



FERNANDA MARCONI ROVERSI



**ESTUDO DOS POTENCIAIS MECANISMOS MOLECULARES  
RELACIONADOS À EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM  
PORTADORES DE PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DE  
HEMOGLOBINA FETAL NÃO DELECIONAL TIPO  
BRASILEIRA**

CAMPINAS

2011



FERNANDA MARCONI ROVERSI

**ESTUDO DOS POTENCIAIS MECANISMOS MOLECULARES RELACIONADOS  
À EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM PORTADORES DE PERSISTÊNCIA  
HEREDITÁRIA DE HEMOGLOBINA FETAL NÃO DELECIONAL TIPO  
BRASILEIRA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

**ORIENTADOR:** PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

**CO-ORIENTADOR:** ANDERSON FERREIRA DA CUNHA

CAMPINAS

UNICAMP

2011

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

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

R769e Roversi, Fernanda Marconi, 1981-  
Estudo dos potenciais mecanismos moleculares relacionados à expressão gênica diferencial em portadores de persistência hereditária de hemoglobina fetal não deletional tipo brasileira. / Fernanda Marconi Roversi. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Fernando Ferreira Costa  
Coorientador : Anderson Ferreira da Cunha  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Expressão Gênica. 2. Fatores de Transcrição. 3. Hemoglobina Fetal. 4. Hemoglobinopatias. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Cunha, Anderson Ferreira da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês: Study of potential molecular mechanisms related to differential gene expression in Brazilian type of hereditary persistence of fetal hemoglobin**

**Keywords:** • Gene Expression  
• Transcription Factors  
• Fetal Hemoglobin  
• Hemoglobinopathies

**Titulação:** Doutor em Fisiopatologia Médica

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa [Orientador]

Prof. Dr. Aderson da Silva Araújo

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Profa. Dra. Fabíola Traina

Prof. Dr. José Orlando Bordin

**Data da defesa:** 31-10-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

---

# Banca examinadora da tese de Doutorado

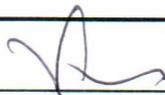
Fernanda Marconi Roversi

---

---

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa

---



---

## Membros:

---

1. Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa

---

2. Prof(a). Dr(a). Aderson da Silva Araújo

---

3. Prof(a). Dr(a). Licio Augusto Velloso

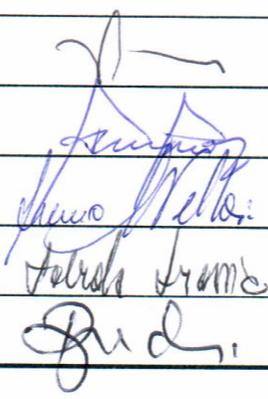
---

4. Prof(a). Dr(a). Fabiola Traina

---

5. Prof(a). Dr(a). José Orlando Bordin

---



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 31/10/2011

---



“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes ...  
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
Se tornar um autor da própria história...  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar  
Um oásis no recôndito da sua alma...  
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!  
É ter segurança para receber uma crítica,  
Mesmo que injusta...  
Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

**Fernando Pessoa**



# DEDICATÓRIA

---

Dedico esta Tese  
A duas pessoas muito importantes,  
Mammy (Sueli) e Pappy (José Antonio)...  
que como diz a música  
“Assim como o ar me parece vital.  
Onde quer que eu vá, o que quer que eu faça.  
Sem vocês não tem graça.”



# AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando, pela proposta do trabalho, que começou em suas mãos, pela orientação e por enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas.

Ao meu co-orientador, Dr. Anderson, por seus ensinamentos e valiosas discussões, por seu incentivo e apoio em todos os momentos.

À FAPESP, CNPq e INCTS por financiarem este estudo.

À Banca do Exame de Qualificação e à Banca Examinadora da Tese pela participação e contribuição na avaliação crítica do trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Hemoglobina e Genoma – aos que já estavam quando cheguei Ana Flávia, Camila, Carlinha, Carol, Cíntia, Flávia Boca, Nic, Marcos André e Mari, Renata, Sheley; aos que chegaram depois Andrey, Angélica, Dani, Diana, Flavinha, Flávia Lopes, Kléber, Liciano, Pedro, Tati, Vanessa, Venina – com os quais pude aprender, discutir, somar, dividir e compartilhar interesses comuns na busca de conhecimento.

À Rê por ser uma super amiga e uma importante fonte de apoio intelectual e afetivo.

À Emília por ser uma super “mãe”, apoiando sempre.

À Duli pela paciência, pelos conselhos e pela amizade. “Fala Duli”

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

À Elisete e Ivete, por toda ajuda – quebra-galho – e atenção.

Aos indivíduos portadores de ndPHHF-B e aos controles pela colaboração tão importante para a realização da pesquisa e para o aprimoramento do nosso aprendizado.

A todo o pessoal do ambulatório, agendamento, coleta, doação, hematologia, marcadores celulares, apoio didático, lavagem, limpeza, almoxarifado e portaria do Hemocentro da UNICAMP, por suas inúmeras formas de contribuição.

Ao Laboratório de Genômica e Expressão, especialmente ao Marcelo, pelas análises realizadas.

Ao HEMOPE (PE), à Fiocruz de Salvador (BA) e ao Hemocentro de Porto Alegre (RS) por gentilmente terem cedido amostras de DNA de pacientes com anemia falciforme.

Aos meus pais por serem a minha referência de tantas maneiras e estarem sempre presentes na minha vida de uma forma indispensável.



# SUMÁRIO

---

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	29
1 – Genes das Globinas e Hemoglobinas.....	31
2 – Regulação dos genes das globinas.....	33
A – Elementos Regulatórios <i>cis</i> .....	33
B – Fatores de Transcrição.....	34
3 – Alterações das hemoglobinas.....	34
A – Anemia Falciforme.....	35
B – Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF).....	35
B.1 – PHHF Delecional.....	36
B.2 – PHHF Não Delecional.....	37
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	41
1 – Objetivo Geral.....	43
2 – Objetivos Específicos.....	43
<b>III. CASUÍSTICA</b> .....	45
1 – Critérios de Inclusão.....	47
2 – Critérios de Exclusão.....	47
3 – Portadores de PHHF não delecional tipo Brasileira.....	47
4 – Índices Hematimétricos.....	51
5 – Aspectos Éticos.....	52
<b>IV. CAPÍTULO 1: INTERAÇÃO ENTRE FATORES DE TRANSCRIÇÃO E A REGIÃO –195 DO PROMOTOR DO GENE DA GLOBINA <math>\gamma^A</math></b> .....	53
1. OBJETIVO.....	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.1 – Linhagem Celular K562.....	55
2.2 – Cultura eritroide primária.....	52
A – Separação de Células Mononucleares.....	55
B – Isolamento de Células CD34 <sup>+</sup> do sangue periférico.....	56

C – Cultivo de Células CD34 <sup>+</sup> .....	56
D – Confeção de lâminas – citospin.....	57
E – Marcadores de superfície celular e de HbF.....	57
2.3 – Expressão dos Genes das Globinas.....	58
A – Extração de RNA.....	58
B – Síntese de cDNA.....	58
C – PCR em Tempo Real.....	59
2.4 – Interação entre os Fatores de Transcrição e o promotor do gene da globina $\gamma^A$ .....	60
A – Extração Nuclear.....	60
B – <i>Super Gel Shift</i> .....	61
C – <i>Array DNA-proteína</i> .....	62
D – <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> .....	63
E – Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP) .....	64
3. RESULTADOS.....	66
3.1 – A presença da mutação –195 não altera a interação dos fatores MAZ e WT1.....	66
3.2 – Interação de fatores de transcrição.....	70
A – Análise da concentração de hemoglobinas no sangue periférico dos indivíduos controles e dos portadores de ndPHHF-B.....	70
B – Diferenciação eritroide – Morfologia.....	71
C – Diferenciação eritroide – Marcadores de superfície celular.....	72
D – Aumento na produção de HbF na cultura de portadores de ndPHHF-B.....	73
E – Aumento na produção de cadeias das globinas na cultura de portadores de ndPHHF-B.....	74
F – Aumento na expressão do gene das globinas $\gamma$ na cultura de portadores de ndPHHF-B.....	75
G – Análise do <i>Array DNA-proteína</i> revelou uma série de fatores de transcrição <b>com</b> diferença de atividade.....	77
H – Ensaio de <i>EMSA</i> mostram a atividade diminuída do fator de transcrição <i>NF-E1/YY1</i> e aumentada do <i>PAX1</i> na presença da mutação –195.....	80
I – Ensaio de ChIP evidencia um menor recrutamento do <i>NF-E1/YY1</i> e maior do <i>PAX1</i> na presença da mutação –195.....	81

<b>V. CAPÍTULO 2: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS na ndPHHF BRASILEIRA.....</b>	<b>85</b>
1. OBJETIVOS.....	87
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
2.1 –Células eritroides – reticulócitos.....	87
A – Separação de Reticulócitos.....	87
B – Extração de Proteínas de Reticulócitos.....	88
C – Extração de RNA de Reticulócitos.....	88
D – Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	88
E – PCR em Tempo Real.....	88
2.2 - Biblioteca Subtrativa.....	89
A – Síntese e amplificação de cDNAs.....	89
B – Digestão com <i>RsaI</i> .....	90
C – Ligação dos Adaptadores.....	91
D – Hibridizações.....	91
E – Amplificação dos Transcritos.....	92
F – Clonagem, Amplificação e Sequenciamento dos clones.....	94
G – Análise das sequências geradas.....	95
H – PCR em Tempo Real .....	95
2.3 Genes Diferencialmente Expressos e suas respectivas Proteínas.....	96
3. RESULTADOS.....	97
3.1 – Análise da expressão gênica evidencia o aumento na expressão do gene das globinas $\gamma$ em reticulócitos de portadores de ndPHHF-B.....	97
3.2 – Análise diferencial aponta uma série de genes diferencialmente expressos entre controles e portadores de ndPHHF-B.....	98
A – Síntese e amplificação de cDNAs.....	99
B – Digestão com <i>RsaI</i> .....	100
C – Hibridizações.....	101
D – Amplificação dos Transcritos.....	102
E – Clonagem, Amplificação e Sequenciamento.....	103

F – Análise das sequências geradas nas Bibliotecas Subtrativas.....	104
G – Validação da Biblioteca Subtrativa.....	105
G.1 – Padronização dos <i>primers</i> de <i>FOXO3a</i> , <i>HOOK3</i> , <i>MKRN1</i> , e <i>PPM1A</i> .....	105
G.2 – Validação dos resultados das Bibliotecas Subtrativas.....	108
3.3 – Análise comparativa da expressão gênica evidencia uma hipoexpressão dos genes <i>MIER1</i> e <i>HOOK3</i> e uma hiperexpressão dos genes <i>FOXO3a</i> , <i>MKRN1</i> , e <i>PPM1A</i> em reticulócitos de portadores de ndPHHF-B.....	109
3.4 – Produção da proteína Foxo3a é aumentada em reticulócitos de ndPHHF-B.....	110
<b>VI. CAPÍTULO 3: MUTAÇÃO –195 NO PROMOTOR DO GENE DA GLOBINA <math>\gamma^A</math></b>	
<b>EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.....</b>	<b>111</b>
1. OBJETIVO.....	113
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	113
2.1 – Pacientes com Anemia Falciforme.....	113
2.2 – D-HPLC.....	113
A – Extração de DNA Genômico.....	113
B – Amplificação do gene da globina $\gamma^A$ .....	114
C – Padronização da técnica de <i>D-HPLC</i> .....	114
D – Análise de <i>D-HPLC</i> .....	115
E – Sequenciamento.....	115
3. RESULTADOS.....	116
3.1 – Amplificação específica do promotor do gene da globina $\gamma^A$ .....	116
3.2 – Padronização da técnica de D-HPLC em amostras controles e mutadas.....	116
3.3 – Análise dos resultados do D-HPLC evidencia perfil cromatográfico diferente.....	117
<b>VII. DISCUSSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>VIII. CONCLUSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>137</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>151</b>
ANEXO 1 – ESQUEMA <i>ARRAY</i> DNA-PROTEÍNA.....	153
ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	155
ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	157

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ACD	Adenosina Citrato Dextrose
<i>AHSP</i>	<i>Alpha hemoglobin stabilizing protein</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
ChIP	Imunoprecipitação de Cromatina
CTRL	Controle
DEPC	Dietilpirocarbonato
dHPLC	Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance
DNA	Ácido Desoxiribunucleico
<i>DNAseI</i>	Desoxirribunuclease I
dNTP	Deoxinucleotídio Trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
<i>EMSA</i>	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EPO	Eritropoetina humana
<i>FAM46C</i>	<i>Family with sequence similarity 46, member C</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
<i>FOXO3a</i>	<i>Forkhead box O3A</i>
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
<i>GATA-1</i>	<i>GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)</i>
HbA	Hemoglobina A
HbA <sub>2</sub>	Hemoglobina A <sub>2</sub>
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HCl	Cloreto de Potássio

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanesulfúrico
<i>HOOK3</i>	<i>Hook homolog 3 (Drosophila)</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IL-3	Interleucina-3
IPTG	Isopropil β-D-tio-galactosídeo
kb	Kilobases
KCl	Cloreto de Potássio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-hidrogenofosfato de Potássio
<i>KLF</i>	<i>Kruppel-like factor 1 (erythroid)</i>
LCR	<i>Locus Control Region</i>
<i>MAZ</i>	<i>MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
<i>MIER1</i>	<i>Mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)</i>
<i>MKRN1</i>	<i>Makorin ring finger protein 1</i>
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Sódio
<i>NF-E1/YY1</i>	<i>YY1 transcription factor</i>
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de Amônio
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Amônio
<i>PAX1</i>	<i>Paired box 1</i>
pb	Pares de base
PBS	Salina Tamponada Fosfatada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
ndPHHF-B	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal não deletional tipo Brasileira

<i>PI4K2A</i>	<i>Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha</i>
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
<i>PPM1A</i>	<i>Protein phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent, 1A</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por min
SCF	<i>Stem Cell factor</i> ou fator de célula tronco
SDS	Dodicilsulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
<i>TCEA1</i>	<i>Transcription elongation factor A (SII)</i>
TEAA	Acetato de Trietilamônio
UA	Unidades Arbitrárias
UV	Ultravioleta
<i>WT-1</i>	<i>Wilms tumor 1</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galacto-piranoside



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> <i>Expressão dos genes das globinas</i> .....	32
<b>Figura 2:</b> <i>Tipos de PHHF deletoriais</i> .....	37
<b>Figura 3:</b> <i>HPLC de Hemoglobinas</i> .....	48
<b>Figura 4:</b> <i>HPLC de Cadeias Globínicas</i> .....	49
<b>Figura 5:</b> <i>Genotipagem do promotor do gene da globina <math>\gamma^A</math></i> .....	50
<b>Figura 6:</b> <i>Padronização das concentrações das sondas biotiniladas</i> .....	67
<b>Figura 7:</b> <i>Padronização do Tampão de Ligação para os ensaios de Super Gel Shift</i> .....	68
<b>Figura 8:</b> <i>Análise de Super Gel Shift para os fatores de transcrição MAZ, WT1 e GATA1</i> .....	69
<b>Figura 9:</b> <i>Diferenciação eritroide – Ilustração da morfologia celular nos 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias de uma das culturas eritroides</i> .....	71
<b>Figura 10:</b> <i>Diferenciação eritroide – Ilustração da citometria de fluxo dos marcadores de superfície celular nos 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias de uma das culturas eritroides</i> .....	72
<b>Figura 11:</b> <i>Produção de HbF avaliada através de citometria de fluxo</i> .....	73
<b>Figura 12:</b> <i>HPLC de cadeias globínicas de uma das culturas eritroides</i> .....	74
<b>Figura 13:</b> <i>Integridade dos RNA</i> .....	75
<b>Figura 14:</b> <i>Amplificação do gene endógeno <math>\beta</math>-actina</i> .....	76
<b>Figura 15:</b> <i>Expressão do Gene da Globina <math>\gamma</math> avaliada por PCR em Tempo Real</i> .....	77
<b>Figura 16:</b> <i>Análise densitométrica de 6 fatores de transcrição identificados através de Array DNA-proteína</i> .....	79
<b>Figura 17:</b> <i>Análise de EMSA para os fatores de transcrição NF-E1/YY1 e PAX1</i> .....	81
<b>Figura 18:</b> <i>Temperatura de dissociação do primer promotor do gene da globina <math>\gamma^A</math></i> .....	82
<b>Figura 19:</b> <i>Análise da eficiência de amplificação do primer promotor do gene <math>\gamma^A</math></i> .....	82
<b>Figura 20:</b> <i>Curva padrão do INPUT referente a cada população em análise</i> .....	84
<b>Figura 21:</b> <i>Quantificação da interação entre os fatores de transcrição NF-E1/YY1 e PAX1 à região promotora do gene da globina <math>\gamma^A</math></i> .....	84

<b>Figura 22:</b> Esquema das etapas envolvidas na construção das Bibliotecas Subtrativas.....	93
<b>Figura 23:</b> Expressão dos genes das $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ em RNA de reticulócitos de indivíduos controles e de portadores de ndPHHF-B.....	98
<b>Figura 24:</b> Qualidade dos RNAs.....	98
<b>Figura 25:</b> Análise da Síntese de cDNAs.....	99
<b>Figura 26:</b> Expressão dos genes das $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ nas amostras de cDNAs no pool de RNA extraído de reticulócitos de indivíduos controles (CTRL) e de portadores de ndPHHF-B.....	99
<b>Figura 27:</b> Padronização do número ótimo de ciclos da LD-PCR.....	100
<b>Figura 28:</b> Verificação da digestão dos cDNAs com RsaI e da purificação.....	101
<b>Figura 29:</b> 1ª (PCR) e 2ª (Nested PCR) Amplificações do cDNA subtraído.....	102
<b>Figura 30:</b> Amplificação por PCT de alguns inóculos positivos para o inserto.....	103
<b>Figura 31:</b> Amplificação por PCR dos genes FOXO3a, HOOK3, MKRN1 e PPM1A.....	105
<b>Figura 32:</b> Temperatura de dissociação dos primers FOXO3a, HOOK3, MKRN1 e PPM1A.....	106
<b>Figura 33:</b> Eficiência de amplificação dos primers FOXO3a, HOOK3, MKRN1 e PPM1A.....	107
<b>Figura 34:</b> Validação dos resultados nas Bibliotecas Subtrativa por PCR em Tempo Real.....	108
<b>Figura 35:</b> Análise da expressão dos genes AHSP, FOXO3a, HOOK3, MKRN1, MIER1, e PPM1A por PCR em Tempo Real.....	109
<b>Figura 36:</b> Expressão proteica Foxo3a em reticulócitos analisada por Western Blotting.....	110
<b>Figura 37:</b> Amplificação de parte da região promotora do gene da globina $\gamma^A$ .....	116
<b>Figura 38:</b> Padronização do ensaio de D-HPLC.....	117
<b>Figura 39:</b> Padrão observado no D-HPLC em 8 pacientes com anemia falciforme.....	117
<b>Figura 40:</b> Eletroferograma referente à parte da região promotora do gene da globina $\gamma^A$ de um paciente com anemia falciforme com a deleção de 4pb.....	118
<b>Figura 41:</b> Representação esquemática do mecanismo molecular de reativação do gene da globina $\gamma^A$ na ndPHHF tipo Brasileira.....	126

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela I:</b> Índices hematológicos dos 10 portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira.....	51
<b>Tabela II:</b> Índices hematológicos dos 10 indivíduos controles.....	51
<b>Tabela III:</b> Sequências de sondas utilizadas no <i>Super Gel Shift</i> .....	61
<b>Tabela IV:</b> Sequência do par de <i>primer</i> utilizados na quantificação dos imunoprecipitados.....	65
<b>Tabela V:</b> Porcentagem de HbF e de HbA2 dos indivíduos selecionados para a realização da cultura eritroide.....	70
<b>Tabela VI:</b> Análise densitométrica de alguns fatores de transcrição que apresentaram diferença em sua atividade de ligação ao DNA entre os controles e os portadores de ndPHHF-B.....	78
<b>Tabela VII:</b> Sequência, temperatura de desnaturação, tamanho dos fragmentos amplificados, concentração ótima e eficiência do <i>primers</i> promotor do gene da globina $\gamma^A$ .....	83
<b>Tabela VIII:</b> Sequência de cada par de <i>primers</i> e concentração ótima utilizada para a amplificação dos genes das globinas.....	89
<b>Tabela IX:</b> Sequência dos <i>primers</i> e concentração ótima utilizada para a amplificação de alguns genes diferencialmente expressos encontrados nas Bibliotecas Subtrativas.....	96
<b>Tabela X:</b> Identificação de alguns genes encontrados nas SSHs. Os <i>reads</i> totais se referem ao número de vezes que o gene foi identificado, sendo descrito o número de vezes encontrado em cada uma das bibliotecas ( <i>reads</i> CTRL ou <i>reads</i> PHHF).....	104
<b>Tabela XI:</b> Sequência, temperatura de desnaturação, tamanho dos fragmentos amplificados, concentração ótima e eficiência de cada par de <i>primers</i> desenhado.....	107



## RESUMO

---

Durante o desenvolvimento ontogenético, ocorrem alterações na expressão dos genes das globinas, caracterizando o *switching* de hemoglobina. Após o nascimento há o silenciamento do gene da globina  $\gamma$  concomitante à ativação do gene da globina  $\beta$ . Todavia, algumas deleções gênicas no grupamento dos genes das globinas e algumas mutações de ponto no promotor do gene da globina  $\gamma$  são responsáveis pela expressão continuada do gene da globina  $\gamma$ , resultando em níveis elevados de hemoglobina fetal (HbF) na vida adulta, caracterizando, respectivamente, a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal deletional e a não deletional (ndPHHF). A mutação de ponto C→G na posição -195 do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  caracteriza a ndPHHF tipo Brasileira (ndPHHF-B), com aumento nos níveis de HbF entre 6% e 16%. Todavia, o mecanismo molecular responsável pela reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF-B não está elucidado. Estudos anteriores demonstraram que na ndPHHF tipo Brasileira (-195) a elevação nos níveis de HbF não é mediada pelo aumento na afinidade com o fator de transcrição *SP1*, como ocorre na ndPHHF-B tipo Inglesa (-198). Na tentativa de compreender o mecanismo responsável pelo fenótipo de ndPHHF-B, buscamos identificar outros fatores de transcrição envolvidos na reativação do gene da globina  $\gamma^A$  nessa ndPHHF-B. Os resultados obtidos através de ensaios de *Array* DNA-proteína, EMSA e ChIP mostraram uma alteração na interação de dois fatores de transcrição: *NF-E1/YY1* e *PAX1*. A mutação -195 C→G abole o sítio de ligação para o *NF-E1/YY1* e aumenta a interação do *PAX1*, um ativador da transcrição, com o promotor do gene da globina  $\gamma^A$ , possivelmente levando à reativação desse gene. Também investigamos o possível envolvimento de outros genes que poderiam estar relacionados à manutenção dos níveis elevados de HbF, construindo Bibliotecas Subtrativas Supressivas para identificar transcritos diferencialmente expressos em reticulócitos de portadores de ndPHHF-B. Os resultados apontam para uma possível participação do gene *MIER1* no *switching* da hemoglobina fetal para a adulta, uma vez que esse gene, responsável pelo remodelamento de cromatina e consequente silenciamento gênico, apresentou expressão diminuída em portadores

de ndPHHF-B. Identificamos ainda outro gene, o *KLF1*, com expressão diminuída nesses indivíduos, o que pode favorecer a interação entre o gene da globina  $\gamma^A$  e o *LCR*. Nossos resultados fornecem a primeira evidência *in vitro* do provável mecanismo molecular envolvido na reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF tipo Brasileira.

**Palavras Chave:** Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal, Regulação Gênica, Fatores de Transcrição, *Switching* de Hemoglobina

## ABSTRACT

---

Hemoglobin switching occurs after birth resulting in a decrease in gamma globin gene expression. Although, some single point mutation in this gene are able to maintain its expression during adult life, leading to increased production of fetal hemoglobin (HbF) which characterize the non deletion Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (ndHPFH). Among these, the Brazilian type of ndHPFH corresponds to the C→G substitution at the –195 position of the A gamma globin gene. However, the molecular mechanism responsible for this phenotype still unclear. In contrast to the British ndHPFH type (–198), where the mechanism responsible for the increase of HbF levels is mediated by the raising in the affinity for the *SP1* transcription factor, the Brazilian ndHPFH mutation does not affect Sp1 binding. In order to elucidate this mechanism, we tried to identify others transcription factors involved in the reactivation of the A gamma globin gene in the Brazilian ndHPFH. Alterations in the binding of two transcription factors were identified by DNA-protein Array, EMSA and ChIP: *NF-E1/YY1* and *PAX-1*. Our results suggest that the –195C→G in the A gamma globin promoter may abrogate *NF-E1/YY1* binding and increase *PAX-1* binding in this DNA region, probably resulting in the reactivation of this gene. We also investigate others genes that may be involved in hemoglobin switching and/or maintenance of elevated HbF levels in Brazilian ndHPFH using Suppression Subtractive Hybridization Library to identify transcripts that are differentially expressed in reticulocytes of ndHPFH Brazilian subjects. *MIER1* expression was found to be decreased in Brazilian ndHPFH reticulocytes, compared to controls. The *MIER1* gene is able to chromatin-remodeling leading to the formation of heterochromatin and, consequently, silencing genes. This *MIER1* may be an important gene in gamma to beta globin gene switching, where it could help in the maintenance of a closed chromatin structure in the gamma globin gene in individuals with low HbF levels. Another gene identified was *KLF1* which expression was decreased in Brazilian HPFH and favors the interaction between the A gamma globin gene and the LCR. These results provide the first *in vitro* evidence for the possibly molecular mechanism of reactivation of the A gamma globin gene in Brazilian nHPFH.



# I. INTRODUÇÃO



## 1 – Genes das Globinas e Hemoglobinas

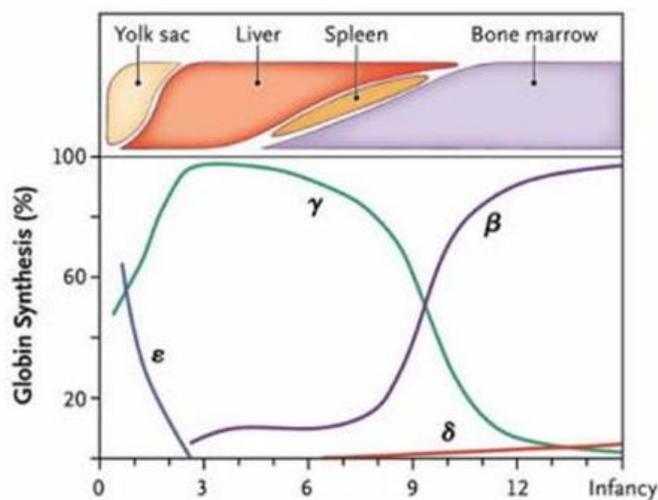
A hemoglobina humana é o principal componente das hemácias, correspondendo a aproximadamente 90% do peso da célula. Essa proteína é uma molécula tetramérica composta por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo alfa ( $\alpha$ ) e duas do tipo beta ( $\beta$ ) (Bunn & Forget, 1986). Cada cadeia possui um grupo prostético heme com um íon ferro em seu centro, o qual se liga reversível e não covalentemente a uma molécula de oxigênio, desempenhando a função de transporte de oxigênio e de gás carbônico, aos tecidos (Perutz, 1983). É uma proteína alostérica, pois a ligação e liberação do oxigênio são reguladas por mudanças na sua estrutura, decorrentes da ligação do oxigênio ao grupo prostético heme (Nussbaum *et al.*, 2004).

