célula eritróide bem como a modulação da síntese de Hb por agentes farmacológicos (Smith et al, 2000) e em nosso estudo foi realizado com sucesso. Foi possível analisar vários aspectos do desenvolvimento da linhagem eritróide, desde as fases mais jovens até quase a fase final de maturação celular, *in vitro*.

De acordo com a literatura, na Fase II da cultura de células eritróides, após a adição do fator de crescimento eritróide-específico eritropoietina e sem a adição de qualquer outro tipo de indutor, de 0h a 72hs observa-se que 90% das células são blastos, ainda não identificáveis como eritroblastos (Wada et al, 1990).

Os proeritroblastos, as primeiras células que indicam o início da maturação da linhagem eritróide, começam a surgir a partir de 72hs e atingem o seu maior número por volta de 120hs. Nesse mesmo período surgem os primeiros eritroblastos imaturos (basofílicos e policromáticos). Os eritroblastos ortocromáticos, células mais maduras, começam a aparecer por volta de 144hs (Wada et al, 1990).

Em estudos de diferenciação eritróide induzida somente por eritropoietina *in vitro*, a transição das fases dos progenitores multipotentes através de BFUe, CFUe e proeritroblastos, é acompanhada pela mudança de expressão de  $\gamma$ -globina para  $\beta$ -globina. Nessas culturas, a síntese de  $\gamma$ -globina ocorre predominantemente em proeritroblastos e normoblastos basofílicos (7º dia da Fase II), ao passo que a síntese de  $\beta$ -globina ocorre mais tarde atingindo o pico no 14º dia da Fase II da cultura (Jane, 1998, Fibach et al, 2000).

Na literatura ressalta-se que esse tipo de cultura em associação com alguma técnica de análise da expressão gênica fornecem um método excelente de seleção de drogas com forte potencial de alterar a expressão de genes e também de investigação dos mecanismos moleculares pelos quais essas drogas atuam (Smith et al, 2000).

No presente estudo, utilizamos essa metodologia associada com a técnica de RT-PCR semiquantitativo para verificar os efeitos de dois compostos químicos, a droga hidroxauréia e o hormônio progesterona, sobre a expressão dos genes dos fatores de transcrição GATA-1, GATA-2 e NF-E2 bem como a expressão do gene da  $\gamma$ -globina.

Apesar dos diferentes efeitos fisiológicos produzidos pelos hormônios esteróides em diferentes tipos celulares e tecidos, esses sinalizadores químicos possuem um mecanismo de ação em comum no nível molecular. Todos eles se ligam a receptores proteicos e permitem que esses receptores ativem a transcrição de um limitado número de genes (Truss et al, 1993).

Os hormônios esteróides são extremamente lipofílicos e atravessam a membrana celular facilmente, exercendo seus efeitos em questão de horas e envolvendo a síntese de novas proteínas. A habilidade de responder aos hormônios esteróides se deve à presença do receptor hormonal correspondente (cognato) e à sua interação com os elementos responsivos ao hormônio (HRE) localizados no DNA. Esses HREs são regiões genômicas distintas encontradas à montante do sítio de início da transcrição de genes induzíveis. Agem como acentuadores da transcrição (“enhancers”) o que caracteriza o papel de regulador hormonal nos promotores dos genes. Eles podem ser ocupados pelo receptor esteróide para a eficiente transcrição de certos genes (Harman et al, 1999). Embora a ligação do receptor ao HRE seja um pré-requisito para a regulação gênica, somente sua presença não é suficiente. O modo preciso pelo qual a ligação dos receptores esteróides aos HREs levam ao aumento da transcrição não é conhecido, mas deve envolver a interação direta do receptor com outras proteínas nucleares (fatores de transcrição) que são essenciais no mecanismo de transcrição (Beato, 1989, Truss et al, 1993).

Os fatores de transcrição pertencem a uma classe de proteínas com papel muito importante na regulação gênica. Como já mencionado, os fatores de transcrição mais importantes na manutenção e diferenciação das células eritróides são os fatores GATA-1, GATA-2 e NF-E2 (Papavassiliou, 1995, Pevny et al, 1995, Cunningham et al, 1996).

Observou-se através dos dados apresentados em gráfico, o aumento da expressão do fator de transcrição GATA-1 nas células tratadas com progesterona em comparação com as não tratadas, a partir de 72hs de cultura, tempo, como já mencionado, em que começam a surgir os primeiros proeritroblastos numa cultura de células sem indução. O grau máximo da expressão de GATA-1 ocorreu entre 120hs e 168hs, havendo uma pequena queda da expressão logo após e a

manutenção da mesma até o final da cultura. De acordo com a análise estatística a diferença da expressão de GATA-1 entre as amostras tratadas com progesterona e não tratadas foi significativa a partir de 96hs até 216hs.