Os genes, que expressam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , estão localizados em dois grupamentos cromossômicos diferentes. O grupamento  $\alpha$  está situado no braço curto do cromossomo 16 e codifica as cadeias zeta ( $\zeta$ ) e alfa ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , que não apresentam diferenças em sua região codificante). O grupamento  $\beta$  está localizado no braço curto do cromossomo 11 e codifica as cadeias épsilon ( $\epsilon$ ), gama ( $\gamma^A$  e  $\gamma^G$ , com diferença em apenas um aminoácido na posição 136, alanina e glicina, respectivamente), delta ( $\delta$ ) e beta ( $\beta$ ). A expressão dos genes do grupamento  $\beta$  é controlada por uma região denominada *Locus Control Region* (LCR) que atua adaptando-se ao promotor de cada um dos genes, em períodos específicos do desenvolvimento, levando à formação de cada um dos tipos de hemoglobinas (Stamatoyannopoulos e Grosfeld, 2001).

Durante o período de desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem alterações na expressão dos genes responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobinas (Dzierzak, 2001). No período embrionário, os genes  $\zeta$  e  $\epsilon$  são transcritos e seus respectivos polipeptídios formam a hemoglobina do tipo Gower I ( $\zeta_2\epsilon_2$ ) (Hecht *et al.*, 1966). Por volta da décima semana de gestação, o gene que expressa o polipeptídio da globina  $\alpha$  passa a ser transcrito abundantemente, é expresso durante toda a vida e ocorre a formação da hemoglobina Gower II ( $\alpha_2\epsilon_2$ ). Além dessas, no período embrionário há a produção da hemoglobina Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), uma vez que o gene da globina  $\gamma$  também começa a ser expresso (Gale *et al.*, 1979; Randhawa *et al.*, 1984). Na fase fetal, há a predominância da expressão do gene da globina  $\gamma$ , levando à formação da hemoglobina fetal

(HbF;  $\alpha_2\gamma_2$ ) composta por 75% de cadeias  $\gamma^G$  e 25% de cadeias  $\gamma^A$ . Na fase adulta, a expressão do gene da globina  $\beta$  é abundante e as hemoglobinas dos tipos A (HbA;  $\alpha_2\beta_2$ ) e A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>;  $\alpha_2\delta_2$ ) passam a ser formadas. Em indivíduos adultos, a HbA é predominante, correspondendo a mais de 95% do total de hemoglobina, enquanto que a HbA<sub>2</sub> se mantém em níveis inferiores a 3,5% e a HbF é produzida em níveis inferiores a 1% (Bunn & Forget, 1986; Stamatoyannopoulos & Grosfeld 2001).

No ser humano ocorrem dois *switching* de hemoglobina, que correspondem à inativação de um gene simultaneamente à ativação de outro (figura 1). O primeiro *switching* ocorre por volta da 6ª semana de gestação, quando há a diminuição na expressão do gene da globina  $\epsilon$  concomitante ao aumento da expressão do gene da globina  $\gamma$ . O principal *switching* ocorre após o nascimento, com a diminuição da expressão do gene da globina  $\gamma$  e o aumento da expressão do gene da globina  $\beta$ , levando à diminuição progressiva da produção de HbF e ao aumento da produção de HbA (Amoyal & Fibach, 2007). Esse fato está relacionado a uma afinidade aumentada da HbF pela molécula de oxigênio em relação à HbA, favorecendo a entrega de oxigênio para o feto através da circulação placentária (Hofmann *et al.*, 1995).



**Figura 1:** *Expressão dos genes das globinas.* Durante o desenvolvimento ontogenético ocorre *switching* dos genes das globinas, levando à produção de diferentes hemoglobinas (Sankaran *et al.*, 2010).

## 2 – Regulação dos genes das globinas

A regulação dos genes das globinas localizados no grupamento da globina  $\beta$  envolve a interação entre elementos regulatórios *cis*, que correspondem às sequências localizadas dentro, ao redor ou distantes dos genes, tais como promotores, acentuadores e silenciadores, e fatores de transcrição (Bank 2006).

### A. Elementos Regulatórios *cis*

#### Promotores

As regiões promotoras ficam à montante do início do sítio de transcrição e são fundamentais para o direcionamento correto da transcrição dos genes, uma vez que possuem sítio de ligação para a RNA polimerase e proteínas regulatórias. Os promotores dos genes das globinas  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\beta$  diferem entre si na presença de sítios distintos para a ligação de proteínas regulatórias, resultando na diferença de expressão desses genes durante os estágios de desenvolvimento (Forget, 2001).

#### Acentuadores ou *Enhancers*

Acentuadores são regiões capazes de aumentar os níveis de transcrição de um determinado gene, de modo tecido específico, independentemente da orientação, posição ou distância em relação ao gene. Os acentuadores estão presentes tanto no grupamento  $\alpha$ ,  *$\alpha$ -major regulatory element* (HS-40), quanto no  $\beta$ , *Locus Control Region* (LCR).

O LCR está localizado à montante do grupamento  $\beta$  e consiste de 5 sítios hipersensíveis à enzima *DNAseI*. Durante as etapas de ativação gênica sequencial em linhagem eritroide, fatores específicos ligam-se ao LCR concomitantemente à ligação de complexos pré-transcricionais ao promotor do gene que será expresso naquela fase de desenvolvimento. A ativação da transcrição ocorre quando há o contato direto entre os fatores ligados ao LCR e os complexos pré-transcricionais ligados ao promotor, com conseqüente formação de alças (*looping*). Dessa forma, o

LCR adapta-se ao promotor de cada um dos genes, em períodos específicos: globina  $\epsilon$  no embrionário, globina  $\gamma$  no fetal e globina  $\beta$  no adulto (Spector & Gasser, 2003).

### **Silenciadores**

Elementos silenciadores são regiões do DNA, nos quais se ligam proteínas repressoras da transcrição, diminuindo a expressão dos promotores gênicos. No promotor distal do gene da globina  $\epsilon$  existe uma região silenciadora que controla a repressão autônoma desses gene nos estágios de desenvolvimento fetal e adulto (Raich *et al*, 1992). As sequências localizadas entre os genes das globinas  $\gamma^A$  e  $\delta$  podem ter efeito silenciador.

### **B. Fatores de Transcrição**

Os fatores de transcrição são proteínas que interagem tanto com os elementos regulatórios *cis* quanto entre si, formando uma rede de interações DNA-proteína e proteína-proteína e, dessa forma, podem atuar diretamente na maquinaria transcricional, interagindo com uma determinada região do DNA, ou indiretamente através de modificações na estrutura da cromatina, tais como acetilação e desacetilação de histonas, que irão promover a abertura ou o fechamento dessas regiões do DNA, promovendo ou silenciando a transcrição gênica (Bank 2006).

## **3 – Alterações das hemoglobinas**

Os distúrbios das hemoglobinas podem ser classificados em quatro grupos: (1) alterações estruturais, sendo a hemoglobina S (HbS) a mais importante e freqüente; (2) alterações no ritmo de síntese (redução ou supressão) das cadeias da globina  $\beta$ , conhecidas como síndromes talassêmicas; (3) anomalias no padrão de desenvolvimento ontogenético normal, como a persistência hereditária de hemoglobina fetal; e (4) algumas alterações adquiridas na produção de hemoglobina (Bradley & Ranney, 1973; Weatherall, 1977; Weatherall & Clegg, 1979).

### **A. Anemia Falciforme**

A anemia falciforme é caracterizada por uma mutação de ponto no códon 6 da globina  $\beta$  onde uma Adenina (A) é substituída por uma Timina (T) resultando na substituição do Ácido Glutâmico pela Valina (Glu  $\rightarrow$ Val) e consequente produção da hemoglobina S (Nagel e Platt, 2001). A hemoglobina S é solúvel em seu estado oxigenado. Porém, quando há desoxigenação nos tecidos torna-se relativamente insolúvel e agrega-se em polímeros. Este fenômeno é reversível quando a molécula é novamente oxigenada. Todavia, após alguns ciclos de oxigenação e desoxigenação, a membrana do eritrócito se deforma, torna-se rígida e assume o formato de foice. A polimerização intracelular da HbS desoxigenada é um fator fundamental no processo fisiopatológico e nas manifestações clínicas da anemia falciforme (Ferrone 2004; Ballas, 2001).

### **B. Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF)**

PHHF corresponde a um grupo heterogêneo de alterações genéticas, decorrente de uma falha no *switching* de hemoglobina durante o período pós-natal levando à expressão continuada do gene da globina  $\gamma$  na vida adulta, com consequente aumento na síntese de cadeias da globina  $\gamma$  e nos níveis de HbF (Forget, 1998; Wood *et al.*, 2001). Esse distúrbio genético não está associado a outras manifestações hematológicas nem a variações na morfologia dos eritrócitos (Stamatoyannopoulo & Grosveld, 2001). O aumento nos níveis de HbF é considerado um modulador fenotípico da anemia falciforme e da talassemia beta, hemoglobinopatias que afetam milhões de pessoas em todo o mundo (Wilber *et al.*, 2011).

Do ponto de vista molecular, essa alteração pode ser caracterizada por extensas deleções no grupamento  $\beta$ , PHHF deletional (dPHHF) (Calzolari *et al.*, 1999; Feingold & Forget, 1989; Arcasoy *et al.*, 1997), ou por mutações de ponto na região promotora de ambos os genes da globina  $\gamma$ , PHHF não deletional (ndPHHF) (Stamatoyannopoulos & Grosveld, 2001; Bacolla *et al.*, 1995). Outro tipo de PHHF, sem a presença de mutação de ponto ou de rearranjo cromossomal, foi identificada em 2 indivíduos de uma mesma família, que apresentavam 20% e 24% de HbF, sendo

67% de cadeias  $\gamma^A / (\gamma^A + \gamma^G)$ . A hipótese é que essa PHHF está relacionada à expressão anormal de fatores de transcrição, responsáveis pelo silenciamento do gene da globina  $\gamma$  (Ma *et al.*, 2007).

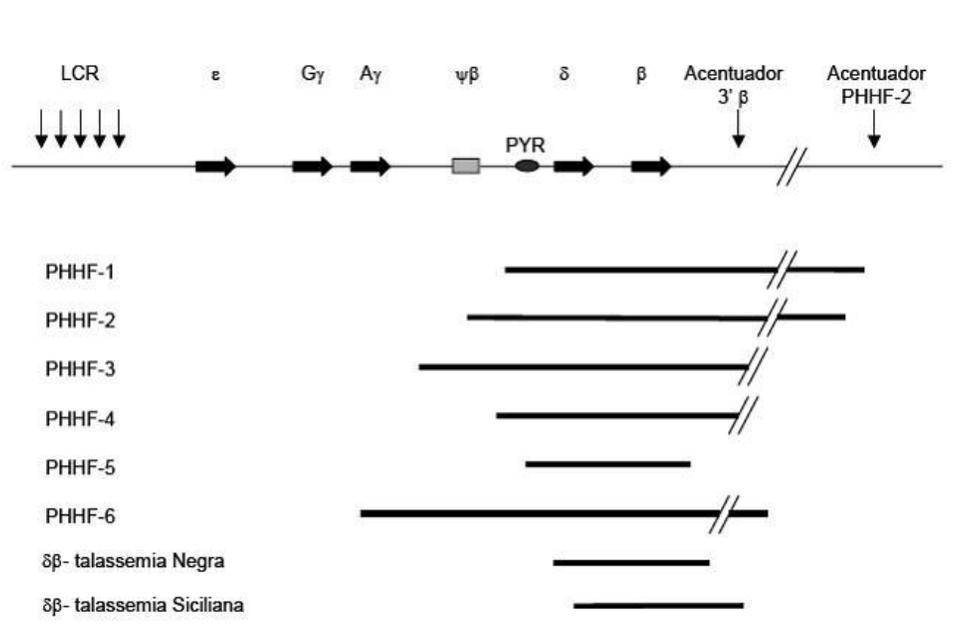
### **B.1 – PHHF Delecional (dPHHF)**

A PHHF delecional está associada a deleções nas sequências de DNA no grupamento da globina  $\beta$ , com preservação do gene da globina  $\gamma$  e consequente aumento, na maioria dos casos, de ambas as cadeias  $\gamma^A$  e  $\gamma^G$ . Os indivíduos heterozigotos para a PHHF delecional apresentam 20% a 30% de HbF do total de hemoglobina celular, com distribuição homogênea (pancelular) nos eritrócitos (Arcasoy *et al.*, 1997; Stamatoyannopoulos & Grosveld, 2001).

O mecanismo responsável pelo aumento dos níveis de HbF devido às deleções observadas na dPHHF não está totalmente elucidado. Algumas hipóteses foram propostas para explicar a expressão continuada do gene da globina  $\gamma$  nessa alteração genética: (1) remoção de regiões competitivas dos genes das globinas  $\delta$  e  $\beta$  que favoreceriam, em condições normais, a interação com o LCR (Townes & Behringer, 1990); (2) remoção de elementos silenciadores, localizados na região entre os genes das globinas  $\gamma^A$  e  $\delta$  (Vitale *et al.*, 2001); ou (3) justaposição dos elementos potencializadores distantes, geralmente presentes na região franqueadora 3' do grupamento da globina  $\beta$ , nas proximidades dos genes da globina  $\gamma$ , responsáveis pelo aumento da expressão gênica (Arcasoy *et al.*, 1997; Katsantoni *et al.*, 2003).

Seis diferentes dPHHFs já foram caracterizadas. Na dPHHF-1 (Africana) há uma extensa deleção incluindo os genes das globinas  $\delta$  e  $\beta$  e o DNA adjacente a essa região (Feingold & Forget, 1989; Huisman *et al.*, 1997). Na dPHHF-2 (Ganense) também ocorre uma grande deleção localizada do gene da globina  $\Psi\beta$  até o da globina  $\beta$  (Collins *et al.*, 1987; Huisman *et al.*, 1997). Na dPHHF-3 (Indiana), a deleção engloba os genes das globinas  $\Psi\beta$  e  $\beta$ , enquanto que a dPHHF-4 (Italiana) estende-se do gene da globina  $\delta$  até o da globina  $\beta$  (Schroeder *et al.*, 1973; Kutlar *et al.*, 1984; Henthorn *et al.*, 1986). A deleção responsável pela dPHHF-5 (Italiana) remove os genes das globinas  $\delta$  e  $\beta$  e termina próximo ao acentuador localizado na região 3' do grupamento  $\beta$  (Camaschella *et al.*, 1990). A dPHHF-6 (Vietnamita) envolve a deleção do gene da globina  $\gamma^A$

(Motum *et al.*, 1993; Kosteas *et al.*, 1997). Na figura abaixo (figura 2) está ilustrada a localização das deleções referentes às dPHHFs.



**Figura 2:** Tipos de PHHF deletionalis. Deleções gênicas identificadas no grupamento β, referentes às dPHHFs. As barras representam a extensão de cada deleção (Andrade, 2006).

## B.2 – PHHF Não Deletional (ndPHHF)

A PHHF não deletional é caracterizada pela mutação de uma única base nitrogenada (mutação de ponto) na região promotora do gene da globina  $\gamma^G$  ou do gene da globina  $\gamma^A$ , resultando no aumento dos níveis de HbF, variando entre 3% e 20% em indivíduos heterozigotos. Em relação ao gene da globina  $\gamma^A$ , as ndPHHFs descritas na literatura são: tipo Georgiana ( $\gamma^A$  -114 C→T) (Oner *et al.*, 1991); tipo Grega ( $\gamma^A$  -117 G→A) (Collins *et al.*, 1985); tipo Africana ( $\gamma^A$  -175 T→C) (Stoming *et al.*, 1989); tipo Brasileira ( $\gamma^A$  -195 C→G) (Costa *et al.*, 1990); tipo Italiana ( $\gamma^A$  -196 C→T) (Gelinas *et al.*, 1986); tipo Inglesa ( $\gamma^A$  -198 T→C) (Tate *et al.*, 1986); e tipo Africana ( $\gamma^A$  -202 C→T) (Gilman *et al.*, 1988). Em relação ao gene da globina  $\gamma^G$ , as ndPHHFs descritas na literatura são: tipo Suíça ( $\gamma^G$  -110 A→C) (Indrak *et al.*, 1991); tipo Argelina ( $\gamma^G$  -114 C→A) (Zertal-Zidane *et al.*, 1999); tipo Japonesa ( $\gamma^G$  -114 C→T) (Fucharoen *et al.*, 1990); tipo Australiana ( $\gamma^G$  -

114 C→G) (Motum *et al.*, 1994); tipo Sardenha ( $\gamma^G$  -175 T→C) (Ottolenghi *et al.*, 1988); e tipo Africana ( $\gamma^G$  - 202 C→G) (Collins *et al.*, 1984) Mais recentemente foram identificadas, na população grega, novas mutações associadas à ndPHHF,  $\gamma^A$  -201 C→T e  $\gamma^G$  -196 C→T, existentes apenas na presença da mutação  $\gamma^G$  -158 C→T (Tasiopoulou *et al.*, 2008).

A região promotora dos genes das globinas  $\gamma$  é rica em ilhas GC e suas sequências apresentam homologia com elementos *cis* reguladores de outros genes. Essas mutações podem interferir na ligação específica de alguns elementos, principalmente de fatores de transcrição, com suas sequências *cis* localizadas na região promotora dos genes da globina  $\gamma$ , restringindo a ligação de elementos supressores ou facilitando a ligação de ativadores de transcrição (Forget, 1998). Os mecanismos responsáveis pelo aumento da expressão das cadeias da globina  $\gamma$  e os fatores de transcrição e/ou as proteínas envolvidas nesse processo ainda não estão totalmente elucidados nas diferentes ndPHHFs e tem sido amplamente investigados.

Na ndPHHF tipo Inglesa, -198 T→C, ocorre a criação de um novo sítio de interação, CACCC *box*, que possui alta afinidade pelo fator de transcrição *SP1*, o que aumenta a força do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  e permite a interação desse promotor com o LCR. Dessa forma, a expressão do gene da globina  $\gamma^A$  é mantida, resultando no aumento da síntese de HbF durante a vida adulta (Li *et al.*, 2001). Olave e colaboradores identificaram, usando espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida de alta performance (HPLC), um complexo proteico formado pelas proteínas Dnmt1, *Cdc5-like protein*, Rap74, Snev e p52, capazes de se ligar à região promotora do gene da globina  $\gamma^A$  apenas na presença da mutação -198, reativando a expressão desse gene (Olave *et al.*, 2007). Todavia, nesse complexo, a proteína Sp1 não foi identificada. Olave e colaboradores sugerem que este fato poderia estar relacionado a alterações no microambiente transcricional, devido à utilização de extratos nucleares diferentes e, até mesmo, ao fracionamento bioquímico e purificação das proteínas, com base na afinidade pela mutação -198. Ainda assim, a possibilidade da participação da proteína Sp1 não foi descartada e pode ser que todas essas proteínas estejam envolvidas no processo de reativação da expressão do gene da globina  $\gamma^A$  (Olave *et al.*, 2007).

Já na ndPHHF tipo Grega, a mutação  $-117\text{ G}\rightarrow\text{A}$  abole o sítio de ligação do repressor de transcrição *NF-E3*, reduzindo sua interação ao promotor do gene da globina  $\gamma^A$  e permitindo a interação do *CP-1*, um ativador da transcrição. Devido a alteração nessas interações ocorre um aumento na atividade desse promotor (Superti-Furga *et al.*, 1988; Mantovani *et al.*, 1988).

As mutações  $-175\text{ T}\rightarrow\text{C}$  e  $-173\text{ T}\rightarrow\text{C}$  impedem a formação do complexo protéico contendo *GATA-1*, *OCT-1* e outros fatores transcripcionais. Esse complexo proteico tem provável contribuição na formação de uma estrutura repressora da cromatina, na região  $-170$  a  $-191$  do promotor da globina  $\gamma^A$ , levando ao silenciamento da expressão desse gene nos eritrócitos adultos (Liu *et al.*, 2005). Além disso, Magis e Martin hipotetizaram que o fator de transcrição *HMG1* liga-se na região  $-175$  do promotor do gene  $\gamma^A$  e interage com o *GATA-1* (Magis & Martin, 1995).

#### **PHHF não deletional tipo Brasileira**

A mutação  $-195$  foi identificada por Costa e colaboradores em 1990, através do estudo de um paciente caucasóide portador de esferocitose hereditária e esplenectomizado, com níveis de HbF de 7% (13,9% de cadeias  $\gamma^G$  e 86,1% de cadeias  $\gamma^A$ ). Dois irmãos desse paciente também apresentavam aumento de HbF (4,5% e 4,7%) com predomínio de cadeias  $\gamma^A$  sem, entretanto, serem portadores de esferocitose. O sequenciamento da região promotora do gene da globina  $\gamma^A$  foi realizado, identificando a substituição de uma citosina (C) por uma guanina (G) na posição  $-195$  do promotor do gene da globina  $\gamma^A$ . (Costa *et al.*, 1990).

Em 2001, com a finalidade de verificar se a mutação  $-195\text{ C}\rightarrow\text{G}$  era responsável pelo aumento na expressão do gene da globina  $\gamma^A$ , com consequente elevação nos níveis de HbF, experimentos *in vitro* foram realizados usando o sistema do gene repórter da luciferase. Não foi observado aumento significativo na expressão do promotor contendo a mutação  $-195$  quando comparado ao promotor normal. Dessa forma, foi hipotetizado que a presença de elementos do LCR ou modificações na estrutura do DNA seriam necessários para a expressão continuada do gene da globina  $\gamma^A$  durante a fase adulta (Schreiber *et al.*, 2001). Em 2003, Takahashi e colaboradores mostraram que esta única substituição  $\text{C}\rightarrow\text{G}$  na posição  $-195$  é capaz de causar

um aumento da expressão do gene repórter da luciferase em três diferentes linhagens celulares (K562, HEL e 293), apenas na presença de parte do elemento de regulação *HS2* do LCR (Takahashi *et al.*, 2003).

Análises de interação DNA–proteína (Takahashi *et al.*, 2003) demonstraram que o aumento na síntese de HbF, devido à mutação –195 C→G, não é mediada pela proteína Sp1 e nem cria um novo sítio CACCC *box*. Dessa forma, o mecanismo de aumento dos níveis de HbF em portadores de ndPHHF-B é diferente daquele que ocorre na mutação –198 apesar de ambas, quando em heterozigose, apresentarem um aumento similar (moderado) nos níveis de HbF.

Um estudo *in vivo* da mutação –195 C→G no promotor do gene da globina  $\gamma^A$  foi desenvolvido visando avaliar a habilidade de expressar o gene da globina  $\gamma$  durante todo o desenvolvimento. A mutação –195 foi inserida no promotor do gene da globina  $\gamma^A$  e clonada em um cosmídio contendo todo o grupamento da globina  $\beta$ , o qual foi inserido em camundongos. Através de PCR em Tempo Real foi demonstrado que a mutação –195, em conjunto com todo o grupamento da globina  $\beta$ , é suficiente para elevar os níveis de HbF em todas as fases de desenvolvimento dos camundongos transgênicos, uma vez que foi observado um aumento na expressão do gene da globina  $\gamma$  no saco embrionário, no fígado fetal e em outros órgãos desses camundongos em comparação à expressão no camundongo portador do grupamento da globina  $\beta$  selvagem. Os resultados demonstraram que a presença da mutação –195 em conjunto com todo o grupamento da globina  $\beta$  é suficiente para desenvolver o fenótipo de ndPHHF-B em camundongos (Cunha *et al.*, 2009).

O mecanismo molecular específico envolvido na reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF-B ainda não está elucidado. O entendimento desse mecanismo é importante para o desenvolvimento de novas terapias baseadas na reativação do gene da globina  $\gamma$  que possam auxiliar no tratamento das hemoglobinopatias.

## II. OBJETIVOS



## OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos moleculares relacionados ao aumento da síntese de hemoglobina fetal em portadores de Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal não deletional tipo Brasileira.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar a interação entre fatores de transcrição e o promotor do gene da globina  $\gamma^A$ , na presença ou na ausência da mutação  $-195 C \rightarrow G$ .
- ✓ Identificar genes diferencialmente expressos na ndPHHF-B.
- ✓ Estudar a expressão de alguns dos genes diferencialmente expressos identificados.
- ✓ Estudar a expressão de algumas proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos e suas vias de sinalização.
- ✓ Rastrear o promotor do gene da globina  $\gamma^A$  para a identificação da mutação  $-195 C \rightarrow G$  em pacientes com anemia falciforme.

Objetivos

44

### III. CASUÍSTICA



### **1 – Critério de Inclusão**

Os critérios de inclusão para participação no estudo foram:

A. Para portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira:

- Presença de mutação na posição –195 C→G do promotor do gene da globina  $\gamma^A$ ,

com consequente aumento nos níveis de HbF.

B. Para controles:

- Não apresentarem aumento nos níveis de HbF.

C. Pacientes com anemia falciforme

- Presença da mutação A→T no códon 6 do gene da globina  $\beta$ .

### **2 – Critérios de Exclusão**

Os critérios de exclusão para participação no estudo para todos os grupos foram:

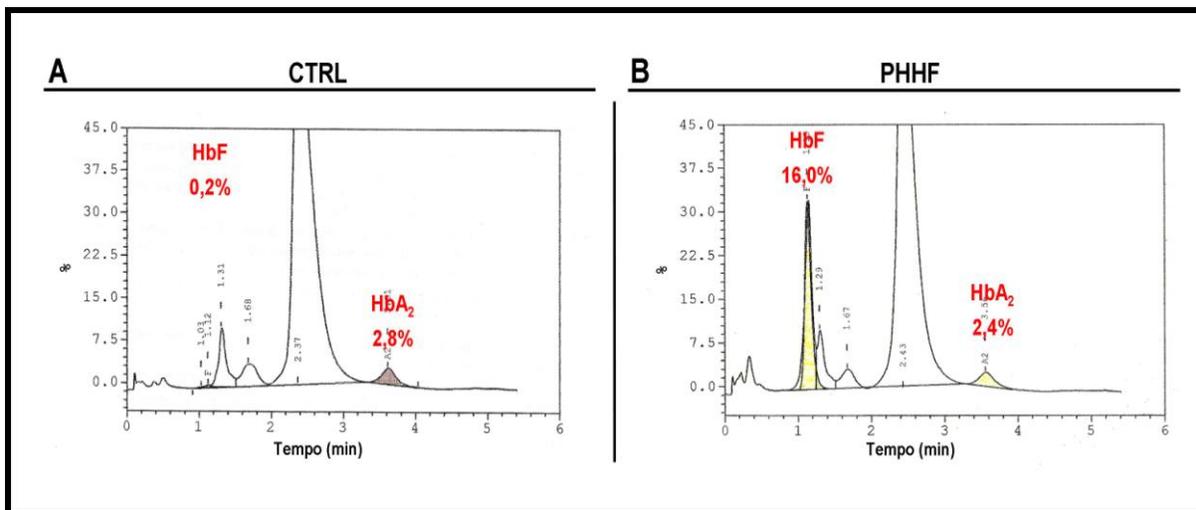
- Indivíduos não dispostos a seguir o protocolo da pesquisa.

### **3 – Portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira**

Parte da rotina do setor de doação de sangue do Hemocentro da UNICAMP realiza o rastreamento de hemoglobinas através de eletroforese sob condições alcalinas, usando acetato de celulose. Entre 2002 e 2011, a presença de HbF foi identificada em 69 indivíduos. A quantificação da porcentagem de HbF foi determinada pelo método de HPLC, usando o programa  *$\beta$ -Thalassemia Short Program (VARIANT<sup>TM</sup>*, Bio-Rad Laboratories), no Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati.

A metodologia de HPLC permite a separação das frações de hemoglobinas por eluição em coluna de troca iônica com a injeção de tampões em sistema de alta pressão. As hemoglobinas são diferenciadas por apresentarem tempos de retenção característicos, que correspondem ao tempo transcorrido entre a injeção da amostra e o ápice do pico da hemoglobina. A quantificação das diferentes frações de hemoglobina em uma amostra é realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparados com os valores de calibração específicos (Clarke & Higgins, 2000).

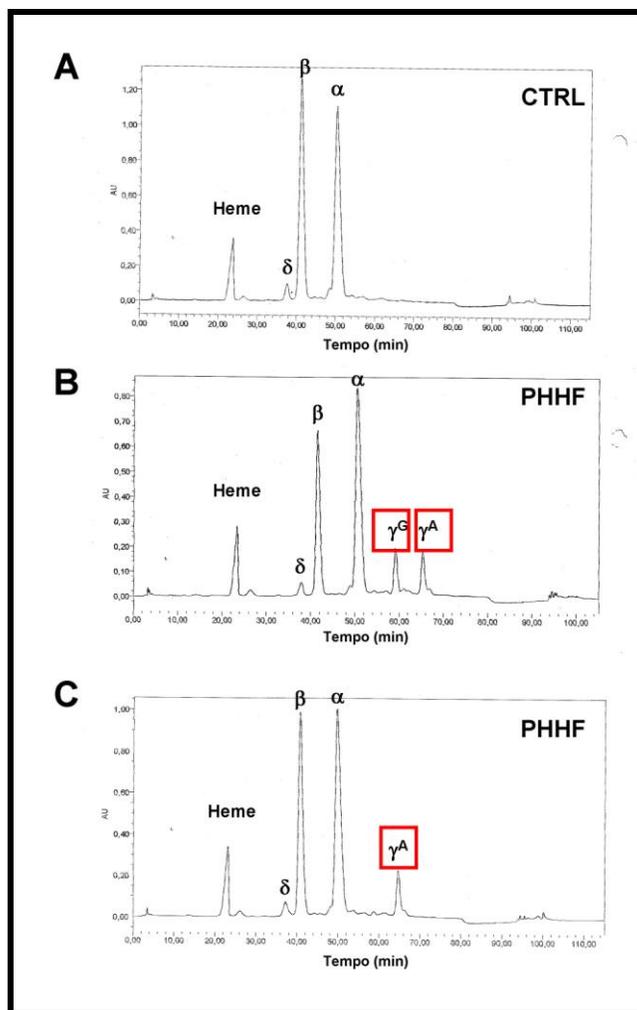
No cromatograma resultante do HPLC, o primeiro pico de retenção corresponde a HbF (por volta de 1 min) enquanto que o último pico corresponde a HbA<sub>2</sub> (por volta de 3,5 min). Para indivíduos com aumento nos níveis de HbF, característica dos portadores de PHHF, a análise apresenta porcentagem de HbF superior a 1%, e de HbA<sub>2</sub> inferior a 3,5%. Os indivíduos controles apresentam porcentagem de HbF inferior a 1%, e de HbA<sub>2</sub> inferior a 3,5%. Cromatogramas abaixo referem-se ao HPLC de hemoglobina de um indivíduo controle, com níveis de HbF e HbA<sub>2</sub> de 0,2% e 2,8%, respectivamente, e de um portador de PHHF, com níveis de HbF e HbA<sub>2</sub> de 16,0% e 2,4%, respectivamente (figura 3).



**Figura 3:** HPLC de Hemoglobinas. Cromatogramas referentes ao HPLC de hemoglobina (A) de um indivíduo controle, com níveis de HbF e HbA<sub>2</sub> de 0,2% e 2,8%, respectivamente, e (B) de um portador de PHHF, com níveis de HbF e HbA<sub>2</sub> de 16,0% e 2,4%, respectivamente.

A presença das cadeias das globinas  $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\gamma$  e do grupo heme também foi verificada através de HPLC, técnica precisa de separação das cadeias das globinas (Zamaro *et al.*, 2002).

No cromatograma de indivíduos controles, é possível observar o grupo heme, a cadeia  $\delta$ , a cadeia  $\beta$  e a cadeia  $\alpha$ , enquanto que no cromatograma de portadores de PHHF além dessas há a presença da cadeia  $\gamma$  ( $\gamma^A$  ou  $\gamma^G$ , dependendo da mutação). Na figura 4 apresentamos o padrão cromatográfico de um controle (figura 4A), de um portador de PHHF que possui apenas cadeias  $\gamma^A$  (figura 4B) e de um portador de PHHF que apresenta tanto cadeias  $\gamma^G$  como cadeias  $\gamma^A$  (figura 4C).



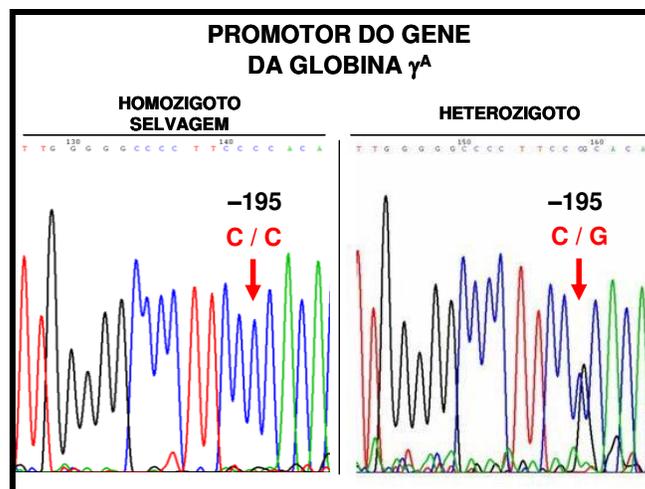
**Figura 4: HPLC de Cadeias Globínicas.** Cromatograma referente ao HPLC de cadeias das globinas, onde os picos correspondem, respectivamente, ao grupo heme, às cadeias  $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\gamma$  (A) de um controle (ausência de cadeias  $\gamma$ ); (B) de um portador de PHHF que possui apenas de cadeias  $\gamma^A$ ; e (C) de outro portador de PHHF que possui tanto de cadeias  $\gamma^G$  quanto  $\gamma^A$ .

Após a quantificação de HbF por HPLC, 23 indivíduos apresentaram níveis de HbF entre 2% e 20%; 23 entre 21% e 30%; 16 entre 31% e 50%, e 1 com 98,6%. Essa quantificação não foi realizada em 6 indivíduos. Como na ndPHHF-B os aumentos nos níveis de HbF são moderados (até 20%) e a mutação ocorre no promotor do gene da globina  $\gamma^A$ , foram selecionados os indivíduos com porcentagem de HbF entre 2% e 30% e com a presença de cadeias do tipo  $\gamma^A$ , para a determinação do genótipo e identificação dessa ndPHHF-B.

O genótipo dos portadores de ndPHHF-B foi determinado por PCR / sequenciamento. Um fragmento de 319pb do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  (posição -5 a -324pb) foi amplificado usando *primers* desenhados numa região não homóloga ao gene da globina  $\gamma^G$ :

- globina  $\gamma^A$  (*Sense*)                    5'-CTCTATGATGGGAGAAGGAACTAG-3'
- globina  $\gamma^A$  (*Antisense*)                5'-AACTGCTGAAGGGTGCTTCC-3'

A determinação do genótipo foi feita através da análise do eletroferograma gerado após sequenciamento: na posição -195, o indivíduo homozigoto selvagem apresenta pico único de citosina (C) enquanto o indivíduo heterozigoto possui picos simultâneos de citosina (C) e de guanina (G), como ilustrado na figura 5.



**Figura 5:** Genotipagem da região promotora do gene da globina  $\gamma^A$ . Eletroferograma do sequenciamento referente ao promotor do gene da globina  $\gamma^A$  de um indivíduo homozigoto selvagem e de um heterozigoto para a mutação -195 C→G.

Entre 2002 e 2011, no setor de doação de sangue do Hemocentro da UNICAMP foram identificados 11 portadores de ndPHHF-B não cosanguíneos (frequência de 15,94% dentre os 69 portadores de PHHF identificados), todos heterozigotos para a mutação -195.

#### 4. Índices Hematimétricos

Os índices hematológicos referentes aos portadores de ndPHHF-B, com exceção dos valores de HbF, tem valores normais e estão descritos na tabela I.

**Tabela I:** Índices hematológicos dos 11 portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira.

ndPHHF-B	HbF (%)	HbA <sub>2</sub> (%)	HCT (%)	HGB (%)	RBC (10 <sup>6</sup> cel/ μL)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)
1	8,2	2,4	42,4	13,1	5,0	84,0	25,9	12,7
2	15,9	2,4	40,1	14,1	4,3	92,8	32,7	12,7
3	13,9	2,6	45,6	16,2	5,7	81,3	28,7	13,9
4	10,3	2,4	46,3	16,3	5,5	83,5	29,5	13,7
5	12,7	2,6	43,5	14,7	4,9	89,4	30,2	13,5
6	10,2	2,5	50,0	16,5	5,1	97,9	32,3	12,9
7	6,3	2,5	37,5	12,0	4,4	84,5	27,0	19,7
8	12,4	2,5	44,2	14,8	4,9	89,5	30,0	11,8
9	13,6	2,5	53,7	17,1	5,5	97,7	31,1	12,9
10	10,3	2,1	40,9	13,7	4,9	84,4	28,2	13,9
11	10,5	2,0	48,5	15,8	5,1	94,4	30,8	12,2
<b>M ± DP</b>	11,3 ± 2,7	2,4 ± 0,2	43,9 ± 3,9	14,7 ± 1,5	5,0 ± 0,4	88,2 ± 5,5	29,5 ± 2,2	13,7 ± 2,2

M – média; DP – desvio padrão

Os valores hematológicos e o padrão eletroforético de hemoglobinas referentes aos indivíduos controles estão dentro da normalidade (tabela II).

**Tabela II:** Índices hematológicos dos 11 indivíduos controles.

CTRL	HbF (%)	HbA <sub>2</sub> (%)	HCT (%)	HGB (%)	RBC (10 <sup>6</sup> cel/ μL)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)
1	0,5	3,0	42,3	14,3	5,0	84,9	28,7	13,5
2	0,2	3,1	42,2	13,7	5,3	80,0	26,0	13,2
3	0,3	3,3	46,7	16,0	5,5	84,9	29,0	13,4
4	0,2	3,2	38,5	12,2	4,5	86,4	27,2	14,3
5	0,2	2,8	48,7	16,8	5,7	85,1	29,3	13,6
6	0,2	3,2	45,0	15,4	5,0	89,3	30,5	12,7
7	0,5	3,0	39,9	14,8	5,2	76,9	28,6	14,2
8	0,3	3,1	47,4	16,2	5,7	83,0	28,3	12,5
9	0,6	3,2	46,1	15,2	5,2	89,5	29,5	13,5
10	0,8	3,0	48,1	15,3	5,0	95,9	30,5	14,0
11	0,3	2,4	49,8	16,1	6,1	81,4	26,3	12,7
<b>M ± DP</b>	0,4 ± 0,2	3,0 ± 0,2	45,0 ± 3,7	15,1 ± 1,3	5,3 ± 0,4	85,2 ± 5,2	28,5 ± 1,5	13,4 ± 0,6

M – média; DP – desvio padrão

## 5 – Aspectos Éticos

O projeto “Estudo dos mecanismos moleculares relacionados à expressão gênica diferencial em portadores de persistência hereditária da hemoglobina fetal não deletional tipo Brasileira” foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP em 03/10/2007 com registro número 606/2007 (CAAE: 0446.0.146.000-07), tendo sido aprovado em 23/10/2007, conforme determinações estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96 e 251/97).

Antes de participar do estudo, todos os indivíduos envolvidos na pesquisa, controles, portadores de PHHF, pacientes com anemia falciforme, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com a Declaração de Helsinki, que foram arquivados como dados brutos. Nesses Termos são descritos os propósitos do projeto; os procedimentos a serem realizados, os desconfortos, riscos possíveis e benefícios esperados, as garantias do sigilo assegurando a privacidade quanto aos dados confidenciais, o acesso a tratamento hospitalar, quando necessário, e os esclarecimentos permanentes, incluindo nomes, telefones e endereços dos pesquisadores para eventuais dúvidas, assim como o telefone do Comitê de Ética em Pesquisa; a liberdade para retirar o consentimento e abandonar a pesquisa em qualquer momento, antes ou durante o procedimento, sem penalidades, prejuízos ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório de Acompanhamento desse projeto, em 23/10/2008.

O presente trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro capítulo buscamos identificar fatores de transcrição envolvidos na expressão continuada do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF-B. No segundo capítulo investigamos genes possivelmente envolvidos na manutenção dos níveis elevados de HbF. No capítulo 3 rastreamos a presença da mutação -195 C→G no promotor do gene da globina  $\gamma^A$  em pacientes com anemia falciforme. Em cada capítulo estão descritos os métodos utilizados bem como os resultados obtidos.

# IV. CAPÍTULO 1:

INTERAÇÃO ENTRE FATORES DE TRANSCRIÇÃO

E A REGIÃO -195 DO PROMOTOR

DO GENE DA GLOBINA  $\gamma^A$



# 1. OBJETIVO

- ✓ Investigar a interação entre fatores de transcrição e o promotor do gene da globina  $\gamma^A$ , na presença ou na ausência da mutação -195 no promotor do gene da globina  $\gamma^A$ .

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 – Linhagem Celular K562

Células da linhagem de eritroleucêmica humana K562 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Invitrogen, Life Technologies), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), bicarbonato de sódio, penicilina, estreptomicina e fungizona (Invitrogen). O cultivo das células foi feito a 37°C numa atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2 – Cultura eritroide primária

A partir de células CD34<sup>+</sup>, obtidas por separação imunomagnética a partir de células mononucleares, foram cultivados, *in vitro*, eritroblastos, conforme o protocolo *U790 INSERM* (Ugo *et al.*, 2004). Todo o experimento foi realizado em fluxo estéril.

#### A – Separação de Células Mononucleares

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante heparina lítica e processadas imediatamente após a coleta. As amostras foram diluídas na proporção 1:2 em solução PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + ACD + BSA e as células foram isoladas através de centrifugação em gradiente de *Ficoll-Hypaque* (Amersham Biosciences) a 317 g por 30 min e temperatura ambiente. As células da camada intermediária desse gradiente, correspondentes às células mononucleares, foram coletadas e lavadas com a mesma solução PBS + ACD + BSA para retirada de eventuais contaminantes, como plasma e outras linhagens celulares. As células foram então lisadas em tampão de lise para hemácias

(NH<sub>4</sub>Cl 0,144M e KHCO<sub>3</sub> 0,01M) por 30 min no gelo, seguida de centrifugação a 361 g por 5 min. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS para contagem na câmara de Neubauer.

### **B – Isolamento de Células CD34<sup>+</sup> do sangue periférico**

As células CD34<sup>+</sup> foram isoladas usando o *Indirect CD34<sup>+</sup> Progenitor Cell Isolation Kit* (MACS cell isolation kit, Miltenyi Biotec GmbH).

Após a contagem, as células foram incubadas com *FcR Blocking Reagent e Hapten Antibody* por 15 min a 4°C. Após lavagem com PBS, essas células foram incubadas por 15 min a 4°C com *Anti-Hapten Microbeads* (Miltenyi Biotec GmbH). Em seguida, foram novamente lavadas, ressuspensas em PBS e passadas em uma coluna magnética LS (Miltenyi Biotec GmbH), previamente tratada com a solução PBS + ACD + BSA, acoplada a um suporte magnético. As células CD34<sup>+</sup> ficam retidas à coluna magnética, enquanto que os monócitos e linfócitos (contaminantes) são coletados. Para eluir as células CD34<sup>+</sup> presas a coluna e coletá-las, a coluna magnética foi retirada do suporte e uma leve pressão foi feita sobre essa coluna, através de um êmbolo de seringa. Essas células CD34<sup>+</sup> foram lavadas com solução PBS + ACD + BSA, centrifugadas a 203 g por 10 min e ressuspensas em 1mL de solução PBS + ACD + BSA para contagem na câmara de Neubauer.

### **C – Cultivo de Células CD34<sup>+</sup>**

As células foram cultivadas numa densidade de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células por mL de meio *MSSe*, suplementado com penicilina/estreptomicina/L-glutamina (Sigma),  $\alpha$ -tioglicerol (Sigma), albumina sérica bovina (BSA, Calbiochem), 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), mistura de lipídios sonicados (Sigma), transferrina humana saturada (Sigma), 5ng/mL de interleucina-3 (IL-3, R&D Systems), 1U/mL de Eritropoetina (EPO, R&D Systems), 25ng/mL de *Stem Cell factor* (SCF, R&D Systems). As células foram então incubadas numa estufa estéril à temperatura de 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias. Após esse período, foi feita a exclusão das células mortas. As colônias constituídas por unidades formadoras de colônias eritroides (CFU-E) e proeritroblastos foram coletados através de centrifugação, lavados e

cultivados numa densidade de  $1 \times 10^5$  células por mL de meio *MSSe*, suplementado com 30% de SFB, 5ng/mL de IL-3, 1U/mL de EPO e 25ng/mL de SCF. As culturas foram incubadas na estufa estéril à temperatura de 37°C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub> até o 13º dia de cultura.

A diferenciação eritroide foi acompanhada por análise da morfologia celular (*citospin*) e da expressão de marcadores de superfície celular (citometria de fluxo). Amostras de células foram coletadas nos 7º, 10º e 13º dias das culturas e armazenadas em tampão *RLT* do *Kit Micro RNeasy* (Qiagen) para a extração de RNA. Esse tampão *RLT* inativa RNAses e outras proteínas evitando a degradação do RNA e alterações no padrão de expressão gênica.

#### **D – Citospin – Confeção de lâminas**

Para confecção de lâminas foram utilizadas  $2 \times 10^4$  células, ressuspensas em PBS. As amostras foram aplicadas em suporte plástico adequado, encaixado sobre a lâmina, e centrifugadas a 400 g por 5 min e temperatura ambiente para sua fixação na lâmina. As lâminas foram coradas com *Leishman*, analisadas no microscópio *Eclipse i80* (Nikon) usando o *software NIS-Element Image System* (Nikon).

#### **E – Marcadores de superfície celular e de HbF**

A expressão dos marcadores de superfície celular receptor de transferrina e glicoforina A foi avaliada através de citometria de fluxo. À quantidade de  $1 \times 10^5$  células, coletadas nos 7º, 10º e 13º dias de cultura e ressuspensas em 100µL de PBS, foram adicionados 5µL de anticorpo anti- glicoforina A, conjugado com o fluoróforo PE (Caltag Laboratories) e 5µL de anticorpo anti-receptor de transferrina, conjugado com o fluoróforo FITC (Caltag Laboratories). Como controle negativo, o mesmo procedimento foi realizado com anticorpo anti-*mouse* IgG1, conjugado a FITC (Caltag Laboratories). As amostras foram incubadas por 30 min a 4°C e lavadas com PBS, centrifugando a 1200 rpm por 5 min e temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 500µL de PBS.

Em relação à HbF,  $2 \times 10^4$  células foram incubadas em 50µL de solução para fixação da membrana, por 15 min, a temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, foram adicionados

50µL de solução para permeabilização da membrana juntamente com 5µL de anticorpo anti-HbF conjugado a FITC (Invitrogen), incubando a 4°C por 30 min, no escuro. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS. Como controle negativo, o mesmo procedimento foi realizado com o isótopo anti-*mouse* IgG1 conjugado a FITC.

Informações sobre 10.000 eventos foram obtidas para análise utilizando o software *Cell Quest* do citometro *FACSort*® (Becton Dickinson).

## **2.3 – Expressão dos Genes das Globinas**

### **A – Extração de RNA**

A extração de RNA total nos 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias da cultura foi feita através do kit *Rneasy Mini Kit* (*Qiagen*). Uma quantidade de  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células foi adicionada a 1mL de tampão *RLT*, contendo 10% de betamercaptoetanol. Em seguida, essas células foram lisadas mecanicamente, através de sucessivas passagens da amostra em seringa de 1mL (agulha 0,45mm). Após a lise, foram adicionados 700µL de etanol 70%, sendo o homogeneizado transferido para uma coluna *RNeasy* e centrifugado a 10000 g por 45 s e temperatura ambiente. Após o descarte do eluato, foram adicionados 700µL de tampão *RW1* e uma nova centrifugação a 10000 g por 45 s a temperatura ambiente foi realizada. O eluato foi desprezado e 500µL de tampão *RPE* foram adicionados à coluna, centrifugando a 10000 g por 45 s a temperatura ambiente. O eluato foi novamente descartado e uma nova lavagem com tampão *RPE* foi feita. Para retirar eventuais resíduos de tampão, os tubos foram centrifugados a 10000 g por 1 min e temperatura ambiente. O RNA foi eluído adicionando 30µL de água DEPC, seguida de centrifugação a 10000 g por 2 min e temperatura ambiente. A concentração de RNA extraído foi determinada no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm.

### **B – Síntese de cDNA**

Para retirar qualquer contaminação do RNA com moléculas dupla fita, 1µg de cada RNA extraído foi tratado com 1U da enzima *DNaseI* (Fermentas, Thermo Scientific) em *DNaseI*

*reaction buffer* 1X (Tris-HCl 20mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, KCl 50mM), num volume final de 10µL. A reação foi incubada por 30 min à temperatura de 37°C e paralisada com a adição de EDTA 2,27mM e incubação por 10 min a 65°C.

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA previamente tratado com *DNAseI*, através da reação de transcrição reversa, usando o kit *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas). À amostra de RNA tratada, foi adicionado *oligo (dT)<sub>18</sub> primer* (100 µM, 0,5µg/µL), com incubação por 5 min a 65°C. Em seguida, foram adicionados *Reaction Buffer* 1x (Tris-HCl 250mM pH 8.3, KCl 250mM, MgCl<sub>2</sub> 20mM, DTT 50mM), dNTP 1mM, 20U de *RiboLock™ RNase Inhibitor* (20U/µL) e 200U de *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (200U/µL). A síntese de cDNA foi feita a 42°C por 60 min. A reação foi paralisada através de incubação a 75°C por 5 min. A concentração de cDNA sintetizada foi determinada usando o espectrofotômetro NanoDrop (comprimento de onda de 260 nanômetros).

A fim de verificar a qualidade da transcrição, foi realizada uma PCR usando tampão da enzima 1x; dNTP 1mM; 1U de enzima *Taq polimerase* 5U/µL (Invitrogen); *primer β-actina Sense* 1µM (5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'); *primer β-actina Antisense* 1µM (5'-TCGCTCCAACCGACTGCTGT-3') e 100ng de cDNA. A programação usada foi: desnaturação inicial a 96°C por 2 min, seguida de amplificação através de 35 ciclos de 96°C por 30 s, 58°C por 45 s e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV para verificação da amplificação de um fragmento de 643pb. Os cDNAs sintetizados foram armazenados à -20°C.

### **C – PCR em Tempo Real**

A análise da expressão do gene da globinas  $\gamma$  foi realizada através de PCR em Tempo Real em um volume final de 12µL contendo cDNA na concentração inicial de 2µg/µL; 150nM de *primers sense* e *antisense*; e 6µL de *SYBRGreen PCR Master Mix* (Invitrogen), o qual contém tampão de enzima, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, enzima *Taq Ampli-Gold* e o fluorocromo *SYBRGreen* (agente intercalante da dupla fita de DNA). Em todos os casos foram feitos controles negativos, com

água estéril substituindo a amostra. Todas as amostras foram amplificadas em duplicatas. As reações foram preparadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa usado foi: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após a amplificação, a curva de *melting* foi determinada, através do aumento gradual da temperatura de 60°C a 95°C. A detecção da amplificação em tempo real foi feita no equipamento *StepOnePlus* (*Applied Biosystems, Life Technologies*) e os resultados foram expressos em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos.

As amostras em estudo tiveram a expressão relativa determinada. Os dados de Ct foram exportados para uma planilha no programa *Excel* (*Microsoft Corporation*) e, então, analisados. A análise relativa foi obtida seguindo Vandesompele e colaboradores (Vandesompele *et al.*, 2002): a média dos Cts das duplicatas foi subtraída do Ct com menor média entre as amostras analisadas para cada gene, obtendo  $\Delta C_t$  ( $\Delta C_t = C_{t_{\min}} - C_{t_{\text{amostra}}}$ ). A seguir, foi calculado o valor da quantidade de expressão Q ( $2^{\Delta C_t}$ ), baseado na eficiência de amplificação de cada conjunto de *primers*, onde 2 corresponde a uma eficiência de 100%. Foi feita uma normalização dos dados obtidos usando os genes constitutivos *GAPDH* e  *$\beta$ -actina* como controle endógeno. Os valores Q dos genes constitutivos de cada amostra analisada foram exportados para o programa *geNorm*, que calculou a média geométrica entre eles, valor denominado Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada do gene da globina  $\gamma$ , referente à cada amostra em estudo, foi dada pela razão entre o valor Q desse gene e o Fator de Normalização da amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (U.A.).

## **2.4 – Interação entre Fatores de Transcrição e o promotor do gene da globina $\gamma^A$**

### **A – Extração Nuclear**

O extrato nuclear foi preparado a partir de células K562 ou de células do 10º dia da cultura eritroide primária utilizando o *Kit Nuclear Extraction* (Panomics, Affymetrix). Uma quantidade de  $1 \times 10^7$  células foram peletadas, através de centrifugação e, em seguida, lavadas duas vezes em tampão PBS. As células lavadas foram lisadas com Tampão de Extração A (HEPES pH 7,9 10mM, KCl 10mM, EDTA 10mM, IGEPAL 4%, DTT 10mM, inibidor de protease,

inibidor de fosfatase I, inibidor de fosfatase II), no gelo por 10 min sob agitação constante de 200 rpm. Foi então realizada uma centrifugação a 15000 g por 3 min e 4°C. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente. O pellet foi ressuspensão em Tampão de Extração B (HEPES pH 7,9 20mM, NaCl 400mM, EDTA 1mM, glicerol 4%, DTT 10mM, inibidor de protease, inibidor de fosfatase I, inibidor de fosfatase II) e incubado a 4°C por 2 horas, sob agitação constante de 200 rpm. Após essa incubação, foi feita uma centrifugação a 15000 g por 5 min e 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas do extrato nuclear foi determinada usando o ensaio de Bradford (Bio-Rad Laboratories).

### **B – Super Gel Shift**

Foram sintetizados 2 oligonucleotídeos complementares (sondas), contendo biotina na extremidade 3', entre as posições –165 a –205 do promotor do gene da globina  $\gamma^A$ : uma sonda contendo a sequência do promotor normal e outra com a sequência do promotor com a mutação –195 C→G, que caracteriza a ndPHHF-B.