Padrão semelhante de expressão foi observado em gama globina, cuja expressão nas células tratadas com progesterona passou a se diferenciar da amostra controle a partir de 24hs de cultura, atingindo seu máximo de expressão entre 120 e 168hs. Em seguida houve uma pequena diminuição da expressão. A diferença de expressão também foi considerada significativa entre 96hs e 216hs.

A presença do fator de transcrição GATA-1 é de extrema importância para diferenciação e amadurecimento das células eritróides, pois foi constatado que sua ausência nos precursores eritróides faz com que a maturação seja interrompida na fase de proeritroblasto e as células sofram apoptose (Tsang et al, 1997, De Maria et al, 1999, Orkin et al, 1999).

O aumento gradativo da expressão de GATA-1 em cultura de células sem indutores adicionais do processo de diferenciação e maturação é esperado, mas o que observamos nas células tratadas com progesterona foi um aumento de expressão de 1,5 a 2 vezes em relação às células não tratadas e um aumento de expressão de 1,7 vezes do gene gama globina.

Os mecanismos pelos quais a progesterona produziu mudanças nos níveis de expressão do mRNA de GATA-1 ainda são desconhecidos. Entretanto, de acordo com outros estudos, sabe-se que a ação desse hormônio é mediada pelo receptor intracelular da progesterona (PR), o qual desempenha papel de fator de transcrição regulando a expressão de vários genes (Bevan et al, 1999). Após a ligação com a progesterona, o receptor sofre várias mudanças conformacionais resultando na dissociação do complexo oligomérico, translocação para o núcleo, dimerização e ligação ao elemento responsivo a progesterona (PRE) localizado na região promotora dos genes alvo (Jenster et al, 1997).

O receptor da progesterona pode modular a transcrição gênica diretamente através do contato com os componentes da maquinaria transcricional ou indiretamente pelo recrutamento de moléculas co-ativadoras como o receptor esteróide (SCR)-1 e as proteínas de ligação p300/CREB (CBP) (Liu et al, 2001). Essas moléculas co-ativadoras possuem atividade histona acetiltransferase sugerindo desta forma que a atividade do receptor também pode envolver o

remodelamento estrutural da cromatina, através da acetilação das histonas, além de dar início ao processo de transcrição (Liu et al, 1999).

Diante dessas observações é possível afirmar que o aumento da expressão do fator de transcrição GATA-1, nas células tratadas com progesterona, ocorra através da interação entre o complexo hormônio-receptor e o elemento responsivo a progesterona presente em outros fatores de transcrição, que possivelmente regulem a transcrição do gene GATA-1.

Esse mecanismo desencadeado pela progesterona poderia explicar o aumento da expressão do fator de transcrição GATA-1 em períodos precoces do processo de diferenciação e maturação eritróide. Na fase em que a presença de proeritroblastos é maior numa cultura normal (120hs), GATA-1 está iniciando sua expressão em resposta ao início da maturação, em condições normais da fisiologia eritróide, enquanto que na presença de progesterona, no mesmo período de 120hs de cultura sua expressão quase dobra. Nesse mesmo período observamos o aumento da expressão do gene gama globina em relação as células não tratadas com progesterona.

É possível que o aumento da expressão de  $\gamma$ -globina seguida do tratamento com progesterona ocorra através da interação da proteína GATA-1 com o respectivo sítio de ligação GATA-1 na região promotora do gene  $\gamma$ , cuja transcrição ainda se encontra ativa nas células bastante jovens, como os proeritroblastos e normoblastos basofílicos.

Como já apresentado, GATA-2 desempenha papel importante na proliferação e manutenção dos progenitores eritróides muito jovens mas é dispensável à maturação das células (Minegishi et al, 1998). Entretanto, neste estudo observamos que a progesterona não alterou a expressão de GATA-2.

Também não observamos diferenças significativas na expressão do fator de transcrição NF-E2 que parece estar envolvido em três aspectos da síntese da hemoglobina, ou seja, faz parte da regulação transcricional das cadeias de globina, está envolvido na biossíntese do heme e controla o metabolismo do ferro (Stamatoyannopoulos et al, 1994, Andrews, 1999). O mecanismo de ação deste fator de transcrição ainda não está bem esclarecido, mas parece que possui a capacidade de criar sítios hipersensíveis e acessíveis à ligação de outros fatores em sítios específicos na região controladora do locus (LCR), através da abertura e remodelamento da cromatina (Armstrong et al, 1996, Blank et al, 1997).

O padrão de expressão de NF-E2 é paralelo ao de GATA-1. Ambos são expressos em linhagens de células eritróides. Os sítios funcionais de NF-E2 são muito próximos aos de GATA-1. Esses dois ativadores transcricionais podem interagir estabelecendo um alto nível de expressão dos genes da globina nas células eritróides. (Stamatoyannopoulos et al, 1994).

No presente estudo, nós também utilizamos a citometria de fluxo para monitorar os níveis de HbF presentes nas células progenitoras eritróides (células F +) durante o tratamento com progesterona (Campbell et al, 1999). Apesar de termos observado, em nossos experimentos, aumento significativo dos níveis de expressão do mRNA de  $\gamma$ -globina, e de estudos anteriores demonstrarem aumento de HbF durante o período de utilização desse hormônio, a análise por citometria de fluxo não demonstrou diferença significativa na síntese da proteína HbF, visualizada através da intensidade de fluorescência, entre as células tratadas e não tratadas com progesterona, possivelmente porque a quantidade de HbF produzida está abaixo do nível mínimo de detecção por este método, que é de 6 picogramas por célula (Nagel et al, 2001).

Além de quantificar os níveis de HbF, também utilizamos a citometria de fluxo para avaliar os efeitos da progesterona sobre o processo de diferenciação e maturação eritróide, através da observação do padrão de expressão dos marcadores de membrana Glicoforina A e Receptor de Transferrina. Durante todo o processo de cultivo das células progenitoras eritróides, na presença de progesterona, não foi observada diferença significativa na porcentagem de células positivas para ambos os antígenos, em relação as células sem tratamento. Provavelmente, o hormônio progesterona não exerceu sua influência sobre o ritmo normal de diferenciação e maturação dessas células.

A hidroxiuréia é representante de um grupo de compostos que têm como seu local principal de ação a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase. Esta enzima, que catalisa a conversão redutiva dos ribonucleosídeos em desoxirribonucleotídeos, é um passo crucial e provavelmente limitador da taxa de biossíntese do DNA (Buller et al, 1999). A hidroxiuréia destrói um radical livre tirosila que é formado no centro catalítico da enzima. A droga é específica para a fase S do ciclo celular e faz as células pararem na interface G1-S. Trata-se de uma droga muito utilizada na terapêutica de doenças mieloproliferativas (Buller et al, 1999).

Na última década a hidroxiuréia passou a ser utilizada no tratamento dos pacientes com anemia falciforme em razão de ocasionar o aumento dos níveis de HbF melhorando o quadro clínico da doença (Dover et al, 1992, Fibach et al, 1993).

O aumento dos níveis de HbF com a utilização de HU é bastante documentada e baseia-se em trabalhos realizados com pacientes portadores de anemia falciforme e talassemia beta que tiveram melhora significativa do quadro clínico (Atweh et al, 2001, Fibach, 2001). Os mecanismos pelos quais a HU desempenha essa função foram constatados através da realização de experimentos *in vivo* e observações clínicas (Huang et al, 2001). Muitos mecanismos de indução da reativação da síntese de HbF pela hidroxiuréia em adultos, foram propostos. Esses mecanismos baseiam-se nos efeitos citotóxicos da droga (mielossupressão) e a consequente recuperação da toxicidade através do recrutamento de células jovens da medula com capacidade de síntese de  $\gamma$ -globina, caracterizando dessa maneira o aumento dos níveis de HbF em usuários da droga (Dover et al, 1992).

Além da perturbação na cinética celular, pouco se sabe de outros mecanismos que a HU possa utilizar e que expliquem a alteração nos níveis de HbF em pacientes com anemia falciforme e o número de trabalhos com a utilização da HU *in vitro* é reduzido.

Em nossos experimentos, utilizando a HU em cultura de células progenitoras eritróides, numa concentração com efeitos mínimos sobre a sobrevivência e diferenciação, observamos um aumento da expressão do fator de transcrição GATA-1 logo após a adição da droga na Fase II da cultura. Esse aumento variou de 1,5 a 2,0 vezes a partir de 96hs até 216hs. O mesmo observamos com relação ao gene gama globina, que teve sua expressão aumentada em até 2,2 vezes, a partir de 96hs mantendo-se elevada até o final da cultura. Nenhuma influência considerada significativa foi observada sobre a expressão dos fatores de transcrição GATA-2 e NF-E2, durante a diferenciação dos progenitores eritróides tratados com HU.