A Tabela III mostra as sequências das sondas usadas nos ensaios de *Super Gel Shift*.

**Tabela III:** Sequências de sondas utilizadas no *Super Gel Shift*.

<b>Selvagem Sense</b>	5' – GGCCCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGA – 3' – Biotina
<b>Selvagem Antisense</b>	5' – TCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAAGGGGCC – 3' – Biotina
<b>Mutado Sense</b>	5' – GGCCCCTTCCGCACACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGA – 3' – Biotina
<b>Mutado Antisense</b>	5' – TCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAAGGGGCC – 3' – Biotina

Foram anelados 100fmol de cada oligonucleotídeo com sua fita complementar em Tampão de Anelamento 1x (Tris-HCl pH 7,5 100mM, NaCl 1M, EDTA pH 8,0 10mM), por 10 min a 95°C, seguido de resfriamento gradual até atingir a temperatura ambiente.

Uma quantidade de 5µg de extrato nuclear de células K562 foi incubada, no gelo por 30 min, com 2µg de anticorpo (200µg/0,1mL) anti-GATA-1 (sc-265X, Santa Cruz), anti-MAZ (sc-

28745X, Santa Cruz) ou anti-WT-1(sc-192X, Santa Cruz). Em seguida, foi adicionado tampão de ligação (NaCl 50mM, KCl 30mM, Tris-HCl pH 7,5 10mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, glicerol 10%), 1,0µg de poli dl-dC e 100fmol de sonda previamente desnaturada, incubando por 25 min a temperatura ambiente. Nos ensaios de competição usado para testar a especificidade da interação, foi adicionada sonda não marcada, em alta concentração (100X mais do que a sonda biotinilada).

A interação DNA-proteína foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% a 250 Volts por 2 hs, transferência semi-seca para uma membrana de *nylon* e *cross-link UV* (*light-cross-linker instrument*) a 120 mJ/cm<sup>2</sup> por 10 min. O ensaio de quimioluminescência foi feito usando o Kit *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module* (Pierce).

### **C – Array DNA-proteína**

O ensaio de *Array*, usando o kit *TransSignal Protein/DNA Array* (Panomics), foi realizado a partir do extrato nuclear isolado de células eritroides do 10º dia de cultura eritroide primária.

A membrana foi colocada em uma garrafa de hibridização e tratada com Tampão de Pré Tratamento I, durante 5 min a 45°C (forno de hibridização) e com de Tampão de Pré Tratamento II, durante 10 min a 45°C (forno de hibridização). Em seguida, essa membrana foi lavada 3x com água destilada. O Tampão de Hibridização (pré-aquecido a 42°C) foi adicionado à membrana, homogeneizando por 2 horas a 42°C (forno de hibridização). Dois microgramas de extrato nuclear foram adicionados à 100 nanogramas de *TransSignal Probe Mix* seguida de incubação a 15°C por 30 min. A seguir, foi adicionado Tampão de Incubação e a reação foi transferida para uma coluna *spin* previamente lavada com Tampão de Incubação. Após incubação no gelo por 30 min, foi feita uma centrifugação a 7000 rpm por 30 s a 4°C. O eluato foi descartado e as colunas foram lavadas 4x com Tampão de Lavagem, centrifugando a 7000 rpm por 30 s a 4°C. As sondas de DNA foram eluídas com Tampão de Eluição e desnaturadas a 95°C por 3 min, seguida de incubação no gelo por 2 min, antes de serem hibridizadas a 42°C por, pelo menos, 12 hs. Após esse período, a membrana foi lavada duas vezes com 2x SSC/ 0,5% SDS a 42°C

por 20 min e duas vezes com 0,1x SSC/ 0,5% SDS a 42°C por 20 min para retirar excessos do tampão de hibridização, evitando alto *background*.

A atividade dos fatores de transcrição foi analisada através de um ensaio de quimioluminescência. Inicialmente, os sítios inespecíficos foram bloqueados através da adição de tampão de bloqueio por 15 min com agitação constante. Em seguida, foi adicionado o conjugado estreptavidina – *Horseradish peroxidase* (HRP) ao tampão de bloqueio, incubando à temperatura ambiente por 15 min com agitação constante. O excesso dessas soluções foi retirado através de 3 lavagens sucessivas com tampão de lavagem e incubações de 8 min com agitação constante. Foram, então, adicionados tampão de detecção por 5 min e solução de trabalho por 10 min. A atividade dos fatores de transcrição foi detectada por autorradiografia em filme de raio-X. A intensidade de cada *spot* do *Array* foi estimada por análise densitométrica, usando o *software TotalLab Quant* (Inglaterra).

#### **D – Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

O ensaio de EMSA foi realizado usando o kit *EMSA* (Panomics). Dois microgramas de extrato nuclear de células eritroides do 10º dia de cultura foram incubados, no gelo por 5 min, com tampão de ligação 1x (NaCl 50mM, KCl 30mM, Tris-HCl pH 7,5 10mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, glicerol 10%) e 1,0µg de poli dI-dC. A seguir, foi adicionada sonda biotinilada, incubando por 1 hora a 15°C. Nos ensaios de competição usados com a finalidade de testar a especificidade da ligação, foi adicionada sonda não marcada, em alta concentração. Após a incubação foi adicionado tampão de amostra. O complexo DNA–proteína foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE (Tris-HCL 89mM; Ácido Bórico 89mM; EDTA 2mM, pH 8,0) a 120 Volts por 1 hora e 20 min e temperatura de 4°C. Em seguida, a transferência das amostras do gel para uma membrana de *nylon* carregada positivamente foi feita em tampão TBE a 300 mA por 40 min e temperatura de 4°C. A membrana foi submetida a um *cross-linker* UV por 10 min e 120 mJ. A detecção foi feita através de um ensaio quimioluminescência.

## E – Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP)

A imunoprecipitação de cromatina é um ensaio que possibilita a verificação da existência da interação direta de um dado fator de transcrição com a região promotora de interesse através da precipitação de cromatina usando anticorpo específico para o fator de transcrição. O método é baseado na adição de formaldeído, que promove um *cross-linking* entre as proteínas e as sequências *cis* localizadas nas proximidades da estrutura de cromatina aberta. (Das *et al.*, 2004).

O ensaio de ChIP foi realizado através do Kit de Imunoprecipitação de Cromatina (Millipore). Uma quantidade de  $1 \times 10^6$  células foi fixada em formaldeído numa concentração final de 1%, com incubação a 37°C por 10 min. Após centrifugação a 2000 rpm por 5 min e 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado duas vezes em PBS, contendo os inibidores de proteases PMSF 1mM, aprotinina 1µg/mL e pepstatina A 1µg/mL. As células lavadas foram ressuspensas em tampão de lise, contendo SDS 1% e os inibidores de proteases PMSF, aprotinina e pepstatina A. Para a fragmentação da cromatina, os extratos celulares foram submetidos a 30 s de ultrassom gerado a 21% da potência máxima do sonicador de 750W, seguidos de 5 s sem ultrassom. Para evitar superaquecimento das amostras, os tubos foram incubados em banho de gelo durante todo o período de sonicação. Dessa forma, DNA foi quebrado, gerando fragmentos de 0,2-1,0 kb, faixa de tamanho ideais para a realização da ChIP. Alíquotas do extrato celular obtido após a sonicação foram diluídas 1:10 em tampão de imunoprecipitação e usadas para cada imunoprecipitação. Uma fração de cada amostra sonicadas e diluída foi separada para servir como controle da quantidade inicial de DNA (DNA INPUT) e armazenada a -20°C até a fase de ruptura da ligação do fator de transcrição à cromatina. As amostras foram pré-clareadas com Proteína A *Sepharose* / DNA de Esperma de Salmão por 30 min a 4°C sob agitação, seguida de centrifugação a 800 rpm por 1 min e 4°C. Ao sobrenadante, contendo o imunoprecipitado, foram adicionados 4µg de anticorpo (200µg/0,1mL), anti-NF-E1/YY1 (sc-7341, Santa Cruz Biotechnology) ou anti-PAX1 (sc-25407, Santa Cruz Biotechnology), incubando por 16 horas a 4°C com agitação. Como controle, também foram feitas reações de imunoprecipitação na ausência de anticorpo. Em seguida, foi adicionada Proteína A *Sepharose* / DNA de Esperma de Salmão à imunoprecipitação, incubando com

agitação por 1 hora a 4°C. Os imunoprecipitados foram lavados a 4°C: 1x com o tampão *Low Salt Immune Complex*, 1x com o tampão *High Salt Immune Complex*, 1x com o tampão *LiCl Immune Complex* e 2x com tampão Tris / EDTA. A cromatina imunoprecipitada foi eluída da Proteína A *Sepharose Sepharose* / DNA de Esperma de Salmão após duas incubações com tampão de eluição (SDS 1% e NaHCO<sub>3</sub> 0,1M) por 15 min a temperatura ambiente sob agitação. Nos passos seguintes, o INPUT foi tratado juntamente com as amostras de imunoprecipitação. O *cross-linking* (ligação cruzada) foi revertido pela incubação a 65°C por 4 horas na presença de NaCl 5M. Para remoção das proteínas contaminantes, as amostras foram tratadas com EDTA 0,5M, Tris HCl 1M e proteinase K 10mg/mL por 1 hora a 45°C. O DNA foi extraído através do método de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1 volume/volume), precipitado com glicogênio 0,5%, acetato de amônio 7,5M e etanol absoluto, lavado com etanol 70% e ressuspenso em 15µL de água. A concentração dos imunoprecipitados foi determinada através do espectrofotômetro NanoDrop (comprimento de onda de 260 nanômetros).

A imunoprecipitação do complexo foi confirmada por PCR em Tempo Real com *primer* desenhado, especificamente na região promotora (-143 a -274) do gene da globina  $\gamma^A$ , através do programa *Primer Express* (Applied Biosystems) o qual estipulou o tamanho e a temperatura de *melting* do produto amplificado. A verificação de sua especificidade foi feita usando o site *BLAST* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) e a verificação da formação de estruturas, como *hairpins* e *dimers*, através do programa *GeneRunner* (Hastings Software).

**Tabela IV:** Sequência do par de *primer* utilizado na quantificação dos imunoprecipitados.

Gene	Primers
Promotor globina $\gamma^A$ – <i>Sense</i>	5'– AAAGTGGAAATGACTGAATCGG –3'
Promotor globina $\gamma^A$ – <i>Antisense</i>	5'– GGAGTTTATGCCAGGGACCG –3'

A concentração ótima de *primer*, isto é, a quantidade mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra, foi padronizada. A partir da mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo *primers* nas concentrações finais de 70nM, 150nM ou 300nM. Uma vez utilizada a mesma quantidade de amostra em todas as

reações, os ciclos de *Threshold* (Cts) não deveriam variar. Se o aumento da concentração de *primer* ocasionou uma diminuição de Ct, a quantidade desse *primer* na reação ainda era insuficiente. Assim, a concentração ótima escolhida foi a de menor valor associada ao menor Ct.

Estabelecida a concentração ótima de *primer*, foi determinada a eficiência de cada reação. Foram realizadas reações com 6 quantidades conhecidas de amostra, em escala logarítmica: 2ng; 6,32ng; 20ng; 63,2ng; 200ng; 632ng. Além disso, foi feita uma reação contendo quantidade intermediária de amostra, 120ng, totalizando 7 reações. Os resultados foram utilizados para a construção de uma curva padrão: Ct *versus* quantidade de amostra. A eficiência de amplificação ( $E$ ) foi obtida a partir da fórmula  $E = 10^{(-1/slope)}$ , onde *slope* corresponde ao coeficiente angular da reta (Pfaffl, 2001), dado pelo *software StepOnePlus* (Applied Biosystems). Uma vez determinada a eficiência, qualquer quantidade de amostra dentro da faixa analisada pode ser utilizada nas reações.

As amostras na concentração final de 5µg/µL foram usadas para a quantificação absoluta dos imunoprecipitados por PCR em Tempo Real. Como controle da inespecificidade na imunoprecipitação, utilizamos oligos para amplificação de uma sequência interna do gene *FOXO3a* (controle negativo).

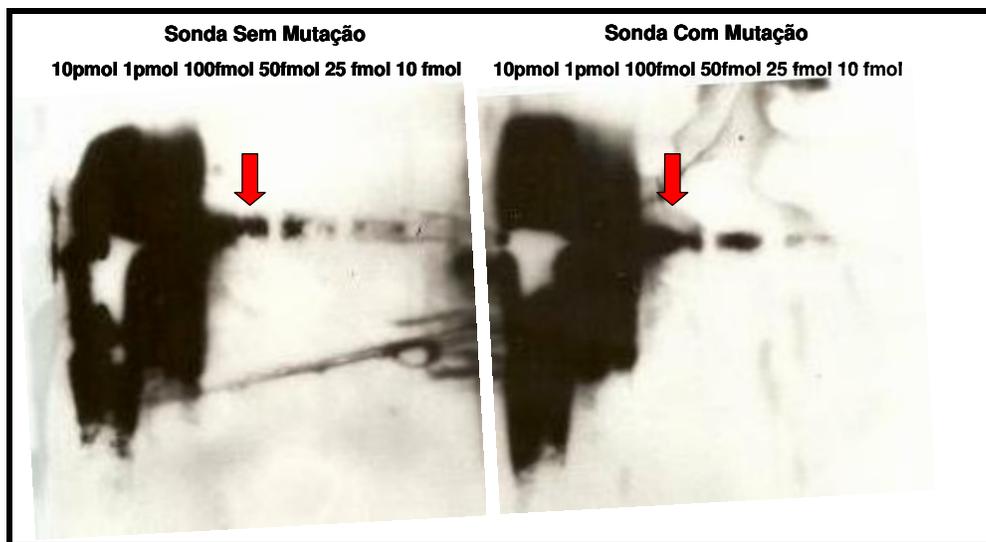
## 3. RESULTADOS

### 3.1 – A presença da mutação –195 não altera a interação dos fatores *MAZ* e *WT1*

Iniciamos com uma análise de sítios de ligação de fatores de transcrição na região –165 a –205 do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  (tanto no promotor normal quanto no promotor mutado na posição –195 C→G) usando os programas de bioinformática *TRANSFAC*, *JASPAR* e *MatInspector*. Essas análises mostraram que os fatores de transcrição *WT1*, *MZF1* e *RREB* são possíveis candidatos para o silenciamento e os *MAZ* e *PAX1* para a ativação da expressão do gene da globina  $\gamma^A$ . Optamos por analisar a interação dos fatores de transcrição *MAZ* e *WT1*: o *MAZ* reconhece o mesmo sítio que o *SP1*, responsável pela reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF Inglesa, e o *WT1* desempenha um papel importante na hematopoese.

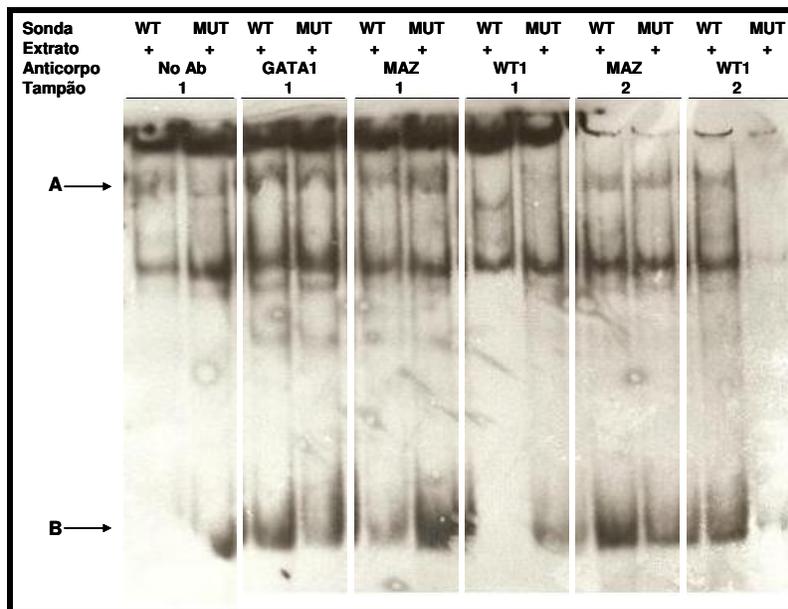
A análise da interação dos fatores *MAZ* e *WT1* (presentes em extratos nucleares de células K562) com sondas correspondentes a região -165 a -205 do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  (sem ou com a mutação -195) foi realizada por ensaios de *Super Gel Shift*. Como nas duas sondas há interação com o fator de transcrição *GATA-1*, o experimento de *Super Gel Shift* usando anticorpo anti-GATA1 foi usado como controle da reação.

Inicialmente foi realizada a padronização das sondas para determinar a concentração mais adequada para os experimentos de *Super Gel Shift*. Para isso, foi feita uma diluição seriada das sondas nas concentrações 10pmol, 1pmol, 100fmol, 50fmol, 25fmol e 10fmol. As sondas nessas concentrações foram aneladas através de desnaturação a 95°C por 10 min com redução gradual de temperatura. Houve saturação no gel das sondas nas concentrações 10pmol e 1pmol. As bandas referentes às sondas nas concentrações 100fmol e 50fmol estavam nítidas, definidas e fortes, enquanto que as referentes à concentração 25fmol estavam fracas. Não houve o aparecimento de bandas na concentração de 10fmol. Dessa forma, as sondas na concentração 100fmol foram selecionadas para os experimentos subsequentes (figura 6).



**Figura 6:** Padronização das concentrações das sondas biotiniladas. Análise das sondas biotiniladas sem e com a mutação -195 nas concentrações de 10pmol, 1pmol, 100fmol, 50fmol, 25fmol e 10fmol. Houve uma saturação das sondas na concentração 10pmol e 1pmol. Nas concentrações 100fmol e 50fmol foram observadas bandas bem definidas e na concentração 25fmol bandas fracas. Na concentração 10fmol o sinal não foi detectado.

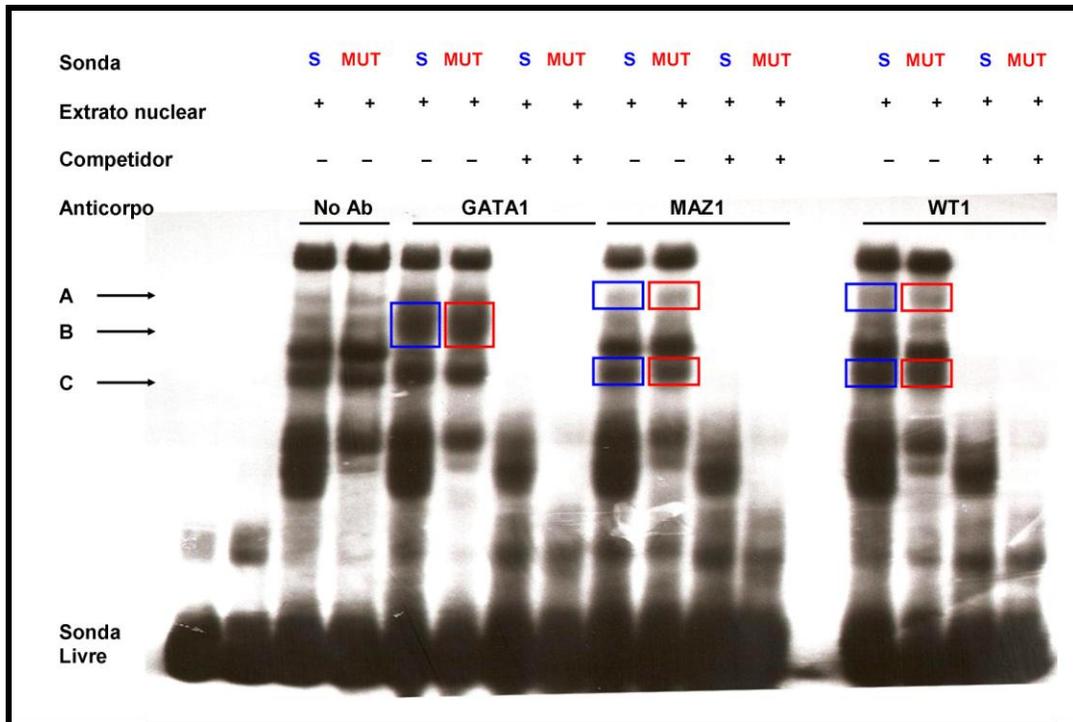
A reação de ligação entre as proteínas do extrato nuclear, o anticorpo e a sonda garantem uma melhor especificidade na interação entre esses elementos, o que é importante para o experimento de *Super Gel Shift*. Por essa razão, foram testados dois tampões de ligação. O tampão de ligação 1 contendo NaCl 50mM, KCl 30mM, Tris-HCl pH 7,5 10mM, EDTA 1mM, DTT 1mM e glicerol 10% enquanto o tampão 2 era composto de NaCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 0,3mM, Tris-HCl pH 7,5 10mM, EGTA 0,1mM, DTT 0,5mM, PMSF 0,5mM e glicerol 4% (Huang *et al.*, 2004). O tampão de ligação 1 apresentou maior eficiência do que o 2, uma vez que as bandas apareceram mais fortes (figura 7).



**Figura 7:** Padronização do Tampão de Ligação para os ensaios de *Super Gel Shift*. Sondas sem (WT) e com (MUT) a mutação –195 marcadas com biotina foram incubadas com extrato nuclear de células K562, na ausência (no Ab) ou presença de anticorpos (anti-GATA-1, anti-MAZ ou anti-WT1). O complexo DNA-proteína foi separado através de eletroforese em gel de poliácridamida e, então, transferido para uma membrana. A letra A indica o *Super Gel Shift* formado pela interação entre o anticorpo e complexo DNA-proteína enquanto que B corresponde à sonda livre.

Uma vez padronizado o tampão, o *Super Gel Shift* foi realizado usando anticorpos anti-GATA1, anti-MAZ e anti-WT1. A análise densitométrica dos resultados mostrou que a ligação das proteínas Maz e Wt1 às sondas, sem e com a mutação –195, levou a interações de

intensidades semelhantes, indicando os fatores de transcrição que codificam essas duas proteínas apresentam uma atividade de ligação ao DNA análoga na presença ou ausência da mutação -195 (figura 8, setas A e C). O controle do experimento foi a interação entre a proteína Gata-1 e as sondas biotiniladas, mutadas ou não, uma vez que a mutação não altera nenhum dos sítios do fator *GATA-1* (regiões -170 a -177 e -184 a -191). Como esperado nenhuma alteração na ligação dessa proteína foi encontrada (figura 8, seta B). A especificidade das sondas de DNA foi analisada através de experimentos de competição nos quais foi adicionado excesso de sondas não marcadas com biotina, as quais inibem a afinidade do extrato nuclear pela sonda biotinilada e, assim, não é observada a presença de bandas no gel (figura 8).



**Figura 8:** Análise de Super Gel Shif para os fatores de transcrição MAZ, WT1 e GATA-1. Sondas sem (S) e com (MUT) a mutação -195 C→G marcadas com biotina foram incubadas com extrato nuclear de células K562, na ausência (no Ab) ou presença de anticorpos (anti-GATA-1, anti-MAZ ou anti-WT1). O complexo DNA-proteína foi separado através de eletroforese em gel de poli-acrilamida e transferido para uma membrana. As letras A e C indicam, respectivamente, os complexos maior e menor formados pela interação entre o complexo DNA-proteína e o anticorpo

anti-MAZ ou anti-WT1. A letra B indica o *Super Gel Shift* formado pela interação entre o anticorpo anti-GATA-1 e o complexo DNA-proteína.

Como não encontramos diferença na atividade dos fatores de transcrição *MAZ* e *WT1* na ndPHHF-B e, ao invés de continuarmos analisando um único fator de transcrição de cada vez através de *Super Gel Shift*, optamos por utilizar a técnica de *Array* DNA-proteína para a análise simultânea de vários (345) fatores de transcrição.

### 3.2 – Interação de fatores de transcrição

#### A – Análise da concentração de hemoglobinas no sangue periférico dos indivíduos controles e portadores de ndPHHF-B

O ensaio *Array* DNA-proteína foi feito usando de extrato nuclear de células eritroides. Como as células eritroides circulantes no sangue periférico são, em sua grande maioria, anucleadas, e a punção da medula óssea para obtenção de células eritroides nucleadas é um procedimento invasivo e bastante doloroso, optamos pela realização de culturas de células eritroides a partir de células CD34<sup>+</sup> isoladas do sangue periférico de indivíduos controles e de portadores de ndPHHF-B.

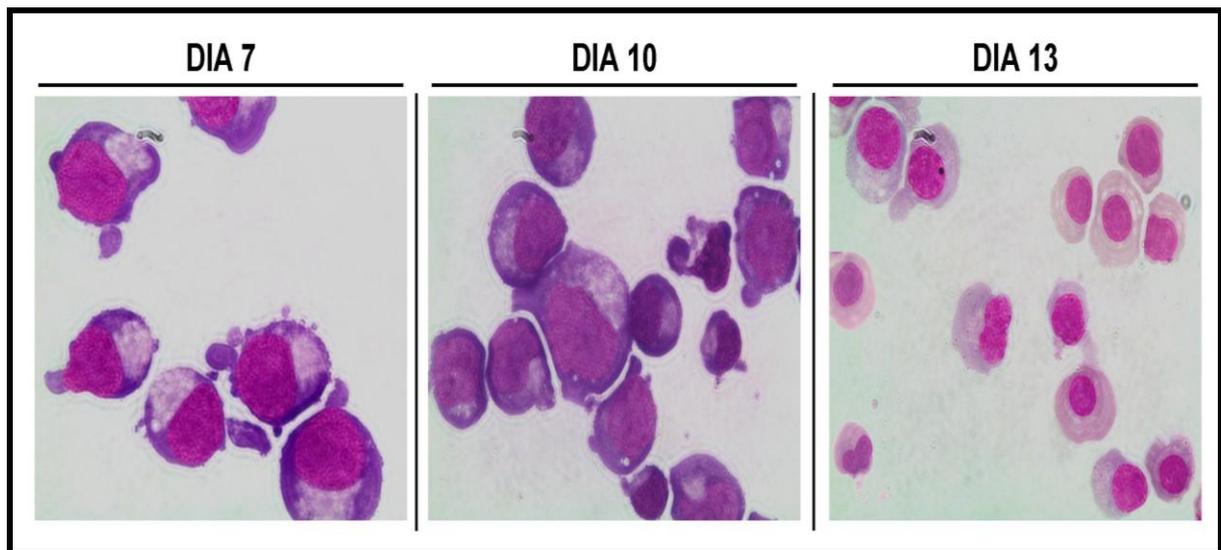
A porcentagem de HbF e de HbA2, quantificada por HPLC, dos indivíduos controles e dos portadores de ndPHHF-B selecionados para cada cultura estão apresentadas na tabela V.

**Tabela V:** Porcentagem de HbF e de HbA2 dos indivíduos selecionados para a realização das culturas eritroides.

	Níveis de HbF (%)	Níveis de HbA2 (%)	Níveis de HbF (%)	Níveis de HbA2 (%)
	CTRL		PHHF	
<b>Cultura 1</b>	0,5	3,0	15,9	2,4
<b>Cultura 2</b>	0,3	3,1	12,4	2,5
<b>Cultura 3</b>	0,3	3,3	13,9	2,6
<b>Cultura 4</b>	0,3	2,4	10,5	2,0

## B – Diferenciação eritroide – Morfologia

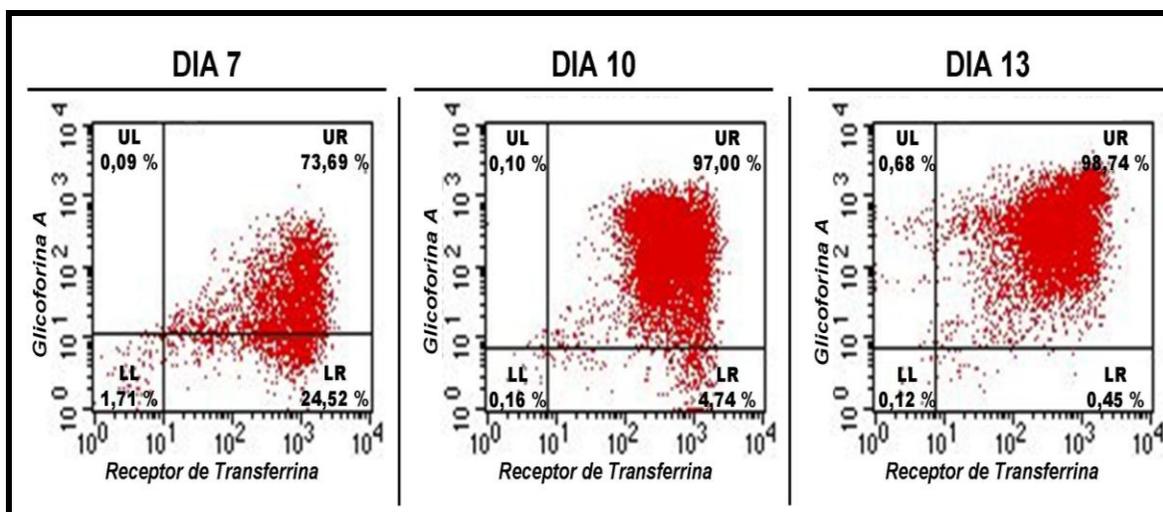
No decorrer das culturas de células eritroides foram observados todos os estágios da eritropoese: proeritroblastos, eritroblasto basofílico, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático e hemácias. Os tempos de coleta foram escolhidos com base no predomínio celular em um determinado dia de cultivo, sendo as coletas realizadas no 7º, 10º e 13º dias. No 7º dia, houve um predomínio celular de unidades formadoras de colônias eritroides (CFU-E) e proeritroblastos (células grandes com cromatina frouxa e citoplasma discretamente disforme) (figura 9A). No 10º dia, o predomínio celular foi de eritroblastos basofílicos com nucléolos evidentes e cromatina mais condensada e eritroblastos policromáticos (figura 9B). No 13º dia de cultura, houve predomínio de eritroblastos ortocromáticos (figura 9C), embora fosse possível observar células com núcleo em extrusão (figura 9C) e hemácias. Em relação à morfologia, a diferenciação eritroide ocorreu de forma semelhante em todas as culturas, não apresentando diferenças entre os controles e as ndPHHFs-B.



**Figura 9:** Diferenciação eritroide – Ilustração da morfologia celular nos 7º, 10º e 13º dias de uma das culturas eritroides. Lâminas visualizadas em microscópio óptico (aumento de 1000X) contendo células coletadas ao longo da cultura, ilustrando as fases da diferenciação eritroide. No dia 7 há predomínio de proeritroblastos; no dia 10 o predomínio celular é de eritroblastos basofílicos; e no dia 13 a população celular predominante é de eritroblastos ortocromáticos e de células com extrusão nuclear.

### C – Diferenciação eritroide – Marcadores de superfície celular

O processo de diferenciação eritroide foi acompanhado através da observação de alterações na expressão dos marcadores de superfície celular receptor de transferrina e glicoforina A, através de citometria de fluxo. O receptor de transferrina é uma glicoproteína transmembrânica expressa na superfície de células nucleadas, sendo a marcação anti-receptor de transferrina observada nas fases mais precoces da diferenciação eritroide. A glicoforina A é uma sialoglicoproteína expressa após o estágio de CFU-E e com máxima expressão nas fases mais tardia, correspondendo, dessa forma a um marcador tardio de diferenciação eritroide (Robinson *et al.*, 1981). A identificação de estágios distintos de diferenciação eritroide é realizada através da combinação dos anticorpos anti-glicoforina A e anti-receptor de transferrina: à medida que ocorre diferenciação celular, as células que possuem marcador anti-receptor de transferrina adquirem a marcação anti-glicoforina A, indicando maturação celular (Loken *et al.*, 1987). A expressão dos marcadores de superfície celular foi semelhante em todas as culturas, não apresentando diferenças entre os controles e as ndPHFs-B.

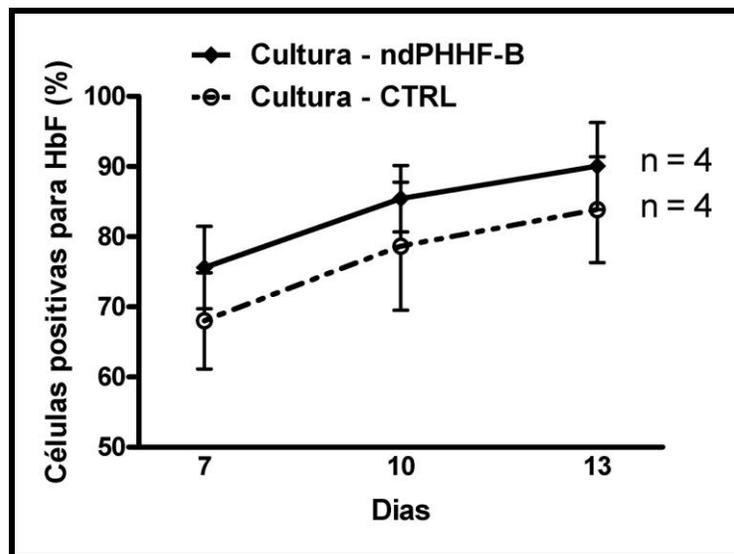


**Figura 10:** Diferenciação eritroide – Ilustração da citometria de Fluxo dos marcadores de superfície celular nos 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias de uma das culturas eritroides. Análise da expressão dos marcadores de superfície celular receptor de transferrina e glicoforina A: as células mais jovens e imaturas possuem marcador anti-receptor de transferrina e, durante sua maturação, adquirem também a marcação anti-glicoforina A.

Na figura 10 estão ilustrados os *dot plots* da citometria de fluxo usando anticorpo anti-receptor de transferrina e anti-glicoforina A em uma das culturas realizadas para verificação da diferenciação eritroide. No 7º dia de cultura, a maior parte das células expressavam o marcador de superfície celular receptor de transferrina enquanto uma pequena parte apresentava marcação duplo positiva em relação aos marcadores receptor de transferrina e glicoforina A. No 10º dia, a maioria da população estava fortemente marcada por ambos os anticorpos. No 13º dia, uma parte da população eritroide apresentou marcação positiva apenas para glicoforina A, indicando que a cultura era composta de células maduras e até mesmo anucleadas, que haviam perdido o marcador para o receptor de transferrina.

#### D – Aumento na produção de HbF na cultura eritroide de portadores de ndPHHF-B

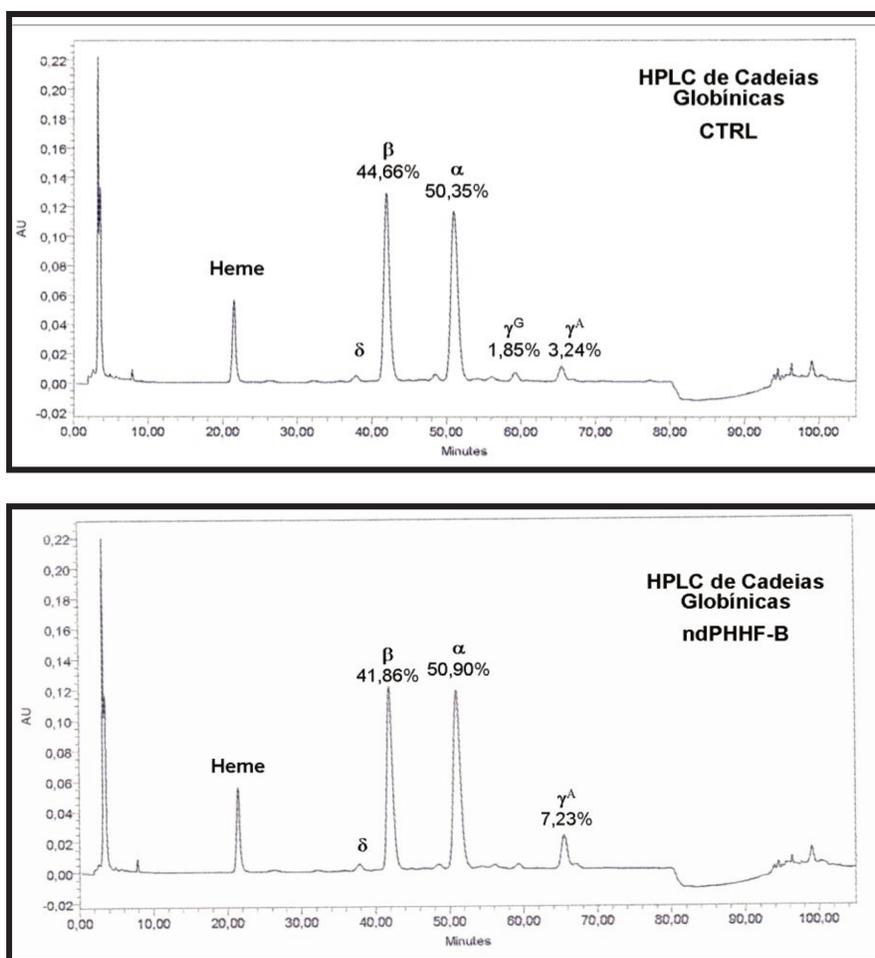
A produção de HbF também foi acompanhada através de citometria de fluxo. Como pode ser observado na figura 11, nas 4 culturas eritroides dos portadores de ndPHHF-B há uma porcentagem maior de células positivas, indicando a presença de um número maior de células F contendo HbF.



**Figura 11:** *Produção de HbF avaliada através de citometria de fluxo.* Produção de HbF nas culturas eritroides dos indivíduos portadores de ndPHHF-B (n=4) e dos controles (n=4). A abscissa representa os dias da cultura e a ordenada a porcentagem de células positivas para HbF (%).

## E – Aumento na produção de cadeias das globinas na cultura eritroide de portadores de ndPHHF-B

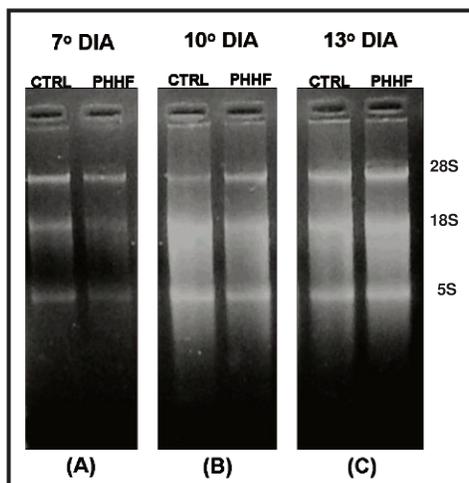
A produção de cadeias globínicas no 13º dia (predomínio celular de eritroblasto ortocromáticos e de células extruindo seus núcleos) de uma das quatro culturas eritroides foi analisada através de HPLC a fim de determinar a porcentagem de cada cadeia globínica produzida. A cultura controle apresentou uma síntese de 3,24% de cadeia  $\gamma^A$  e de 1,85% de cadeia  $\gamma^G$ , enquanto que na do portador de ndPHHF-B foi observada o dobro de produção de cadeia da globina  $\gamma^A$ , 7,23% (figura 12).



**Figura 12:** HPLC de cadeias globínicas de uma das culturas eritroides. Cromatograma referente ao HPLC de cadeias globínicas de uma cultura eritroide de um indivíduo controle (3,24% de cadeia  $\gamma^A$  e 1,85% de cadeia  $\gamma^G$ ) e de um portador de ndPHHF-B (7,23% de cadeia  $\gamma^A$ ).

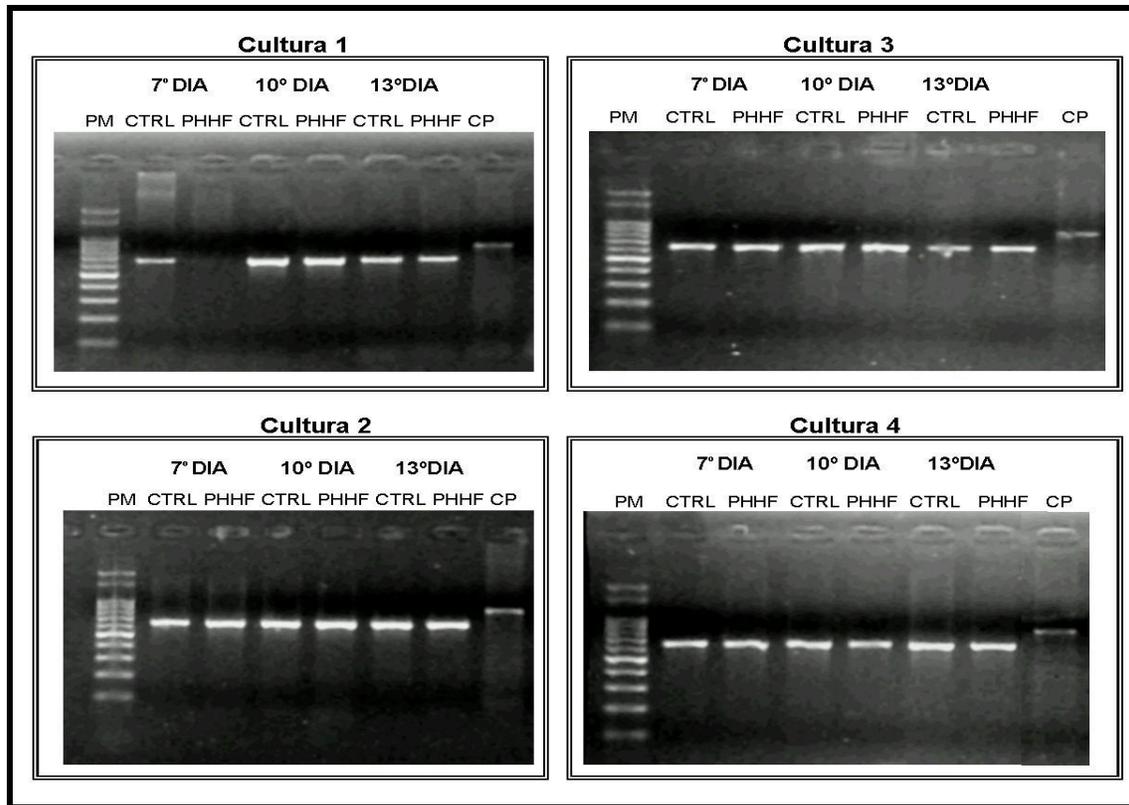
## F – Aumento na expressão do gene das globinas $\gamma$ na cultura eritroide de portadores de ndPHHF-B

A integridade do RNA extraído de todas as culturas foi verificada através de eletroforese em gel desnaturante. O perfil observado após a corrida eletroforética do RNA extraído de uma das culturas está apresentado na figura 13.



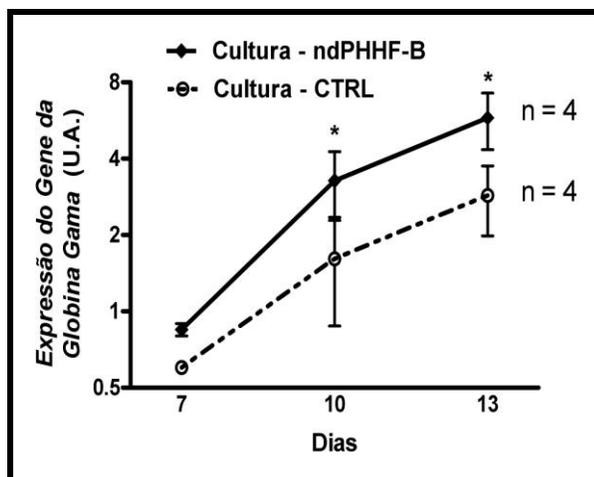
**Figura 13:** *Integridade dos RNA.* Os RNA foram extraídos de amostras coletadas nos 7° (A), 10° (B) e 13° (C) dias da cultura eritroide dos indivíduos controles (CTRL) e dos portadores de ndPHHF-B (PHHF), utilizando o *Kit Micro Rneasy*. As amostras foram visualizadas em gel desnaturante, observando a integridade das subunidades 28S, 18S e 5S do RNA.

Após a síntese da fita de cDNA, para verificar a qualidade, a PCR foi realizada para a amplificação do gene endógeno  $\beta$ -actina. A amplificação resultou em bandas únicas, bem definidas e do tamanho esperado (643pb) para os cDNAs referentes aos RNA do 7°, 10° e 13° dias das culturas eritroides dos indivíduos controles e dos portadores de ndPHHF-B. Como controle de reação, uma amostra de DNA foi usada para amplificação de um produto de 863pb (figura 14). As amostras referentes ao 7° dia da cultura 1 apresentaram bandas muito fracas, optando por não utilizá-las nos experimentos de PCR em tempo real.



**Figura 14:** Amplificação de um fragmento do gene endógeno  $\beta$ -actina. Amplificação de um fragmento de 643pb do gene  $\beta$ -actina em amostras de cDNA referentes ao RNA extraídos nos 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias das culturas eritroides de indivíduos controles (CTRL) e de portadores de ndPHHF-B (PHHF). PM corresponde ao peso molecular (100pb) e CP ao controle positivo – amplificação de uma amostra de DNA .

A análise da expressão do gene da globina  $\gamma$  nas culturas dos indivíduos controles e dos portadores de ndPHHF-B foi realizada através de PCR em Tempo Real, a partir de cDNAs sintetizados de RNAs extraídos nos 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias de cada cultura. Uma maior expressão do gene da globina  $\gamma$  foi observada nas culturas dos portadores de ndPHHF-B quando comparada às culturas controle no decorrer da toda a diferenciação eritroide (figura 15).



**Figura 15:** Expressão do Gene da Globina  $\gamma$  avaliada por PCR em Tempo Real. Expressão do gene da globina  $\gamma$  nas culturas dos indivíduos controles (n=4) e portadores de ndPHHF-B (n=4). A abscissa representa os dias da cultura e a ordenada as unidades arbitrárias (U.A.). O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (Teste de Mann-Whitney).

O extrato nuclear com predomínio celular de eritroblastos basofílicos e policromáticos, que corresponde ao 10º dia das culturas, foi utilizado para os ensaios de *Array* DNA-proteína. Nesta fase a maquinaria transcricional está muito ativa e a população celular ainda é predominantemente nucleada, há diferença significativa ( $p = 0,04$ ) na expressão do gene da globina  $\gamma$  entre as culturas dos controles e dos portadores de ndPHHF-B, além de diferença no número de células positivas para HbF.

#### **G – Análise do *Array* DNA-proteína revelou uma série de fatores de transcrição com diferença de atividade**

A análise simultânea da interação de 345 fatores de transcrição diferentes foi realizada através da técnica de *Array*. O extrato nuclear do 10º dia das culturas controle e dos portadores de ndPHHF-B foi hibridizado com sondas biotiniladas referentes aos diferentes fatores de transcrição. A densidade de cada *spot* da membrana do *Array* foi analisada usando o *software TotalLab Quant* (England, UK) e, após subtração do *background*, foi feita uma normalização dos valores usando os *spots* calibradores localizados na linha p e coluna 24 de cada membrana.

Todos os experimentos de *Array* foram realizados em duplicatas. Uma compatibilidade de 97% entre cada duplicata foi observada. Ao comparar as atividades dos fatores de transcrição nos *Arrays* das 4 culturas realizadas, obtivemos concordância em 94% dos dados, indicando um bom grau de confiabilidade em relação à técnica utilizada.

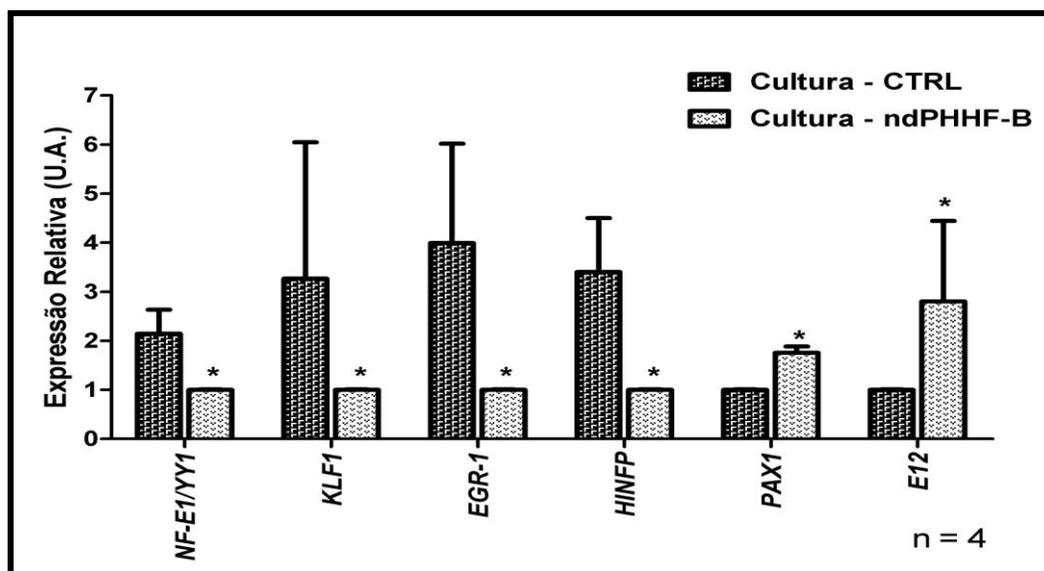
A análise densitométrica mostrou diferenças na atividade de diversos fatores de transcrição entre as culturas dos indivíduos controles (CTRL) e as dos portadores de ndPHHF-B (PHHF). Esses fatores estão listados na tabela VI, sendo que o valor da diferença de atividade está representado em termos de razão entre o CTRL e a PHHF ou vice-versa. A tabela abaixo discrimina alguns fatores cuja variação na sua atividade dentro da mesma população é menor do que 5 (grupo 1) ou maior do que 5 (grupo 2). No grupo 3, estão alguns fatores cuja atividade não segue um mesmo padrão entre as populações.

**Tabela VI:** Análise densitométrica de alguns fatores de transcrição que apresentaram diferença em sua atividade de ligação ao DNA nos extratos nucleares das culturas eritroides controle comparada a dos ndPHHF-B.

	Cultura 1		Cultura 2		Cultura 3		Cultura 4	
	CTRL	PHHF	CTRL	PHHF	CTRL T	PHHF	CTRL	PHHF
<b>GRUPO 1</b>								
<i>c-Rel</i>	2,18	1,00	4,74	1,00	3,78	1,00	2,46	1,00
<i>EGR-1</i>	2,27	1,00	6,87	1,00	3,76	1,00	2,96	1,00
<i>Fast-1 / FOXH1</i>	4,31	1,00	1,94	1,00	4,42	1,00	4,44	1,00
<i>HFH-1/FOXQ1</i>	6,78	1,00	1,81	1,00	4,96	1,00	5,37	1,00
<i>HINFP</i>	2,77	1,00	3,82	1,00	4,74	1,00	2,28	1,00
<i>LyF / Ikaros</i>	2,55	1,00	2,91	1,00	3,08	1,00	2,42	1,00
<i>NF-E1/YY1</i>	2,61	1,00	1,64	1,00	2,51	1,00	1,91	1,00
<i>PAX-1</i>	1,00	1,82	1,00	1,77	1,00	1,56	1,00	1,86
<i>PAX-2</i>	2,86	1,00	2,78	1,00	1,09	1,00	1,76	1,00
<i>PAX-6</i>	1,00	2,61	1,00	5,16	1,00	1,97	1,00	1,46
<i>PU.1</i>	5,35	1,00	5,74	1,00	9,08	1,00	2,99	1,00
<i>Afxh/FOXO4</i>	6,59	1,00	2,03	1,00	5,54	1,00	4,60	1,00

	Cultura 1		Cultura 2		Cultura 3		Cultura 4	
	CTRL	PHHF	CTRL	PHHF	CTRL T	PHHF	CTRL	PHHF
<b>GRUPO 2</b>								
<i>ADR-1</i>	2,02	1,00	17,20	1,00	8,16	1,00	4,75	1,00
<i>KLF</i>	1,09	1,00	3,43	1,00	7,14	1,00	1,41	1,00
<i>HNF-1A</i>	1,72	1,00	17,33	1,00	4,59	1,00	2,46	1,00
<i>HNF-3</i>	9,81	1,00	1,60	1,00	5,44	1,00	2,79	1,00
<i>LF-A1</i>	4,02	1,00	15,1	1,00	4,53	1,00	2,13	1,00
<b>GRUPO 3</b>								
<i>EBP-40/45</i>	0,58	1,00	0,23	1,00	1,79	1,00	1,27	1,00
<i>PARP</i>	0,62	1,00	1,11	1,00	2,34	1,00	2,13	1,00
<i>TEF1</i>	0,52	1,00	0,32	1,00	1,14	1,00	1,20	1,00

Selecionamos 6 fatores de transcrição relacionados à eritropoese, identificados através do *Array* DNA-proteína, cuja atividade densitométrica está representada na figura 16. Houve uma diminuição na atividade de ligação dos fatores *NF-E1/YY1*, *EKLF*, *EGR-1* e *HINFP* e uma aumento na atividade dos fatores *PAX1* e *E12*, no extrato nuclear das culturas eritroides dos portadores de ndPHHF-B (n=4) em comparação ao das culturas controle (n=4).



**Figura 16:** Análise densitométrica de 6 fatores de transcrição identificados através de *Array* DNA-proteína. A atividade de ligação dos fatores *NF-E1/YY1*, *EKLF*, *EGR-1*, *HINFP*, *PAX1* e *E12* apresentou diferença nos extratos nucleares das culturas controle (n=4) comparada à dos ndPHHF-B (n=4). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (Teste de Mann-Whitney).

O ensaio de *Array* DNA-proteína gera uma grande quantidade de dados e fica a critério do investigador analisar, selecionar e validar os resultados obtidos, através de outros métodos. Para a validação dos nossos resultados optamos pela realização dos ensaios de EMSA e imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para a análise da interação dos fatores de transcrição *NF-E1/YY1* e *PAX1*, uma vez que apresentam elementos *cis* de ligação ao DNA localizados na região -195 do promotor do gene da globina da  $\gamma^A$ .