O aumento da expressão do mRNA de  $\gamma$ -globina *in vitro*, observado em nossos experimentos, foi considerado um dado muito interessante, principalmente por trabalharmos com uma população limitada de células, representativa das várias fases do desenvolvimento e diferenciação eritróide. O mecanismo de recrutamento de células mais jovens, presentes na medula óssea, que ocorre *in vivo*, não seria um mecanismo possível, portanto não seria o melhor modo de justificar esse aumento da expressão de  $\gamma$ -globina.

Através da análise de citometria de fluxo na tentativa de determinar o número de células positivas para HbF e a quantidade relativa de antígenos por célula, possível pela medida da intensidade de fluorescência emitida pelo anticorpo marcado com fluorocromo, também obtivemos resultados que vêm de encontro com o que constatamos através de RT-PCR semiquantitativo.

Embora a HU não tenha aumentado o número de células HbF positivas, observamos um aumento de até 3 vezes da intensidade de fluorescência na população de células positivas para o antígeno HbF comparando-se com a população de células sem tratamento. Esse aumento da intensidade de fluorescência pode ser observado em razão do aumento do número de moléculas de HbF por célula, ou seja, houve um aumento da transcrição de mRNA e da síntese proteica.

Apesar da HU inibir a proliferação celular, a análise do padrão de expressão dos marcadores de membrana Glicoforina e Receptor de Transferrina, através da citometria de fluxo, não demonstrou perturbação, a níveis significativos, do processo normal de diferenciação e maturação eritróide.

Outro dado importante que pode ser observado em nosso trabalho foi o aumento da expressão do principal fator de transcrição eritróide. GATA-1 é essencial à diferenciação eritróide e teve sua expressão aumentada ao mesmo tempo que  $\gamma$ -globina em níveis um pouco menores.

De acordo com a literatura e com os resultados obtidos, provavelmente a HU esteja agindo indiretamente na indução da expressão do fator de transcrição GATA-1, através da modulação de outras proteínas, que podem aumentar a transcrição desse fator e consequentemente este atue sobre o promotor do gene  $\gamma$ -globina, principalmente em proeritroblastos e normoblastos basofílicos, células eritróides mais jovens, que apresentam a capacidade de síntese de HbF, justificando dessa maneira o aumento de mRNA de  $\gamma$ -globina e de HbF nas células em cultura.

Por outro lado, a HU parece não modular a expressão de GATA-2 e NF-E2.

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que a hidroxiuréia e progesterona são capazes de induzir a expressão de GATA-1 e este fato deve estar relacionado ao aumento de HbF observado após tratamento com estas drogas. Outros estudos serão necessários para elucidar os mecanismos pelos quais estas drogas modulam a expressão de GATA-1.

## ***Conclusões***

- 1- Com base nos dados apresentados, podemos concluir que o hormônio progesterona e a droga HU aumentam a expressão do fator de transcrição GATA-1 e do gene gama globina nas células eritróides.
- 2- A expressão dos fatores de transcrição GATA-2 e NF-E2 não é influenciada pela progesterona e nem pela HU.
- 3- As concentrações utilizadas, em cultura, tanto de progesterona como de HU não influenciaram o processo de diferenciação e maturação das células da linhagem eritróide.
- 4- O procedimento da cultura de duas fases foi realizado com sucesso.

## ***Summary***

Sickle cell anemia is a very common hereditary disease caused by a structural defect in the beta-globin chain, giving rise to HbS. This anomalous hemoglobin, under low oxygen tensions, forms intracellular polymers, causing deformation of the erythrocytes which, in turn, block the micro-circulation and cause infarction in various organs.

Pharmacological induction using various chemical compounds, the best known being hydroxyurea (HU), 5-azacytidine, butyrate and steroid hormones, increase the synthesis of HbF in sickle cell patients. The regulation of the expression of HbF is related to the presence of active elements linked “cis” to the beta-globin as well as to the presence of regulatory proteins of the genomic transcription process (known as transcription factors), such as the GATA-1, GATA-2 and NF-E2 proteins, expressed principally in the erythroid lineage.

This project aimed to study the effect of HU and the hormone progesterone on the modulation of the genetic expression of the transcription factors GATA-1, GATA-2, NF-E2 and the gamma globin gene in erythroid lineage cells obtained from two-phase culture of peripheral blood donors at the Hemocenter, UNICAMP. The expression of the transcription factors was determined by semi-quantitative RT-PCR and quantified by densitometry.