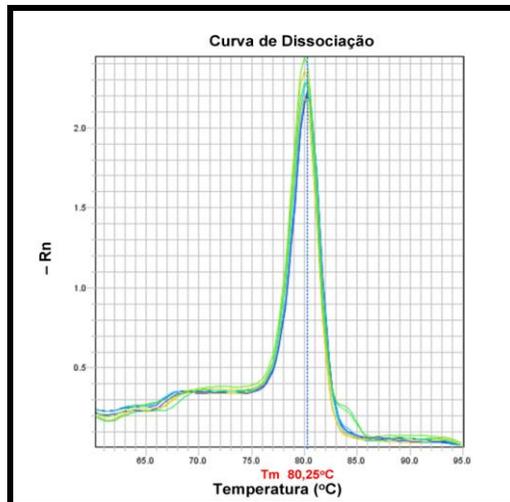
#### **H – Ensaios de EMSA mostram a atividade diminuída do fator de transcrição *NF-E1/YY1* e aumentada do *PAX1* na presença da mutação -195**

As sondas usadas nos ensaios de EMSA referentes aos fatores de transcrição *NF-E1/YY1* e *PAX1* possuem sequência idêntica às hibridizadas na membrana do *Array* DNA-proteína. A análise da interação desses fatores de transcrição foram feitas usando os mesmos extratos utilizados nos experimentos de *Array*: extratos nucleares das culturas eritroides dos portadores de ndPHHF-B e das culturas dos indivíduos controles. Após eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência para membrana de *nylon*, os complexos DNA-proteína e a sonda livre foram identificados por ensaio de quimioluminescência com estreptavidina e peroxidase.

O resultado da hibridização para o fator de transcrição *NF-E1/YY1* evidencia a formação de uma banda de maior intensidade formando um *shift* na amostra referente ao extrato nuclear das culturas dos indivíduos controles, quando comparado com as culturas dos portadores de ndPHHF-B (figura 17A). Isso indica uma maior atividade desse fator de transcrição *NF-E1/YY1* na ausência da mutação -195. O resultado da hibridização para o fator de transcrição *PAX1* evidencia a formação de uma banda de maior intensidade formando um *shift* na amostra referente ao extrato nuclear das culturas dos portadores de ndPHHF-B, quando comparado com as culturas controle (figura 17B). Desse modo, a atividade desse fator de transcrição *PAX1* é maior na presença da mutação -195 C→G.

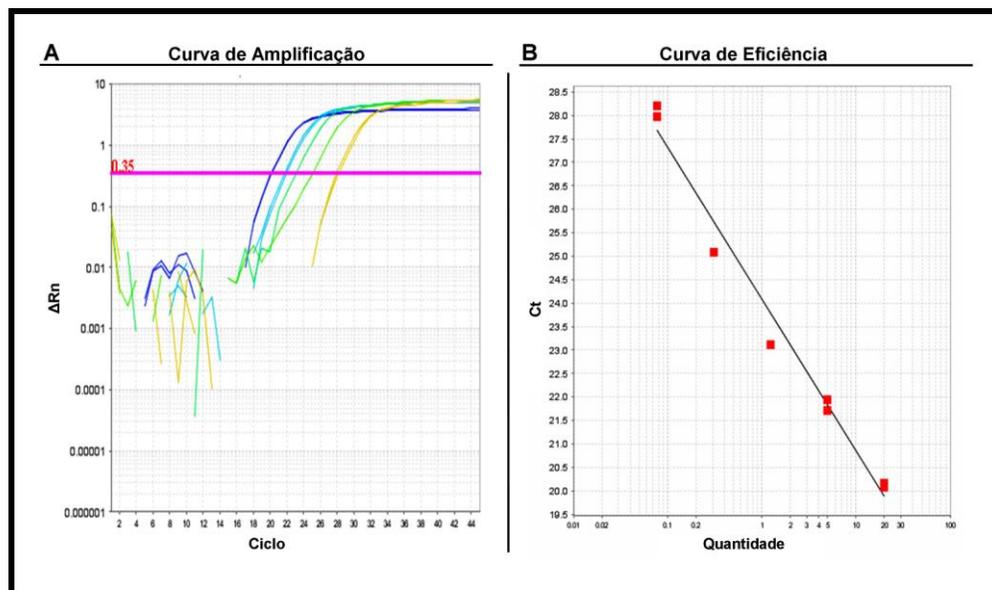
Nos ensaios de competição, usados para discriminar uma ligação específica de uma inespecífica, não foi observada a formação do *shift*, indicando que a interação, observada anteriormente, era específica para cada fator de transcrição em estudo.





**Figura 18:** Curva de dissociação do primer promotor gene da globina  $\gamma^A$ . Na temperatura de 80,25°C ocorre desnaturação do produto amplificado. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores.

Então, determinamos a faixa de concentração ótima de amostra e a eficiência de reação.

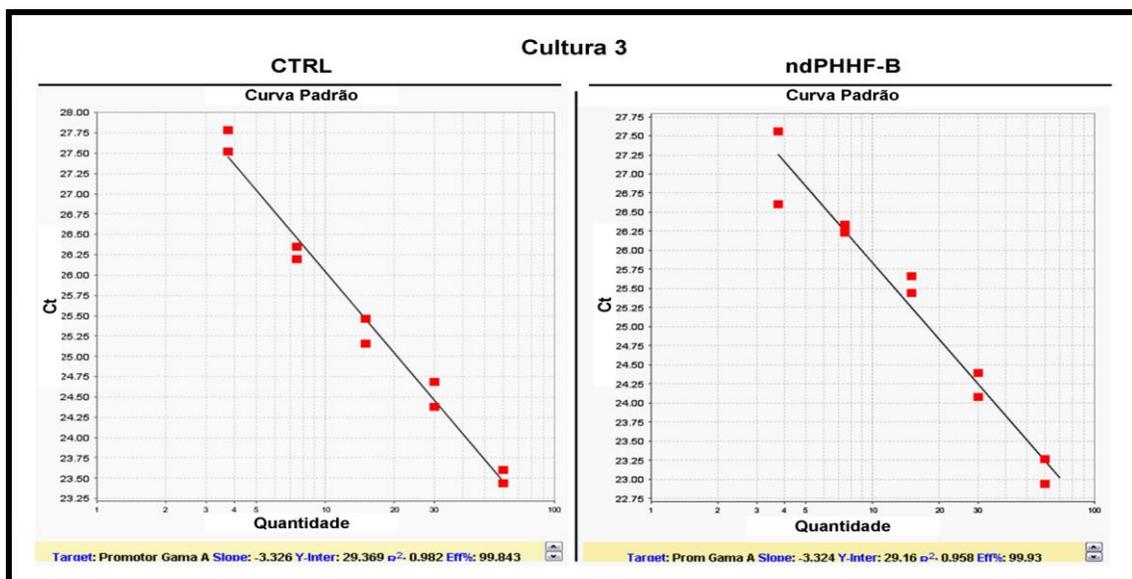


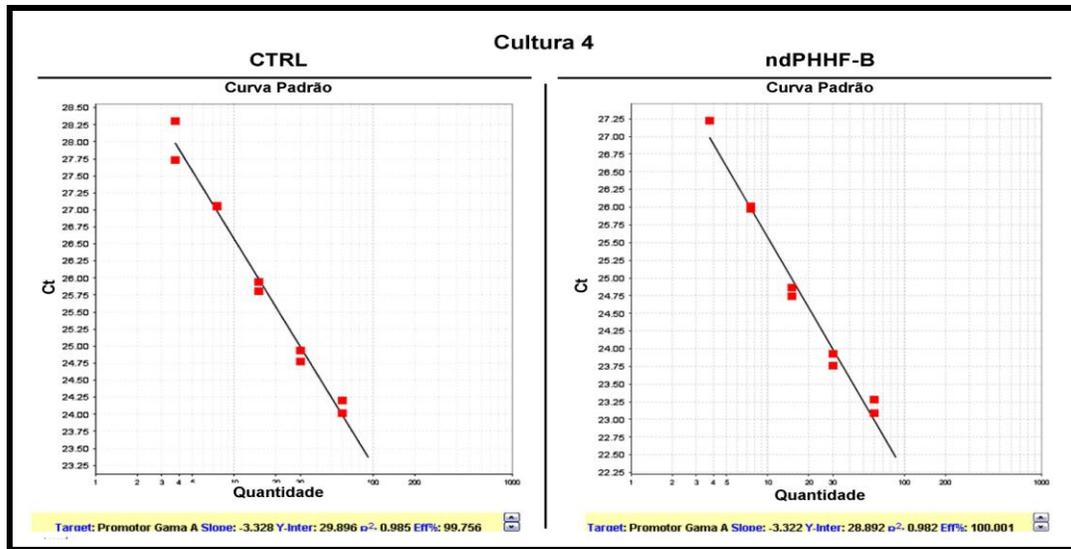
**Figura 19:** Análise da eficiência de amplificação do primer promotor do gene  $\gamma^A$ . **(A)** curva de amplificação onde a ordenada representa o  $\Delta Rn$  (intensidade de fluorescência) e a abscissa x o número de ciclos.; **(B)** curva de eficiência onde a ordenada representa o  $Ct$  e a abscissa a quantidade de cDNA.

**Tabela VII:** Sequência, temperatura de desnaturação, tamanho dos fragmentos amplificados, concentração ótima e eficiência do *primer* promotor do gene da globina  $\gamma^A$ .

Gene	Produto Amplificado		Concentração Ótima	Eficiência
	Temperatura de Desnaturação	Tamanho		
Promotor globina $\gamma^A$	80,25°C	127 pb	150 nM	100,0%

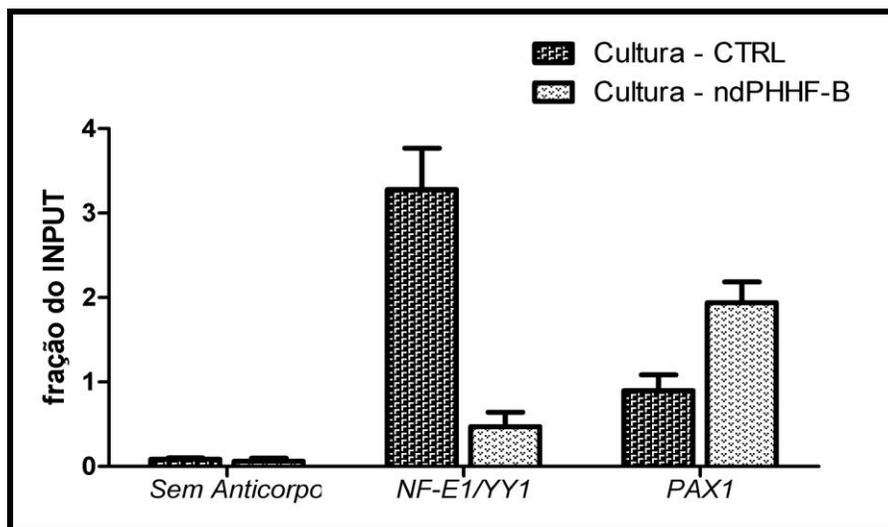
A quantificação dos imunoprecipitados foi realizada através da construção de uma curva padrão das amostras denominadas INPUT. Inicialmente, foi feita uma diluição seriada nas concentrações  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , e  $10^{-5}$ . Como a curva padrão não apresentou o perfil esperado, optamos por quantificar, através do espectrofotômetro NanoDrop, as amostras INPUTs e construir uma nova curva padrão, para cada imunoprecipitado em análise. As amostras INPUT foram então diluídas nas concentrações de 3,75ng, 7,5ng, 15ng, 30ng e 60ng. As curvas padrão referentes a cada amostra INPUT estão apresentadas na figura 20..





**Figura 20:** Curva padrão do INPUT referente a cada população em análise.

A quantificação de cada amostras em relação à curva padrão da amostra INPUT está representada no gráfico abaixo. A análise do ChIP mostrou que na presença da mutação  $-195$  C $\rightarrow$ G há um menor recrutamento do fator de transcrição *NF-E1/YY1* e um maior recrutamento do fator *PAX1* para a região promotora do gene  $\gamma^A$  globina.



**Figura 21:** Quantificação da interação entre os fatores de transcrição *NF-E1/YY1* e *PAX1* à região promotora do gene da globina  $\gamma^A$ . Interação entre os fatores *NF-E1/YY1* ou *PAX1* e o promotora do gene da globina  $\gamma^A$  no extrato nuclear das culturas controle (CTRL, n=2) e dos portadores de ndPHHF-B (n=2), analisada por PCR em Tempo Real após o ensaio de ChIP.

## V. CAPÍTULO 2:

GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

na ndPHHF tipo BRASILEIRA



# 1. OBJETIVOS

- ✓ Identificar genes diferencialmente expressos na ndPHHF-B.
- ✓ Analisar a expressão de alguns dos genes diferencialmente expressos identificados.
- ✓ Analisar a expressão de algumas proteínas traduzidas pelos genes diferencialmente expressos.

# 2. MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1 – Células eritroides – reticulócitos

### A – Separação de Reticulócitos

Um volume de 4mL de sangue venoso periférico, coletado em tubo contendo EDTA como anticoagulante, foi transferido para um tubo *Falcon* e centrifugado a 3.000 rpm por 10 min e temperatura de 4°C. Após o plasma ser descartado, foi adicionada solução de lise de hemácias ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M;  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M) na quantidade de 5x o volume de papa de hemácias. As amostras foram incubadas por 30 min no gelo, com agitação vigorosa a cada 5 min. Após centrifugação a 3.000 rpm por 15 min e temperatura de 4°C, o sobrenadante contendo reticulócitos foi transferido para novo tubo, adicionando solução de Sucrose (1,5M) / KCl (0,15M) preparada com água tratada com DEPC, num volume correspondente a 1/10 do volume desse sobrenadante. Uma centrifugação a 5.000 rpm por 20 min e temperatura de 4°C foi realizada para a sedimentação de *debris* celulares. O sobrenadante contendo apenas reticulócitos foi transferido para um novo tubo.

Para a obtenção do RNA de reticulócitos, esse sobrenadante foi tratado com 700 $\mu\text{L}$  de ácido acético 10% e centrifugado a 5.000 rpm por 20 min e 4°C. O precipitado foi então ressuspenso em 1mL de TRIzol (Invitrogen) e armazenado a – 80°C.

Para a obtenção das proteínas de reticulócitos, esse sobrenadante foi centrifugado a 2.000 rpm por 40 min e 4°C. O pellet foi lavado duas vezes com PBS, ressuspenso em 100 $\mu\text{L}$  de água e transferido para um *ependorf*, o qual foi incubado a – 80°C.

### **B – Extração de Proteínas de Reticulócitos**

A amostra contendo reticulócitos ressuspensos em água foi descongelada para provocar a ruptura da membrana celular. Após centrifugação (13.500 rpm, 30 min, 4°C), o sobrenadante foi coletado e a concentração das proteínas foi determinada usando o ensaio de Bradford.

### **C – Extração de RNA de Reticulócitos**

A amostra contendo RNA estocado em 1mL de TRIzol foi descongelada em banho de gelo. Um volume de 200µL de clorofórmio foi adicionado, agitando vigorosamente. Uma incubação a temperatura ambiente foi feita por 5 min, seguida por centrifugação a 13.500 rpm por 15 min a 4°C. A fase aquosa (superior) foi transferida para novo *ependorf* e 500µL de isopropanol gelado foram adicionados. A amostra foi incubada por 10 min à temperatura ambiente, sendo centrifugada a 13.500 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o RNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75% gelado. Após centrifugação a 11.500 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o RNA foi solubilizado em 12µL de água tratada com DEPC.

A concentração de RNA total extraído de reticulócitos foi determinada usando o espectrofotômetro NanoDrop (comprimento de onda de 260 nanômetros).

A análise da integridade do RNA total extraído foi feita através de eletroforese em gel desnaturante 1,5% contendo formaldeído.

### **D – Síntese de DNA complementar (cDNA)**

A síntese do cDNA foi realizada a partir do 1µg RNA, previamente tratado com *DNAseI*, de reticulócitos isolados do sangue periférico.

### **E – PCR em Tempo Real**

A expressão dos genes das globinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  nas 11 amostras dos portadores de ndPHHF-B e nas amostras dos 11 indivíduos controles foi analisada por PCR em Tempo Real.

**Tabela VIII:** Sequência de cada par de *primers* e concentração ótima utilizada para a amplificação dos genes das globinas.

Gene	Primers	Concentração Ótima
<i>globina α – Sense</i>	5'– GGCGAGTATGGTGC GGAG –3'	150 nM
<i>globina α – Antisense</i>	5'– TGCGGGAAGTAGGTCTTGGT –3'	
<i>globina β – Sense</i>	5'– CACTGTGACAAGCTGCACGTG –3'	150 nM
<i>globina β – Antisense</i>	5'– GCACACAGACCAGCACGTTG –3'	
<i>globina γ – Sense</i>	5'– TGTGGAAGATGCTGGAGGAGA –3'	150 nM
<i>globina γ – Antisense</i>	5'– CAAAGAACCTCTGGGTCCATG –3'	
<i>β-actina – Sense</i>	5'– AAAGAGATGGCCACGGCTGCT –3'	150 nM
<i>β-actina – Antisense</i>	5'– TCGCTCCAACCGACTGCTGT –3'	
<i>GAPDH – Sense</i>	5'– GCACCGTCAAGGCTGAGAAC –3'	150 nM
<i>GAPDH – Antisense</i>	5'– CCACTTGATTTTGGAGGGATCT –3'	

## 2.2 – Biblioteca Subtrativa

As Bibliotecas Subtrativas Supressivas foram construídas usando *PCR-Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech Laboratories). Essa técnica possibilita a comparação entre duas populações distintas de RNA e a obtenção de clones que estão expressos em apenas uma condição (Diatchenko *et al.*, 1996). No nosso caso, comparamos transcritos obtidos a partir de RNA de reticulócitos de portadores de ndPHHF-B e de indivíduos controles. Dois *pools* de RNA foram preparados, um contendo RNAs de 5 amostras de controles e outro contendo RNAs de 5 amostras de portadores de ndPHHF-B, e tratados com *DNAseI*.

### A – Síntese e amplificação de cDNAs

Para a construção das Bibliotecas, os cDNA de uma população foi denominado *tester* e da outra *driver*. Na biblioteca *forward*, o cDNA *tester* corresponde a amostra dos indivíduos controles e o cDNA *driver* a dos portador de ndPHHF-B. Na biblioteca *reverse*, o cDNA *tester* corresponde a amostra dos portadores de ndPHHF-B e o cDNA *driver* a dos indivíduos controles.

Assim, na biblioteca *forward* estão identificados os transcritos presentes apenas nos controles e na *reverse* os transcritos presentes apenas nos portadores de ndPHHF-B.

Para a síntese do cDNA, 500ng do *pool* de RNA previamente tratado, 3'-BD SMART CDS Primer II A 2,4μM (5' – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT<sub>(30)</sub>VN – 3', sendo V = A, G ou C e N = qualquer base nitrogenada) e SMART II A Oligonucleotide 2,4μM (5' – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG – 3') foram incubados a 70°C por 2 min. Em seguida, foram adicionados *First-Strand Syntesis Buffer 1x*, DTT 2mM, dNTP 1mM e 20U de *AMV PowerScript Reverse Transcriptase* (20U/μL), incubando por 1 hora a 42°C. O tampão Tris-EDTA foi então adicionado para volume final de 50μL.

A qualidade da síntese de cDNA foi verificada através da amplificação do gene *β-actina*, usando tampão de enzima 1x; MgCl<sub>2</sub> 2mM; dNTP 200μM; primer *β-actina Sense* 0,32μM; primer *β-actina Antisense* 0,32μM; 1U de enzima *Taq polimerase* 5U/μL (Invitrogen); e 50ng de cDNA. A programação usada foi: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de amplificação através de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 2 min, com uma extensão final por 5 min a 72°C. A análise do produto de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose.

Antes da amplificação total dos cDNAs, foi feita a otimização do número de ciclos da LD PCR usando tampão da enzima 1x; MgSO<sub>4</sub> 2mM; dNTP 200μM; 5' PCR Primer (5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3') 0,48μM; 2,5U de enzima *Platinum Taq HiFi* 5U/μL; cDNA diluído 1:10. A programação da LD PCR foi: desnaturação inicial de 1 min a 95°C, seguida de amplificação através de 35 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 15 s e 68°C por 6 min. Foram retirados 5μL de amostra a cada 3 ciclos da LD PCR para análise da amplificação. Após a determinação do número ótimo de ciclos, um volume de 96μL de cDNA foi amplificado - LD PCR.

### **B – Digestão com *RsaI***

O produto da LD PCR foi purificado usando *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega). O produto da LD PCR foi homogeneizado com solução *Membrane Binding Solution* e transferido para uma *SV Minicolumn* previamente tratada com a mesma solução. Uma incubação por 1 min a temperatura ambiente foi feita, seguida de centrifugação por 2 min a temperatura

ambiente. O eluato foi descartado e a solução *Membrane Wash Solution* foi adicionada à *SV Minicolumn* seguida de centrifugação por 2 min a temperatura ambiente. A *SV Minicolumn* foi transferida para um novo *ependorf* e a eluição da LD PCR foi feita através da adição de água a 65°C, seguida de incubação por 1 min a temperatura ambiente e de centrifugação por 2 min.

Os cDNA *tester* e *driver* amplificados e purificados foram digeridos com a enzima *Rsal*. Para a digestão, ao volume de 96µL do produto de *LD PCR* purificado foram adicionados tampão *Tango* 1x e 30U da enzima *Rsal* 10U/µL, incubando *overnight* a 37°C. Após esse período, foi adicionado EDTA / Glicogênio para a inativação da enzima. A confirmação da digestão foi realizada através de uma eletroforese usando cDNA não digerido e cDNA digerido. O produto da digestão foi purificado adicionando igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Invitrogen) e centrifugado a 13.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com glicogênio 0,5%, acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto, incubando em banho de gelo seco com etanol por 15 min e centrifugando a 13.000 rpm por 30 min a 4°C. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado a 13.000 rpm por 10 min a 4°C, e ressuspenso em 150µL de água DEPC. A verificação da integridade do DNA purificado foi feita através de eletroforese.

### **C – Ligação dos Adaptadores**

Para a ligação dos adaptadores, o cDNA *tester* digerido e purificado foi diluído em água na proporção 1:5. Um volume de 2µL dessa amostra de cDNA *tester* purificada, digerida e diluída 1:5 foi ligado a 2µL de adaptador 1 10µM (adaptador 1: 5'–CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGAGGT–3') ou adaptador 2R 10µM (5'–CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT–3'), adicionando, a cada reação, 6 µL de *Master Mix* (contendo 2 µL de tampão *T<sub>4</sub> DNA ligase* 5x, 1µL de enzima *T<sub>4</sub>DNA ligase* e 3µL de água). Foram misturados 2µL da ligação com o adaptador 1 e 2µL da ligação com o adaptador 2R, reservando-os como *tester* não subtraído. As ligações foram incubadas *overnight* a 16°C. Após esse período, foi adicionado, em cada tubo, 1µL de EDTA / Glicogênio, e foi feita uma incubação a 72°C por 5 min para inativar a enzima *ligase*.

## **D – Hibridizações**

Na primeira hibridização, cada 1,5µL de cDNA *tester* (ligado ao adaptador 1 ou ao adaptador 2R) foi hibridizada separadamente com 1µL de tampão de hibridização 4x e 1,5µL de cDNA *driver* também digerido com *RsaI* e purificado. Foram feitas duas incubações: uma a 98°C por 1,5 min seguida por outra a 68°C por 8 horas. Desse modo, as moléculas que são expressas apenas na população cDNA *tester*, correspondentes às moléculas diferencialmente expressas nessa população, estão na condição de fita simples e possuem adaptadores diferentes ligados às suas extremidades. As moléculas comuns às duas populações sofrem hibridização, com consequente formação de estruturas dupla fita. As moléculas específicas da população *driver* também estão na forma de fita simples, mas não possuem os adaptadores ligados as suas extremidades e, por isso, não são amplificadas por PCR nas etapas posteriores.

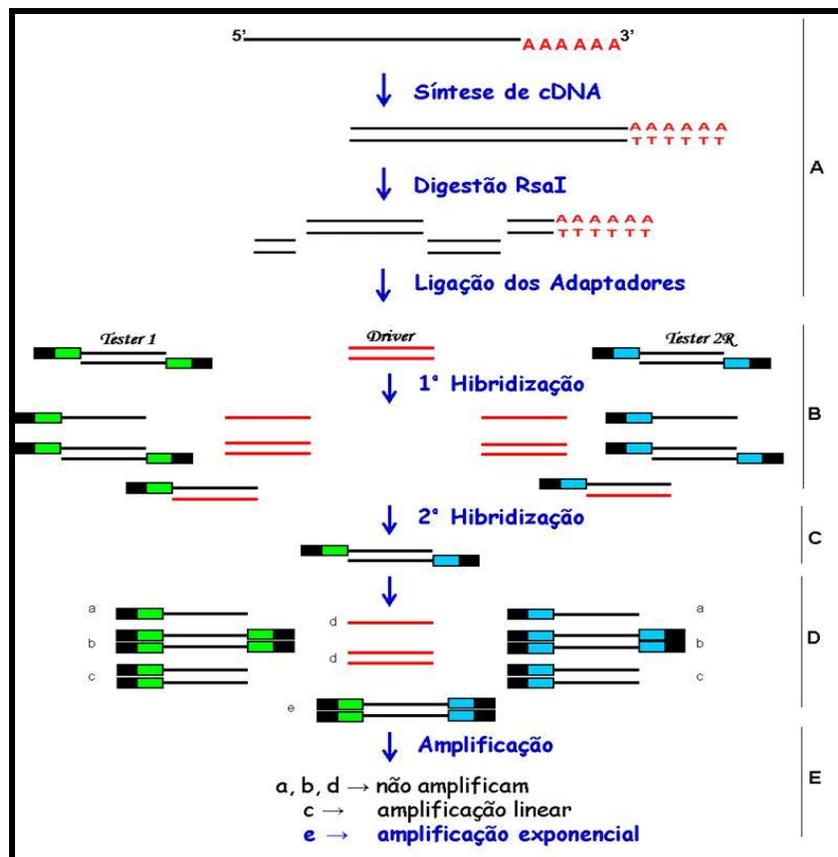
Na segunda hibridização foram misturadas as alíquotas de cDNA *tester* da 1ª hibridização com 1µL de uma mistura, contendo 1µL de cDNA *driver* digerido com *RsaI* (previamente desnaturado a 98°C por 1,5 min), 1µL de tampão de hibridização 4x e 2µL de água. A mistura foi realizada da seguinte forma: com uma pipeta marcando 15µL foi pipetado o volume total do tubo contendo o adaptador 2R, puxando um pouco de ar na ponteira; em seguida foi pipetado o *driver* desnaturado a 98°C. Essas amostras foram transferidas para o tubo da 1ª hibridização contendo o adaptador 1, aquecido a 68°C, homogeneizando. Dessa forma, o conteúdo dos 3 tubos (cDNA *tester* ligado ao adaptador 1 após 1ª hibridização; cDNA *tester* ligado ao adaptador 2R após 1ª hibridização; e cDNA *driver*) foram misturados ao mesmo tempo. As reações foram incubadas *overnight* a 68°C. Após esse período, 200µL de tampão de diluição foram adicionados à amostra, incubando a 68°C por 7 min. Apenas as moléculas fita simples específicas formam estruturas em dupla fita.

## **E – Amplificação dos Transcritos**

A PCR (1ª amplificação) foi realizada usando tampão *Advantage 2 PCR Buffer* 1x; dNTP 1,25mM; 5' *PCR Primer 1* 0,20µM; enzima *50x Advantage cDNA polymerase mix* (Clontech); e cDNA. A programação utilizada foi: 5 min a 75°C (preenchimento das extremidades dos

adaptadores na molécula de dupla fita); desnaturação inicial a 94°C por 25 s, seguida de amplificação através de 30 ciclos de 94°C por 10 s, 66°C por 30 s e 72°C por 1,5 min. A análise do produto de PCR foi feita através de eletroforese. Para essa amplificação também foram avaliados os cDNAs não subtraídos previamente diluídos.

Após a verificação da qualidade da PCR, foi realizada a *Nested* PCR (2ª amplificação), usando tampão *Advantage 2 PCR Buffer* 1x; dNTP 200µM; *Nested PCR Primer 1* 0,8µM (5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'); *Nested PCR Primer 2R* 0,8µM (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'); enzima *50x Advantage cDNA polymerase mix*; e o produto de PCR diluído na proporção 1:10. O programa usado foi: 13 ciclos de 94°C por 10 s, 68°C por 30 s e 72°C por 1,5 min. A análise do produto da *Nested* PCR foi feita através de eletroforese. Para essa amplificação também foram avaliados os cDNAs não subtraídos previamente diluídos.



**Figura 22:** Esquema das etapas envolvidas na construção das Bibliotecas Subtraídas. (A) Síntese de cDNAs, digestão com *RsaI* e ligação dos adaptadores; (B) 1ª hibridização; (C) 2ª hibridização; (D) 1ª amplificação dos transcritos; (E) 2ª amplificação dos transcritos.

## F – Clonagem, Amplificação e Sequenciamento dos clones

Os fragmentos resultantes da *Nested* PCR foram clonados no *pGEM-T Easy Vector* (Promega), específico para clonagens provenientes de amplificações por PCR. Para a reação de ligação foram utilizados: *Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase 1X*; 50ng de *pGEM-T Easy Vector System* (Promega); 25ng de produto de *Nested* PCR; 3U de *T4 DNA ligase 3U/μL*. A reação de ligação foi então incubada *overnight* a 4°C.

A transformação de bactérias foi feita por eletroporação com a utilização de cubetas 0,1 centímetros e eletroporador MicroPulser (Bio-Rad Laboratories), ajustado para 1800 V, 25 milifarad de capacitância e 200 ohms de resistência. Às bactérias *Escherichia coli* DH10β competentes (50μL) foram adicionados 2μL da reação de ligação, incubando em banho de gelo por 2 min. Foi então realizada a eletroporação seguida de incubação em meio SOC (20g de triptona, 5g de extrato de levedura, 0,5g de NaCl/L, KCl 2,5mM, pH 7,0 por mL de meio) sem ampicilina, sob agitação constante de 500 rpm, por 1 hora e temperatura de 37°C. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina 150μg/mL, IPTG e X-Gal, incubando a 37°C *overnight* na estufa.

As colônias com o inserto (brancas) foram inoculadas em placas de fundo U contendo, por poço, 120μL de meio LB com ampicilina (150μg/mL). Essas placas foram incubadas por um período mínimo de 12 hs a 37°C sob agitação constante de 120 rpm. A seguir, 2μL desta cultura foram usados como molde da PCR: tampão de enzima 1X; MgCl<sub>2</sub> 1,66mM; dNTPs 1,25mM; *Primer M13 Sense* 0,12μM; *Primer M13 Antisense* 0,12M; 1U de enzima *Taq DNA Polimerase* 5U/μL (Invitrogen), em volume final de 15μL. A programação utilizada foi: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de amplificação através de 35 ciclos de 94°C por 20 s, 57°C por 15 s e 72°C por 1 min. Para a verificação da reação, as amplificações de diferentes tamanhos foram visualizadas em gel de agarose. Os fragmentos amplificados foram sequenciados no aparelho *Mega Bace 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics, Amersham, Life Science).

## **G – Análise das sequências geradas**

Um *pipeline* para submissão das sequências geradas foi criado pelo grupo de bioinformática do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UNICAMP ([www.lge.ibi.unicamp.br/reticulocito](http://www.lge.ibi.unicamp.br/reticulocito)). O LGE possui ampla experiência nesta área, tendo participação em projetos de bioinformática relacionados a diversos genomas. As sequências geradas através do sequenciamento automático foram submetidas à análise por este pipeline que faz a trimagem dos vetores e analisa a qualidade das sequências atribuindo notas de qualidade a cada nucleotídeo através do programa PHRED (Ewing & Green, 1998). As sequências formadas por pelo menos, 200 pb com nota PHRED acima ou igual a 20 foram consideradas como de boa qualidade. Esses dados foram, então, filtrados, removendo elementos tais como sequências ribossomais e vetoriais e as caudas poly(A) ou poly(T). Cada sequência (read) foi alinhada contra o banco de dados de nucleotídeos Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>), através do programa BLASTn usando um valor de corte de similaridade (E-value) menor que  $1e-10$ . Os genes que obtiveram sequências alinhadas foram identificados e anotados e os que não tiveram similaridade foram denominados “no hits”. Os agrupamentos de genes foram formados de acordo com a identificação dada por esta comparação. Assim, as sequências que apresentaram o mesmo número de Unigene foram agrupadas conjuntamente. Estas sequências ficam depositadas no endereço [www.lge.ibi.unicamp.br/reticulocito](http://www.lge.ibi.unicamp.br/reticulocito) na área de análise de Bibliotecas Subtrativas/PHHF cujo acesso é limitado por senha.

## **H – PCR em Tempo Real**

A validação dos resultados obtidos nas Bibliotecas Subtrativas foi realizada pelo método de PCR em Tempo Real, utilizando como molde da reação as mesmas amostras de cDNAs, sintetizadas a partir do *pool* de RNAs, usadas para a construção dessas Bibliotecas e os genes *AHSP*, *FAM46C*, *FOXO3a*, *globina  $\gamma$* , *HOOK3*, *MKRN1*, *MIER1*, *PI4K2A*, *PPM1A* e *TCEA1*. Os *primers* referentes a todos esses genes foram padronizados.

**Tabela IX:** Sequência de cada par de *primers* e concentração ótima utilizada para a amplificação de alguns genes diferencialmente expressos encontrados nas Bibliotecas Subtrativas.

Gene	Primers	Concentração Ótima
<i>AHSP – Sense</i>	5'- GTGGGTGAGACATATACAGCCTGTTA -3'	150 nM
<i>AHSP – Antisense</i>	5'- TCCTGCGGAAATGAGATCCTTA -3'	
<i>FAM46C – Sense</i>	5'- CCAGAGGGTGTGAACAAGCTC -3'	150 nM
<i>FAM46C – Antisense</i>	5'- TCCGTGCAAACCTTCACTAGC -3'	
<i>FOXO3a – Sense</i>	5'- TCAAGGATAAGGGCGACAGC -3'	300 nM
<i>FOXO3a – Antisense</i>	5'- GGACCCGCATGAATCGACTAT -3'	
<i>Globina <math>\gamma</math> – Sense</i>	5'- TGTGGAAGATGCTGGAGGAGA -3'	150 nM
<i>Globina <math>\gamma</math> – Antisense</i>	5'- CAAAGAACCTCTGGGTCCATG -3'	
<i>HOOK3 – Sense</i>	5'- GAAGCAAATGGAAGAACGATACAA -3'	150 nM
<i>HOOK3 – Antisense</i>	5'- TCGGTCTCGTTTCTGGAGCT -3'	
<i>MKRN1 – Sense</i>	5'- TCCACGGAGATTCTTGTGACAT -3'	150 nM
<i>MKRN1 – Antisense</i>	5'- ATGGGCCTCAATGCACGA -3'	
<i>MIER1 – Sense</i>	5'- TCAGGGTCCCACAGGAGC -3'	150 nM
<i>MIER1 – Antisense</i>	5'- GGGCTCCATGTTTCAAGCA -3'	
<i>PI4K2A – Sense</i>	5'- CCACCGTTTGTCTGTGTATAGGGA -3'	150 nM
<i>PI4K2A – Antisense</i>	5'- TTCAGAGTTGGCAGTTCTTTGG -3'	
<i>PPM1A – Sense</i>	5'- GCAATGAAGTAGTCGACACCTGTT -3'	150 nM
<i>PPM1A – Antisense</i>	5'- GATACTTTGGGTGCATTTGGAA -3'	
<i>TCEA1 – Sense</i>	5'- GAAAAATGTCTCTGTGGGAATAT -3'	150 nM
<i>TCEA1 – Antisense</i>	5'- TCTCTTTCAGCTCATCACTAGCC -3'	

### 2.3 – Genes Diferencialmente Expressos e sua respectivas Proteínas

A análise da expressão dos genes *AHSP*, *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1*, *MIER1*, e *PPM1A* foi realizada através de PCR em Tempo Real, utilizando como molde da reação amostras de cDNAs, sintetizadas de RNA de reticulócitos isolados do sangue periférico, de 11 indivíduos controles e de 11 portadores de ndPHHF-B.

As proteínas *Foxo3a*, *Hook3*, *Mkrn1*, *Mier1*, e *Ppm1a* foram selecionadas para análise de sua expressão. Ao extrato protéico de reticulócitos foi adicionado tampão *Laemmli* contendo DTT 100mmol/L, fervendo por 4 min. As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de

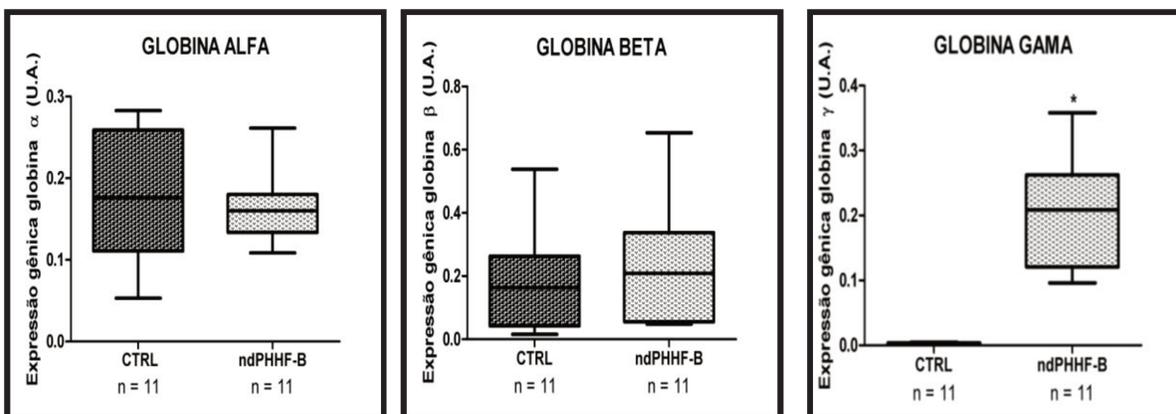
poliacrilamida 10% SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Bio-Rad). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi feita a 120 V por 90 min em aparelho de transferência (Bio-Rad). A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 h com tampão de bloqueio (5% de leite em pó magro em solução basal contendo Tris 10mmol/L, NaCl 150mmol/L e Tween-20 0,02%). A membrana foi incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0,3% de leite em pó magro em solução basal) por 12 hs a 4°C e, então, lavadas 3 vezes com solução basal. Os anticorpos primários usados foram obtidos da Santa Cruz: anti-FOXO3a (sc-11351), anti-HOOK3 (sc-49981), anti-MKRN1 (sc-133771), anti-MIER1 (sc-131601), e anti-PPM1A (sc-32402). O sistema de revelação foi baseado em ensaio de quimioluminescência usando *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific). As membranas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário (conjugado à HRP), lavadas, submetidas ao substrato da enzima e detectado por auto-radiografias em filme Kodak XAR (Eastman Kodak).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 – Análise da expressão gênica evidencia o aumento na expressão do gene das globinas $\gamma$ em reticulócitos de portadores de ndPHHF-B

A análise da expressão dos genes das globinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  foi realizada, através de PCR em Tempo Real, em cDNAs, sintetizados de RNA total extraído de reticulócitos isolados do sangue periférico, de 11 portadores de ndPHHF-B e de 11 indivíduos controles.

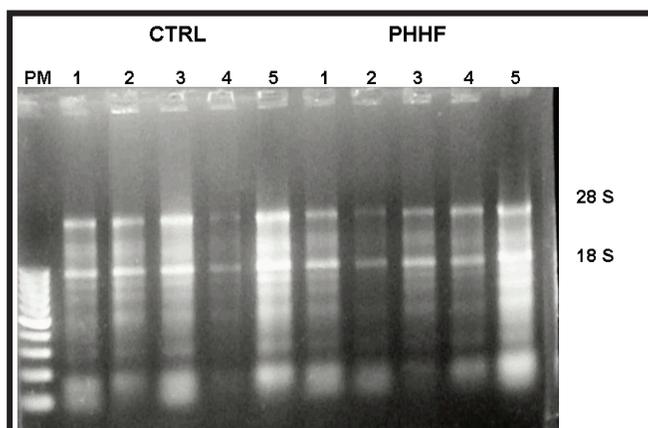
A expressão dos genes das globinas  $\alpha$  e  $\beta$  não apresentaram diferença significativa nos reticulócitos dos dois grupos em análise. Como esperado, o gene da globina  $\gamma$  apresentou expressão significativamente aumentada nos portadores de ndPHHF-B (figura 23).



**Figura 23:** Expressão dos genes das globinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  em RNA de reticulócitos de indivíduos controles ( $n = 11$ ) e de portadores de ndPHHF-B ( $n = 11$ ). A expressão de cada gene foi normalizada usando a média geométrica dos genes  $\beta$ -actina e GAPDH. Os valores são representados por média  $\pm$  desvio padrão (unidades arbitrárias, U.A.). O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (Teste de Mann-Whitney).

### 3.2 – Análise diferencial aponta uma série de genes diferencialmente expressos entre controles e portadores de ndPHHF-B

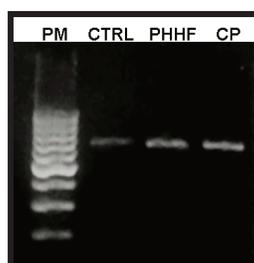
Duas Bibliotecas Subtrativas foram construídas com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos em portadores de ndPHHF-B. A qualidade de alguns dos RNAs extraídos pode ser observada na figura 24.



**Figura 24:** Qualidade dos RNAs. Os RNAs de reticulócitos de indivíduos controles (CTRL) e de portadores de ndPHHF-B (PHHF) foram extraídos. As amostras foram visualizadas em gel desnaturante, observando as subunidades 28S e 18S. PM – peso molecular (100pb).

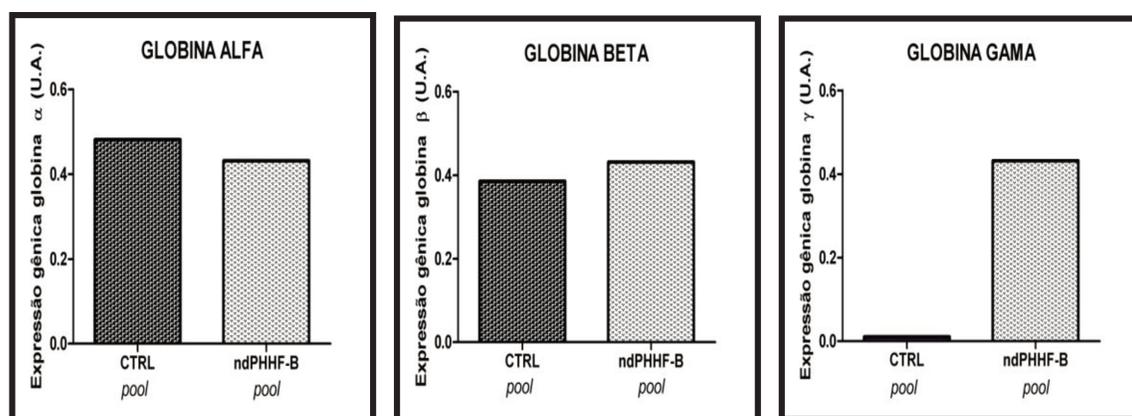
## A – Síntese e amplificação de cDNAs

Os RNAs foram tratados com *DNaseI*, para remoção de moléculas dupla fita. Os cDNAs foram sintetizados a partir de *pools* de RNAs: um com RNAs de 5 controles e outro com RNAs de 5 portadores de ndPHHF-B. A amplificação do gene *β-actina* nas amostras de cDNAs sintetizados está ilustrada na figura 25.



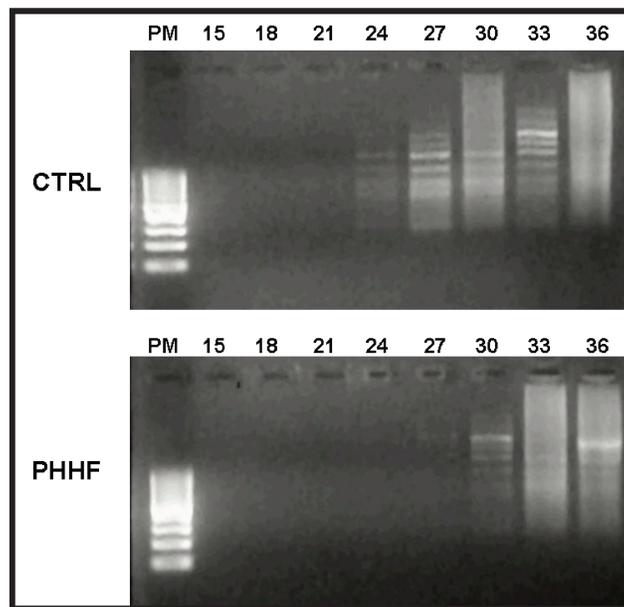
**Figura 25:** *Análise da Síntese de cDNAs.* Amplificação do gene *β-actina* nas amostras de cDNAs referentes aos indivíduos controles (CTRL) e aos portadores de ndPHHF-B (PHHF). PM – peso molecular (100pb); CP – produto de PCR do cDNA referente a uma amostra controle.

Antes da construção das Bibliotecas, a expressão dos genes das globinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  foi analisada através de PCR em Tempo Real. A expressão do gene da globina  $\gamma$  está aumentada na amostra de cDNA do *pool* de RNAs dos portadores de ndPHHF-B (figura 26).



**Figura 26:** *Expressão dos genes das globinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  nas amostras de cDNAs do pool de RNA extraído de reticulócitos de indivíduos controles (CTRL) e do de portadores de ndPHHF-B.* A expressão dos genes foi normalizada usando a média geométrica dos genes *β-actina* e *GAPDH*.

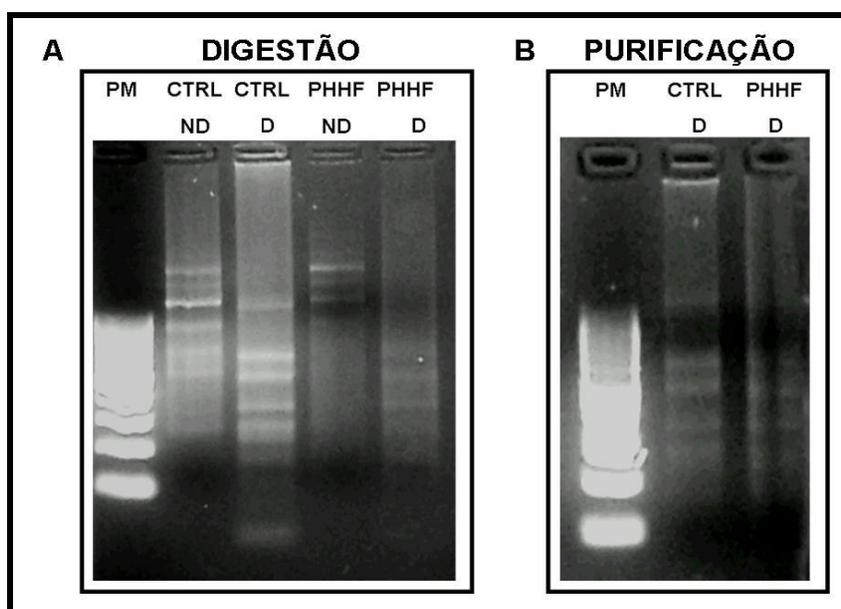
Para as etapas seguintes, foi realizada a padronização do número de ciclos para assegurar que o cDNA permaneceria em sua fase exponencial de amplificação. Um aumento no número de ciclos resulta em uma amostra pobre para a subtração, visto que na fase de platô o número de cópias dos genes se equivale. Um número muito reduzido de ciclos leva a uma baixa concentração do produto da PCR. O ciclo ótimo foi estabelecido como sendo 1 ciclo antes de atingir o platô. Para isso, foram retiradas alíquotas, a cada 3 ciclos, a partir do ciclo 15 de amplificação. A análise do padrão mostrou que com o aumento do número de ciclos, ocorreu um aumento na intensidade das bandas até que esta intensidade permaneceu constante, mostrando que a amplificação chegou à sua fase de platô. A fase estável da amplificação foi atingida após 30 ciclos para a amostra CTRL e após 33 ciclos para a amostra ndPHHF-B. Assim, o ciclo 29 e o ciclo 32 foram selecionados como sendo o ciclo ótimo da LD PCR para as amostras CTRL e ndPHHF-B, respectivamente (figura 27).



**Figura 27:** Padronização do número ótimo de ciclos da LD PCR. Os ciclos 29 e 32 foram selecionados como ciclo ótimo para as populações CTRL e ndPHHF-B, respectivamente (1 ciclo antes de atingir o platô – ciclos 30 e 33). PM – peso molecular 100pb; CTRL – amplificação da amostra referente ao cDNA do *pool* de RNAs dos indivíduos controles; PHHF – amplificação da amostra referente ao cDNA do *pool* de RNAs dos portadores de ndPHHF-B.

## B – Digestão com *Rsal*

As amostras de cDNAs amplificadas e purificadas, foram digeridas com a enzima de restrição *Rsal*, a fim de gerar fragmentos de menor tamanho. A confirmação da digestão foi realizada através de uma eletroforese em gel de agarose (figura 28A) usando cDNA não digerido e cDNA digerido com a enzima *Rsal*. Anteriormente à digestão, os cDNAs apresentam tamanho entre 0,5 e 10 kb, correspondentes aos mRNAs abundantes. Após a digestão, os transcritos têm tamanho menor, variando entre 0,1 e 2 kb. O perfil observado após a purificação dos cDNAs digeridos está apresentado na figura 28B.



**Figura 28:** Verificação da digestão dos cDNAs com *Rsal* e da purificação. **(A)** cDNA digerido com *Rsal*. **(B)** cDNA digerido com *Rsal* após purificação. PM – peso molecular (100 pb); CTRL D – cDNA controle digerido; CTRL ND – cDNA controle não digerido; PHHF D – cDNA ndPHHF-B digerido; PHHF ND – cDNA ndPHHF-B não digerido.

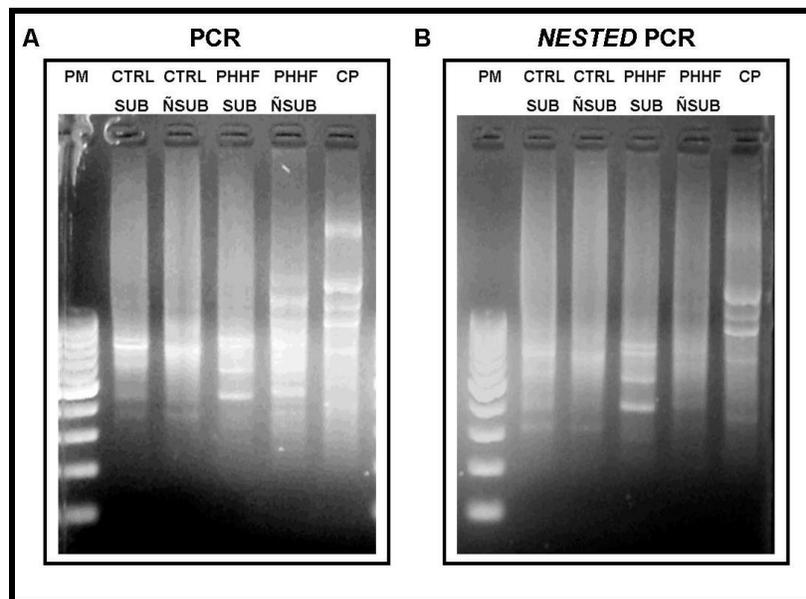
## C – Hibridizações

Os fragmentos digeridos e purificados foram ligados aos adaptadores 1 ou ao adaptador 2R. Na primeira hibridização, um excesso de cDNA *driver* foi adicionado a cada alíquota de cDNA *tester* e as amostras foram desnaturadas e aneladas. Nesta etapa, ocorre a primeira subtração onde sequências complementares presentes em ambas as amostras se anelam e não

podem ser amplificadas, uma vez que a sequência *driver* não está ligada aos adaptadores. Na segunda hibridização, ocorre a supressão dos transcritos muito expressos e o enriquecimento dos transcritos menos abundantes.

#### D – Amplificação dos Transcritos

Os transcritos subtraídos foram selecionados através de amplificação por PCR. Nestas etapas apenas os fragmentos ligados aos adaptadores em ambas às extremidades são amplificados. Com isso, ocorre uma diminuição no “rastros” e na intensidade das bandas observadas no gel, indicando que os transcritos presentes em ambas às amostras foram subtraídos, remanescendo apenas os transcritos diferenciais (figura 29A). Após a verificação da amplificação das amostras subtraídas, foi realizada a *Nested* PCR, uma vez que essa reação aumenta a concentração dos transcritos diferenciais (figura 29B).



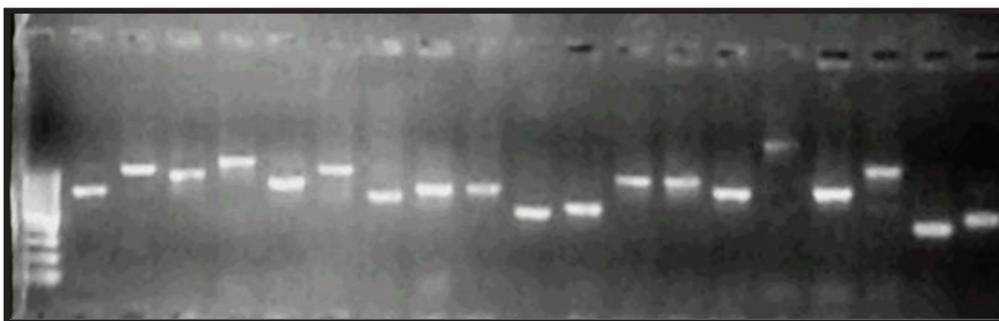
**Figura 29:** 1ª (PCR) e 2ª (Nested PCR) Amplificações do cDNA subtraído. (A) Produto da PCR dos cDNA usados na construção das SSHs. (B) Produto da *Nested* PCR dos cDNA usados na construção das SSHs. PM – peso molecular de 100pb; CTRL SUB – cDNA controle pós-subtração; CTRL ÑSUB – cDNA controle não subtraído; PHHF SUB – cDNA ndPHHF-B pós-subtração; PHHF ÑSUB – cDNA ndPHHF-B não subtraído; CP – controle positivo não subtraído.

## E – Clonagem, Amplificação e Sequenciamento

As amostras resultantes da *Nested PCR* foram clonadas em vetor *pGEM-T*. A reação de ligação dos produtos da *Nested PCR* ao plasmídeo *pGEM-T* foi realizada, seguida da transformação das bactérias através de eletroporação. As bactérias foram então plaqueadas em placas contendo meio LB / ampicilina / IPTG / X-Gal.