Our results demonstrate that in the cells treated with HU and progesterone there was a significant increase, when compared with the untreated cells ( $P < 0.05$ , Wilcoxon test), in the expression of the GATA-1 transcription factor and of the gamma globin gene after 96h of phase II culture until termination at 216hs. The expression of the NF-E2 transcription factor was not affected by HU or progesterone administration during the entire process of erythroid differentiation and neither of the chemicals had any significant influence upon the expression of the GATA-2 transcription factor ( $P > 0.05$ , Wilcoxon test).

## ***Referências Bibliográficas***

- ALTMANN, D. G. – **Practical Statistic For Medical Research**, 1991.
- ANDREWS, N. C. – Erythroid Transcription Factor NF-E2 Coordinates Hemoglobin Synthesis. **Pediatric Research**, **36**: 419-423, 1994.
- ARMSTRONG, J. A. & EMERSON, B. M. – NF-E2 Disrupts Chromatin Structure at Human  $\beta$ -Globin Locus Control Region Hypersensitive Site 2 In Vitro. **Mol Cell Biol**, **16**: 5634-5644, 1996.
- ATWEH, G. F. & LOUKOPOULOS, D. – Pharmacological Induction of Fetal Hemoglobin in Sick Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. **Semin Hematol**, **38**: 367-373, 2001.
- BALIGA, B. S.; PACE, B. S.; CHEN, H. H.; SHAH, A. K. AND YANG, Y. M. – Mechanism for Fetal Hemoglobin Induction by Hydroxyurea in Sick Cell Erythroid Progenitors. **Am J Hematol**, **65**: 227-233, 2000.
- BEATO, M. & PACHECO, A. S. – Interaction of Steroid Hormone Receptors with the Transcription Initiation Complex. **Endocrine Reviews**, **17**: 587-609, 1996.
- BEATO, M. – Gene Regulation by Steroid Hormones. **Cell**, **56**: 335-344, 1989.
- BEVAN, C. & PARKER, M. – The role of coactivators in steroid hormone action. **Exp Cell Res**, **253**: 349-356, 1999.
- BLANK, V.; KIM, M. J. AND ANDREWS, N. C. – Human MafG Is a Functional Partner for p45 NF-E2 in Activating Globin Gene Expression. **Blood**, **89**: 3925-3935, 1997.
- BRIEGEL, K.; BARTUNEK, P.; STENGL, G.; LIM, K. C.; BEUG, H.; ENGEL, J. D. AND ZENKE, M. – Regulation and function of transcription factor Gata-1 during red blood cell differentiation. **Development**, **122**:3839-3850, 1996.
- BULLER, A.M.; ELFORD, H. L.; DUBOIS, C. C.; MEYER, J. AND LLOYD J. A. – A Combination of Hydroxyurea and Isobutyramide to Induce Fetal Hemoglobin in Transgenic Mice Is More Hematotoxic Than the Individual Agents. **Blood Cells Mol Dis**, **31**:255-269, 1999.
- CAMPBELL, T. A.; WARE, R. E. AND MASON M. – Detection of Hemoglobin Variants in Erythrocytes by Flow Cytometry. **Cytometry**, **35**: 242-248, 1999.
- CEULAER, K.; HAYES, R.; GRUBER C. AND SERJEANT G. R. – Medroxyprogesterone Acetate and Homozygous Sick Cell Disease. **The Lancet**, 229 – 231, July 31, 1982.

- CHARACHE, S.; TERRIN, M.L.; MOORE, R.D.; DOVER, G.J.; BARTON, F.B; ECKERT, S.V.; MCMAHON, R. P. AND BONDS D.R. – Effect of Hydroxyurea on the frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. **The New England Journal of Medicine**, **332**: 1317-1322, 1995.
- CONOVER, W. J. – **Practical Nonparametric Statistics**. John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque. 1971.
- CUNNINGHAM, J. M. & JANE, S. M. – Hemoglobin Switching and Fetal Hemoglobin Reactivation. **Semin Hematol**, **33**:9-23, 1996.
- DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D; BERK, A.; ZIPERSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P. **Molecular Cell Biology**. New York – EUA. Ed. Scientific American Books. (1995): 853-924
- DE MARIA, R.; ZEUNER, A.; ERAMO, A.; DOMENICHELLI, C.; BONCI, D.; GRIGNANI, F.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E.S.; TESTA, U. AND PESCHLE, C. – Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. **Nature**, **40**: 489-493, 1999.
- DOVER, G. J & CHARACHE, S. – Hydroxyurea Induction of Fetal Hemoglobin Synthesis in Sickle Cell Disease. **Semin Oncol**, **19 (3)**: 61-66, 1992).
- EPSTEIN, N.; EPSTEIN, M.; BOULET, A.; FIBACH, E. AND RODGERS G.P. – Monoclonal antibody-based methods for quantitation of hemoglobins: application to evaluating patients with sickle cell anemia treated with hydroxyurea. **European Journal Haematology**, **57**:17-24, 1996.
- FIBACH, E. – Cell Culture and Animal Models to Screen for Promising Fetal Hemoglobin-Stimulating Compounds. **Semin Hematol**, **38**: 374-381, 2001.
- FIBACH, E.; MANOR, D.; OPPENHEIM, A. AND RACHMILEWITZ, E. A. – Proliferation and Maturation of Human Erythroid Progenitors in Liquid Culture. **Blood**, **73**:100-103,1989.
- FIBACH, E; BURKE, L. P.; SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. AND RODGERS G P. – Hydroxyurea increases fetal hemoglobin in cultured erythroid cells derived from normal individuals and patients with sickle cell anemia or  $\beta$ -thalassemia. **Blood** , **81**: 1630-1635, 1993.

- FORGET, B. F. & HIGGS, D. R. – The Molecular, Cellular and Genetic Basis of Hemoglobin Disorders. In: Steinberg M H, Forget B G, Higgs D R, Nagel R L, eds. **Disorders of Hemoglobin**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001: 25-51.
- GUBIN, A. N.; NJOROGE, J. M.; BOUFFARD, G. G. AND MILLER, J. L. – Gene Expression in Proliferating Human Erythroid Cells. **Genomics**, **59**: 168-177, 1999.
- HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. – As bases Farmacológicas da Terapêutica. 9 ed. McGraw Hill, 1999. Goodman & Gilman.
- HUANG, Z.; LOUDERBACK, J. G.; KING, S. B.; BALLAS, S. K. AND SHAPIRO D. D. K. – In Vitro Exposure to Hydroxyurea Reduces Sickle Red Blood Cell Deformability. **Am J Hematol**, **67**: 151-156, 2000.
- IKONOMI, P.; RIVERA, C. E.; RIORDAN, M.; WHASHINGTON, G.; SCHECHTER. A. N. AND NOGUCHI, C. T. – Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. **Exp Hematol** , **28**: 1423-1431, 2000.
- JANE, S. M. – Understanding Fetal Globin Gene Expression: A Step Towards Effective HbF Reactivation in Haemoglobinopathies. **Br J Haematol**, **102**: 415-422, 1998.
- JENSTER, G.; SPENCER, T. E.; BURCIN, M. M.; TSAI, S. Y.; TSAI, M. J. AND O'MALLEY, B.W. – Steroid receptor induction of gene transcription: A two-step model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , **94**: 7879-7884, 1997.
- KAUFMAN, R.E. – Hydroxyurea: Specific Therapy for Sickle Cell Anemia? **Blood**, **79**: 2503-2506, 1992.
- LAVRIJSEN, K. L. & VERWILGHEN, R. L. – The Effect Progesterone on Hemoglobin Synthesis in Suspension Cultures of Fetal Erythroid Cells From Calf Liver. **Biochim Biophys Acta**, **803**: 290- 301, 1984.
- LIU, Z; WONG, J; TSAI, S. Y.; TSAI, M. J. AND O'MALLEY, B. W. – Steroid receptor coactivator-1 (SCR-1) enhances ligand-dependent and receptor dependent cell-free transcription of chromatin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , **96**: 9485-9490, 1999.
- LIU, Z; WONG, J; TSAI, S. Y; TSAI, M. J. AND O'MALLEY, B. W. – Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor

- dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **98**: 12426-12431, 2001.
- LOKEN, M. R.; SHAH, V. O.; DATTILIO, K. L. AND CIVIN, C. I. – Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow: I. Normal Erythroid Development. **Blood**, **69**: 255-263, 1987.
- MANKAD, V.N.; BALIGA, S.; PHILIPS, K.; SHAH, A. K. AND YANG, Y. M. – Relationship of Burst-Forming-Unit-Erythroid Progenitors and Their DNA-Synthesis Stage to Fetal Hemoglobin Levels in Hydroxyurea-Treated Patients With Sickle Cell Anemia. **Am J Hematol**, **46**: 259-263, 1994.
- MANOR, D.; RACHMILEWITZ, E. A. AND FIBACH, E. – Improved Method for Diagnosis of Polycythemia Vera Based on Flow Cytometric Analysis of Autonomous Growth of Erythroid Precursors in Liquid Culture. **Am J Hematol**, **54**:47-52, 1997.
- MILLER, J. L.; NJOROGE, J. M.; GUBIN, A. N. AND RODGERS, G. P. – Prospective identification of erythroid elements in cultured peripheral blood. **Exp Hematol**, **27**: 624-629, 1999.
- MINEGISHI, N.; OHTA, J.; SUWABE, N.; NAKAUCHI, H.; ISHIHARA, H.; HAYASHI, N. AND YAMAMOTO, M. – Alternative Promoters Regulate Transcription of the Mouse GATA-2 Gene. **J Biol Chem**, **273**: 3625-3634, 1998.
- NAGEL, R L & STEINBERG, M. H. – Hemoglobins of the Embryo and Fetus and Minor Hemoglobins of Adults. In: Steinberg M H, Forget B G, Higgs D R, Nagel R L, eds. **Disorders of Hemoglobin**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001: 197-230.
- OLIVIERI, N. F. & WEATHERALL, D. J. – The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. **Human Molecular Genetics**, **7**: 1655-1658, 1998.
- ORKIN, S. H. & WEISS, M. J. – Cutting red-cell production. **Nature**, **40**: 433-435, 1999.
- ORKIN, S. H. – GATA-Binding Transcription Factors in Hematopoietic Cells. **Blood**. **80**: 575 – 581, 1992.
- ORKIN, S. H. – Transcription Factors and Hematopoietic Development. **J Biol Chem** , **270**: 4955-4958, 1995.

- OWENS, M. A. & LOKEN, M. R. – **Flow cytometry principles for clinical laboratory practice**. New York – EUA. Ed. Wiley Liss. (1995) 224p.
- PAPAVASSILIOU, A. G. – Transcription Factors. **The New England Journal of Medicine** **332**: 45-47, 1995.
- PERLINGEIRO, R. C. R. – Estudo Comparativo do crescimento e diferenciação de progenitores eritróides de sangue periférico em pacientes eritrofalcêmicos SS, SC e S/β talassemia. Campinas, 1997. 18-23p. **Tese de Doutorado**. Unicamp, 1997.
- PERSONS, D. A.; ALLAY, J. A.; ALLAY, E. R.; ASHMUN, R. A.; ORLIC, D.; JANE, S. M.; *et al.* – Enforced Expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. **Blood**, **93**: 488-499, 1999.
- PEVNY, L.; LIN, C. S.; D'AGATI, V.; SIMON, M. C.; ORKIN, S. H. AND CONSTANTINI, F. – Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. **Development**, **121**: 163-172, 1995.
- PISSARD, S. AND BEUZARD, Y. A. – Potential Regulatory Region for the Expression of Fetal Hemoglobin in Sick Cell Disease. **Blood**, **84**: 331-338, 1994.
- POLITOU, M.; KOLLIA, P.; AKEL, S.; PAPASSOTIRIOU, Y.; STAMOULAKATOU, A. AND LOUKOPOULOS, D. – Valproic acid, trichostatin and their combination with hemin preferentially enhance γ-globin gene expression in human erythroid liquid cultures. **Haematologica** , **86**: 700-705, 2001.
- POPE, S. H.; FIBACH, E.; SUN, J.; CHIN, K. AND RODGERS, G. P. – Two-phase liquid culture system models normal human adult erythropoiesis at the molecular level. **European Journal of Haematology** , **64**: 292-303, 2000.
- QUENTMEIER, H.; ZABORSKI, M. AND DREXLER, H. G. – The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. **Leuk Res** , **21**: 343-350, 1997.
- RACHMILEWITZ, E. A. – Novel Treatment Options in the Severe β-Globin Disorders. *British Journal of Haematology*. 91:263-268, 1995. Quentmeier, H., Zaborski, M. and Drexler, H. G. The Human Bladder Carcinoma Cell Line 5637 Constitutively Secretes Functional Cytokines. **Leuk Res**, **21**: 343-350, 1997.

- RATH, A. V.; SCHMAHL, G. E. AND NIEMEYER, C. M. – Expression of transcription factor during sodium phenylacetate induced erythroid differentiation in K562 cells. **Blood Cells, Mol Dis**, **23**: 27-38, 1997.
- RODGERS, G. P. – Overview of Pathophysiology and Rationale for Treatment of Sick Cell Anemia. **Semin Hematol**, **34**:2-7, 1997.
- SALEH, A. W. & HILLEN, H. F. P. – Pharmacological induction of foetal haemoglobin synthesis in sickle cell disease. **Netherlands Journal of Medicine**, **51**: 169-178, 1997.
- SALEH, A.W.; DITS, A. J.; GERBERS, A.; VRIES, C. AND HILLEN, H.F.P. – Cytokines and Soluble Adhesion Molecules in Sick Cell Anemia Patients during Hydroxyurea Therapy. **Acta Haematol**, **100**: 26-31, 1998.
- SHIVDASANI, R. A. AND ORKIN, S. H. – Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 8690 – 8694, 1995.
- SHIVDASANI, R. A. AND ORKIN, S. H. – The transcriptional control of hematopoiesis. **Blood**, **87**: 4025-4039, 1996.
- SMITH, R. D.; LI, J.; NOGUCHI, C. T. AND SCHECHTER, A. N. – Quantitative PCR analysis of HbF inducers in primary human adult erythroid cells. **Blood**, **95**: 863-869, 2000.
- STAMATOYANNOPOULOS, G. AND NIENHUIS, A. W. – Hemoglobin Switching. **The Molecular Basis of Blood Diseases**, ed by Stamatoyannopoulos G. Nienhuis A. W., Majerus P.W., Varmus H., pp33-69, W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1994.
- STEINBERG, M. H. – Determinants of Fetal Hemoglobin Response to Hydroxyurea. **Semin Hematol**, **34**: 8-14, 1997.
- TAKAHASHI, S.; KOMENO, T.; SUWABE, N.; YOH, K.; NAKAJIMA, O; NISHIMURA, S.; *et al.* – Role of GATA-1 in Proliferation and Differentiation of Definitive Erythroid and Megakaryocytic Cells In Vivo. **Blood**, **92**: 434-442, 1999.
- TOKI, T.; ARAI, K.; TERUI, K.; KOMATSU, N.; YOKOYAMA, M.; KATSUOKA, F.; *et al.* – Functional characterization of the two alternative promoters of human p45NF-E2 gene. **Exp Hematol**, **28**: 1113-1119, 2000.
- TRUSS, M. & BEATO M. – Steroid Hormone Receptors: Interaction with Deoxyribonucleic Acid and Transcription Factors\*. **Endocrine Reviews**, **14** (4): 459- 479, 1993.

- TSAI, F.Y. & ORKIN, S.H. – Transcription Factor GATA-2 Is Required for Proliferation/Survival of Early Hematopoietic Cells and Mast Cell Formation, But Not for Erythroid and Myeloid Terminal Differentiation. **Blood**, **89**: 3636-3643, 1997.
- TSANG, A.P.; VISVADER, J.E.; TURNER, C.A; FUJIWARA, Y.; YU, C.; WEISS, M.J.; CROSSLEY, M. AND ORKIN, S. H. – FOG, a Multitype Zinc Finger Protein, Acts as a Cofactor for Transcription Factor GATA-1 in Erythroid and Megakaryocytic Differentiation. **Cell**, **90**: 109-119, 1997.
- WADA, H.; SUDA, T.; MIURA, Y.; KAJII, E.; IKEMOTO, S. AND YAWATA, Y. – Expression of Major Blood Group Antigens on Human Erythroid Cells in a Two Phase Liquid Cultures System. **Blood**, **75**: 505-511, 1990.
- WEINBERG, R. S.; THOMSON J. C.; LAO, R.; CHEN, G. AND ALTER B. P. – Stem Cell Factor Amplifies Newborn and Sickle Erythropoiesis in Liquid Cultures. **Blood**, **81**: 2591-2599, 1993.
- WEISS, M. J.; YU, C. AND ORKIN, S. H. – Erythroid-Cell-Specific Properties of Transcription Factor GATA-1 Revealed By Phenotypic Rescue of a Gene-Targeted Cell Line. **Mol Cell Biol**, **17**: 1642-1651, 1997.
- YANG, Y. M.; PACE, B; KITCHENS, D.; BALLAS, S. K.; SHAH, A. AND BALIGA B. S. – BFU-E Colony Growth in Response to Hydroxyurea: Correlation Between In Vitro and In Vivo Fetal Hemoglobin Induction. **Am J Hematol**, **56**: 252-258, 1997.