Para identificar as colônias com ou sem o inserto, foi usado um análogo sintético e não degradável da lactose, o isopropil- $\beta$ -D-tio-galactosídeo (IPTG), que se associa ao repressor do gene *lacZ* (enzima  $\beta$ -galactosidase), inibindo-o e possibilitando que haja transcrição. A enzima  $\beta$ -galactosidase tem sua expressão induzida por IPTG, catalisando a conversão do substrato cromogênico X-Gal num precipitado de coloração azul. As colônias de bactérias que foram transformadas com plasmídeos sem o inserto apresentam o gene *lacZ* intacto e, na presença de IPTG e X-Gal, possuem coloração azul. Como o sítio de clonagem do *pGEM-T* interrompe o gene *lacZ*, as colônias de coloração branca correspondem às colônias contendo o plasmídeo com inserto, pois não expressam a enzima  $\beta$ -galactosidase.

As colônias positivas para inserto (coloração branca) foram selecionadas e inoculadas. A partir do inóculo, foram realizadas PCRs contendo iniciadores M13, presentes no sítio de clonagem do plasmídeo. Na figura 30 está ilustrada a amplificação por PCR de alguns inóculos positivos para o inserto, podendo ser observados fragmentos com diferentes tamanhos.



**Figura 30:** Amplificação por PCR de alguns inóculos positivos para o inserto. Os fragmentos obtidos após a construção das Bibliotecas Subtrativas foram clonados e amplificados.

Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados.

## F – Análise das sequências geradas nas Bibliotecas Subtrativas

Foram geradas e analisadas 1618 e 1091 sequências nas SSHs controle e ndPHHF-B, respectivamente. Após a remoção de sequências de baixa qualidade, vetoriais e ribossomais, foram selecionadas 813 e 622 sequências referentes às SSHs controle e ndPHHF-B, respectivamente. Uma nova seleção, através do banco de dados *Unigene*, foi realizada e restaram, respectivamente, 165 e 119 sequências. Dentre essas, 55 e 57 genes foram identificados na SSH controle e na SSH ndPHHF-B, respectivamente. Alguns desses genes diferencialmente expressos encontrados estão descritos na tabela X. A tabela completa pode ser acessada no site [www.lge.ibi.unicamp.br/reticulócito](http://www.lge.ibi.unicamp.br/reticulócito), mediante solicitação de senha pessoal.

**Tabela X:** Identificação de alguns genes encontrados nas SSHs. Os *reads* totais se referem ao número de vezes que o gene foi identificado, sendo descrito o número de vezes encontrado em cada uma das bibliotecas (*reads* CTRL ou *reads* PHHF).

Grupo	mRNA	Reads Totais	Reads CTRL	Reads ndPHHF-B
214	<u>Hs.130036</u> Protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform	40	0	40
211	<u>Hs.356216</u> Family with sequence similarity 46, member C	21	20	1
209	<u>Hs.712539</u> Hemoglobin, gamma A	20	0	20
208	<u>Hs.162852</u> Hook homolog 3 (Drosophila)	18	18	0
205	<u>Hs.220950</u> Forkhead box O3	13	0	13
204	<u>Hs.57079</u> Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha	12	12	0
201	<u>Hs.490347</u> Makorin ring finger protein 1	11	0	11
192	<u>Hs.104624</u> Aquaporin 9	7	7	0

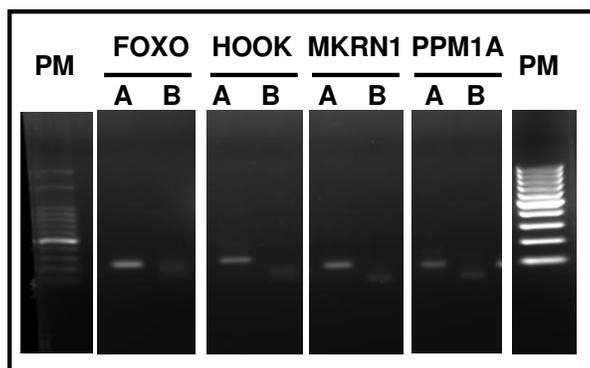
178	<u>Hs.700599</u> <u>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1</u>	<u>5</u>	5	0
169	<u>Hs.652983</u> <u>Mesoderm induction early response 1 homolog</u> ( <i>Xenopus laevis</i> )	<u>4</u>	4	0
124	<u>Hs.274309</u> <u>Erythroid associated factor</u>	<u>2</u>	0	2
67	<u>Hs.491745</u> <u>Transcription elongation factor A (SII), 1</u>	<u>1</u>	0	1

### G – Validação da Biblioteca Subtrativa

Os resultados obtidos através das Bibliotecas Subtrativas foram validados através da análise da expressão de alguns genes. Selecionamos para essa validação os genes *AHSP*, *FAM46C*, *FOXO3a*, *globina  $\gamma$* , *HOOK3*, *MKRN1*, *MIER1*, *PI4K2A*, *PPM1A* e *TCEA1* por apresentarem grande diferença de expressão entre as duas bibliotecas ou por estarem relacionados com a expressão dos genes das globinas.

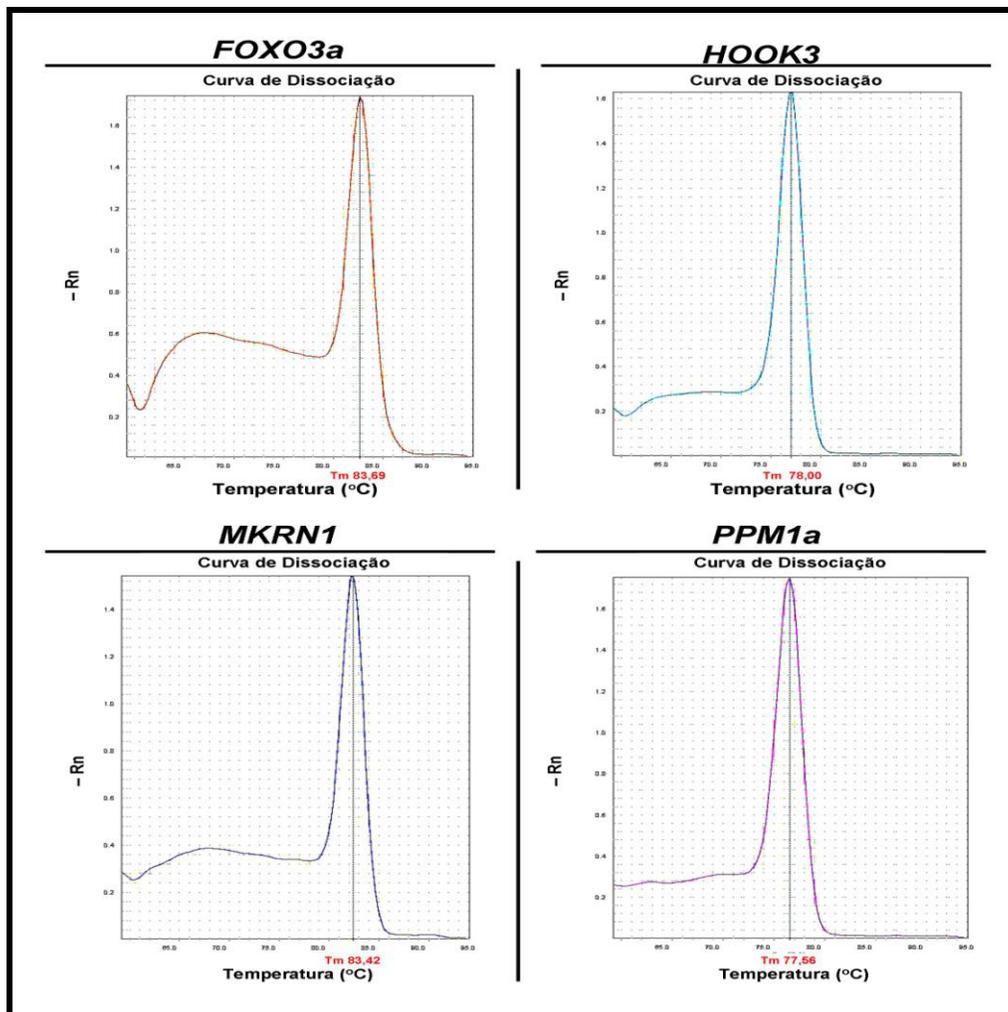
#### G.1 – Padronização dos *primers* de *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1*, e *PPM1A*

Os *primers* referentes aos genes *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1*, e *PPM1A* foram desenhados a partir do programa *Primer Express*, através do qual o tamanho e a temperatura de desnaturação foram estipuladas para o produto amplificado. A especificidade dos *primers* sintetizados foi verificada por PCR, observando o tamanho específico do produto (figura 31).



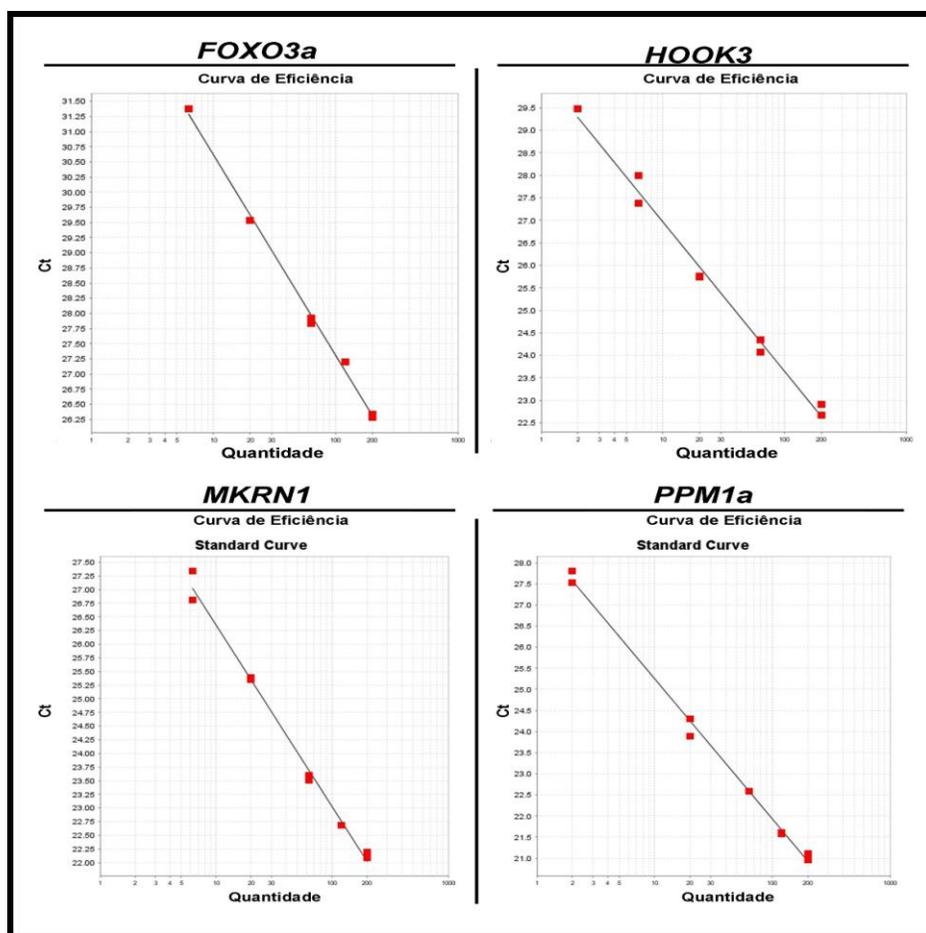
**Figura 31:** Amplificação por PCR dos genes *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1* e *PPM1A*. Visualização do produto amplificado dos genes *FOXO3a*, *HOOK*, *MKRN1* e *PPM1A* usando os *primers* desenhados. PM – peso molecular (100 pb e 50 pb); A – amostra de cDNA controle; B – branco.

A verificação da especificidade foi realizada através da análise da curva de dissociação (fluorescência *versus* temperatura) do produto amplificado de cada gene, gerada pelo programa *StepOnePlus* (Applied Biosystems) (figura 32).



**Figura 32:** Temperatura de dissociação dos primers *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1* e *PPM1A*. Curva de dissociação do produto amplificado dos genes *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1* e *PPM1A*, gerada pelo programa *StepOnePlus*, cuja desnaturação ocorre nas temperaturas de 83,69°C, 78,00°C, 83,42°C e 77,56°C, respectivamente.

As reações para a determinação da concentração ótima de *primer* a ser utilizada e da eficiência de reação foram então realizadas. As curvas de eficiência para cada gene podem ser observadas na figura 33.



**Figura 33:** Eficiência de amplificação dos primers *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1* e *PPM1A*. Curva de eficiência de cada gene em análise.

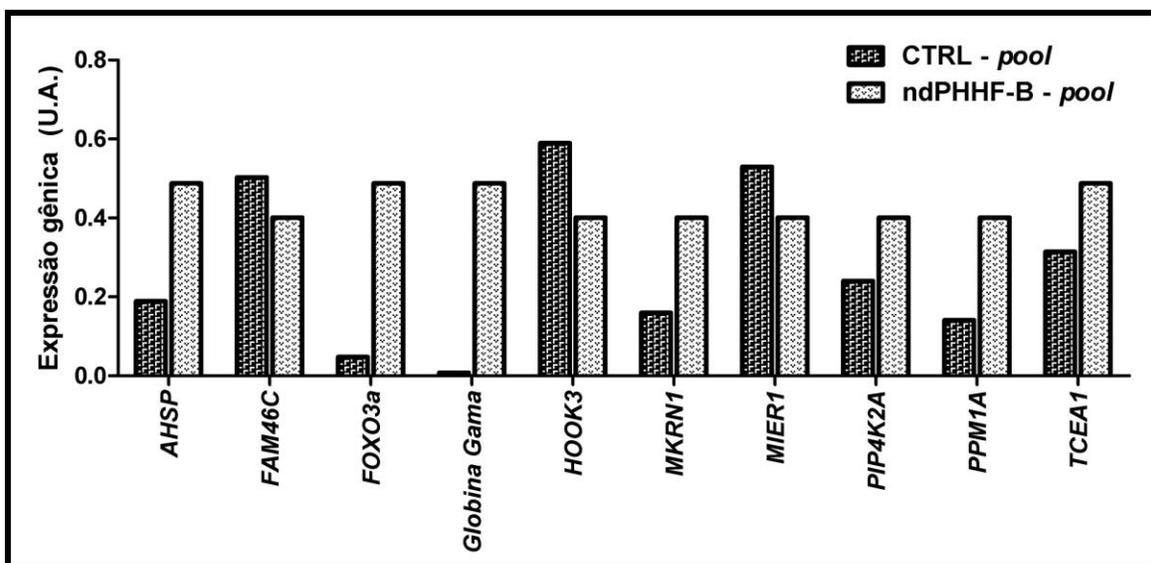
**Tabela XI:** Sequência, temperatura de desnaturação, tamanho dos fragmentos amplificados, concentração ótima e eficiência de cada par de *primers* desenhado.

Gene	Produto Amplificado		Concentração Ótima	Eficiência
	Temperatura de Desnaturação	Tamanho		
<i>FOXO3a</i>	83,69°C	90 pb	300 nM	100,0%
<i>HOOK3</i>	78,00°C	136 pb	150 nM	99,5%
<i>MKRN1</i>	83,42°C	98 pb	150 nM	99,3%
<i>PPM1A</i>	77,56°C	90 pb	150 nM	99,5%

## G.2 – Validação dos resultados das Bibliotecas Subtrativas

Foram avaliados 10 genes por PCR em Tempo Real, cuja expressão foi comparada com a expressão encontrada nas SSHs. A análise dos dados mostrou que 9 dos 10 genes analisados apresentaram concordância no perfil de expressão entre as duas técnicas, validando os resultados. A expressão normalizada de cada gene selecionado para a validação, em cada uma das populações estudadas, está representada na figura 34.

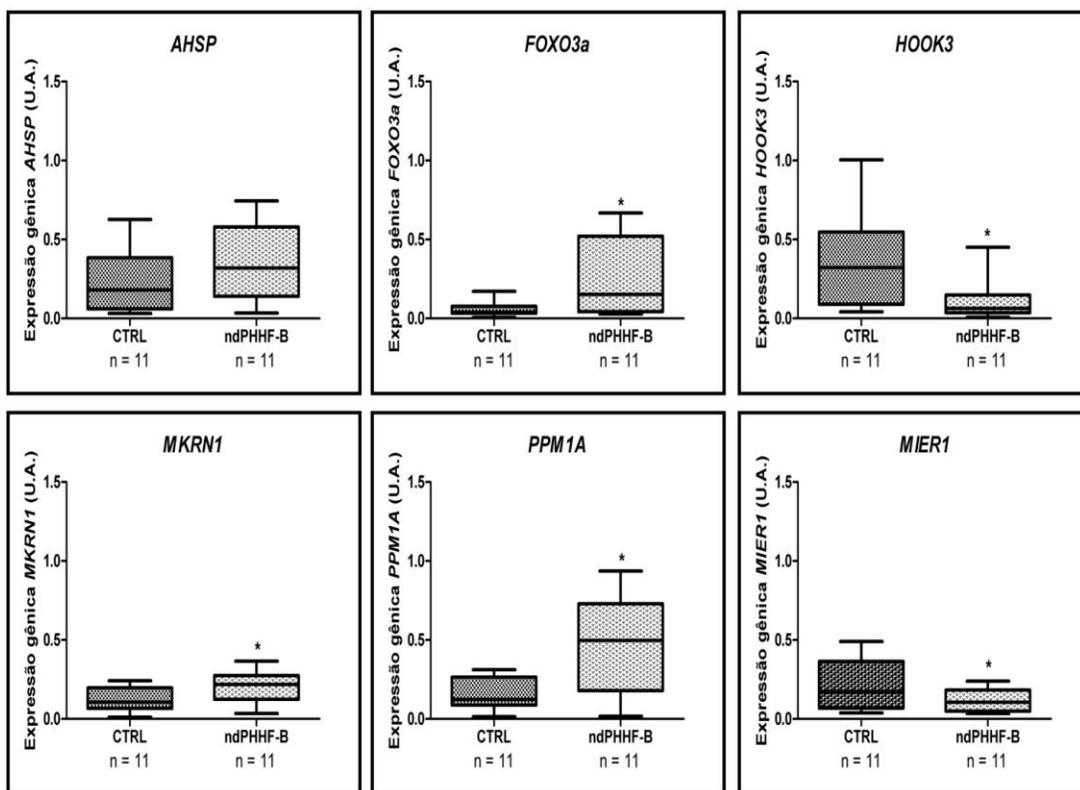
Os resultados da validação das Bibliotecas mostraram que os genes *AHSP*, *FOXO3a*, *MKRN1*, *PIP4K2A*, *PPM1A* e *TCEA1* apresentaram maior expressão na amostra referente aos portadores de ndPHHF-B em relação aos indivíduos controles. Em contrapartida, os genes *FAM46C*, *HOOK3* e *MIER1* apresentaram maior expressão na amostra dos indivíduos controles comparado a dos portadores de ndPHHF-B. Apenas o gene *PIP4K2A* apresentou expressão discordante em ambas as técnicas.



**Figura 34:** Validação dos resultados das Bibliotecas Subtrativas por PCR em Tempo Real. A expressão de cada um dos genes *AHSP*, *FAM46C*, *FOXO3a*, *Globina  $\gamma$* , *HOOK3*, *MKRN1*, *MIER1*, *PIP4K2A*, *PPM1A* e *TCEA1* foi analisada e normalizada em relação à média geométrica dos genes  $\beta$ -actina e *GAPDH*, através do programa *geNorm*. Os valores, em unidades arbitrárias (U.A.), estão indicados no gráfico.

### 3.3 – Análise comparativa da expressão gênica evidencia uma hipoeexpressão dos genes *MIER1* e *HOOK3* e uma hiperexpressão dos genes *FOXO3a*, *MKRN1*, e *PPM1A* em reticulócitos de portadores de ndPHHF-B

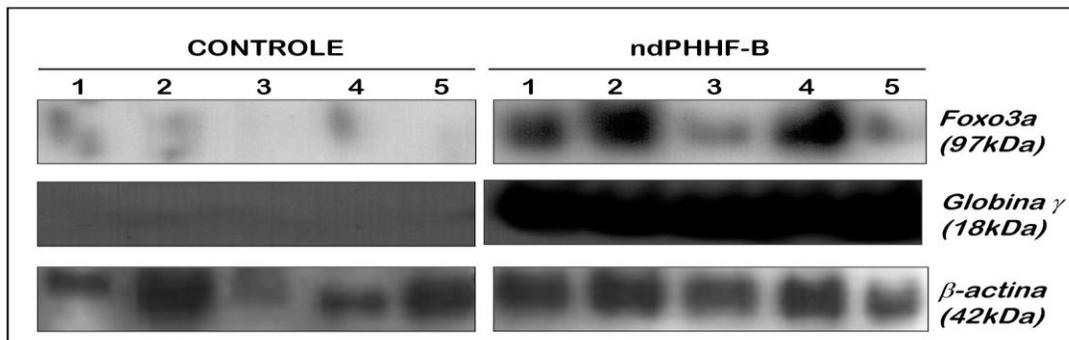
Com a finalidade de analisar individualmente a participação de alguns genes, identificados nas SSHs, na regulação dos genes das globinas e na manutenção dos níveis de HbF, foram escolhidos seis genes, *AHSP*, *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1*, *MIER1* e *PPM1A*, para avaliar suas expressões em amostras de cDNA, sintetizadas a partir de RNA extraídos de reticulócitos isolados do sangue periférico. A expressão dos genes selecionados, para os controles (CTRL; n=11) e para os portadores de ndPHHF-B (PHHF-B; n=11) está representada na figura 35. A expressão dos genes *FOXO3a*, *MKRN1* e *PPM1A* teve um aumento significativo nos portadores de ndPHHF-B em comparação com os indivíduos controles. Em contrapartida, a expressão dos genes *HOOK3* e *MIER1* foi significativamente menor nos portadores de ndPHHF-B em relação aos indivíduos controles. Nesses experimentos, a expressão do gene *AHSP* não apresentou diferença significativa entre controles e portadores de ndPHHF-B.



**Figura 35:** Análise da expressão dos genes *AHSP*, *FOXO3a*, *HOOK3*, *MKRN1*, *MIER1*, e *PPM1A* em reticulócitos de indivíduos controles (n=11) e de portadores de *ndPHHF-B* (n=11) por PCR em Tempo Real. A expressão de cada gene foi normalizada em relação à média geométrica dos genes *β-actina* e *GAPDH*, através do programa *geNorm*. Os valores são representados por média ± desvio padrão e estão indicados como unidades arbitrárias (U.A.). Foi considerado estatisticamente significativo o valor de  $p \leq 0,05$  (Teste de Mann-Whitney).

### 3.4 – Produção da proteína Foxo3a é aumentada em reticulócitos de ndPHHF-B

A expressão proteica de *Foxo3a*, *globina γ*, *Hook3*, *Mkrn1*, *Mier1* e *Ppm1a* foi analisada em extrato proteico total de reticulócitos isolados do sangue periférico. Os resultados de *Western Blotting* revelaram expressão de *Foxo3a* não fosforilado e de *globina γ* nas amostras dos portadores de *ndPHHF-B* (n=5) e ausência de expressão em amostras de controle (n=5) (figura 36). Embora os outros anticorpos também tenham sido padronizados usando extratos proteicos de diversas linhagens celulares, nos ensaios de *Western Blotting* em reticulócitos houve o aparecimento de *background*, que mesmo repetindo o experimento várias vezes, inviabilizou a análise da expressão dessas proteínas.



**Figura 36:** Expressão proteica de *Foxo3a* em reticulócitos analisada por *Western Blotting*. A expressão da proteína *Foxo3a* foi analisada em 30μg de extrato proteico de reticulócitos de indivíduos controle (n=5) e de portadores de *ndPHHF-B* (n=5). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-*FOXO3a* (97kDa) e anti-globina  $\gamma$  (18kDa). Como controle da quantidade proteica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada através de ensaio de quimioluminescência.

## VI. CAPÍTULO 3:

MUTAÇÃO -195 NO PROMOTOR

DO GENE DA GLOBINA  $\gamma^A$  EM

PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME



# 1. OBJETIVO

- ✓ Rastrear o promotor do gene da globina  $\gamma^A$  para a identificação da mutação -195 C→G em pacientes com anemia falciforme.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 – Pacientes com Anemia Falciforme

Para o estudo foram selecionados pacientes com anemia falciforme diagnosticados através de eletroforese de hemoglobina sob condições alcalinas e HPLC de hemoglobina, atendidos nos Hemocentros da UNICAMP (n=185), de Pernambuco – PE (HEMOPE) (n=200) e de Porto Alegre – RS (n=5) e na Fiocruz de Salvador – BA (n=15). Incluímos no estudo tanto pacientes em tratamento com hidroxiureia quanto sem o uso desse medicamento, independentemente do níveis de HbF que apresentavam.

### 2.2 – D-HPLC

#### A – Extração de DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de 4mL de sangue periférico coletado em tubos contendo EDTA como anticoagulante, e foi baseada no método de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) descrito por Davis (Davis *et al.*, 1986).

Inicialmente foi feita a lise de células vermelhas, adicionando tampão de lise ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M) ao sangue coletado e incubando a temperatura de 4°C por 30 min. O material foi centrifugado por 15 min a 2.500 rpm e temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e uma nova lise foi realizada nas mesmas condições. A seguir, foram adicionados 5mL de solução TKM1 (Tris-HCl pH 7,6 10mM, KCl 10mM,  $\text{MgCl}_2$  10mM, EDTA 20mM) e 1 gota de Triton-100X (Sigma Aldich), com posterior homogeneização e centrifugação por 10 min a 2.500 rpm e temperatura ambiente. O pellet foi transferido para um *ependorf* e ressuspenso em 400 $\mu\text{L}$  de solução TKM2 (Tris-HCl pH 7,6 10mM, KCl 10mM, NaCl 0,4M,  $\text{MgCl}_2$  10mM, EDTA

20mM) e 25µL de SDS 10%, incubando a 55°C por 1 h. Após esse período, um volume de 180µL de solução NaCl 5M foi adicionado, homogeneizando e incubando a temperatura ambiente por 15 min. Foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 5 min e temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorf* e foram adicionados 400µL de fenol saturado e 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente foi feita. Ao sobrenadante foram adicionados 800µL de clorofórmio:álcool isoamílico, centrifugando em seguida. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorf* e o DNA foi precipitado com etanol absoluto, através de centrifugação (14000rpm, 5 min). O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado (14.000 rpm, 5 min) e ressuspenso em água.

### **B – Amplificação do gene da globina $\gamma^A$**

Para garantir a amplificação apenas do gene da globina  $\gamma^A$ , um par de *primers* foi desenhado numa região não homóloga ao gene da globina  $\gamma^G$ . A PCR foi realizada utilizando Tampão de enzima 1x,  $MgCl_2$  2mM, dNTP 200µM, *primer* globina  $\gamma^A$  *Sense* 0,20µM (5'-CTCTATGATGGGAGAAGGAACTAG-3'); *primer* globina  $\gamma^A$  *Antisense* 0,20µM (5'-AACTGCTGAAGGGTGCTTCC-3'); 1U de enzima *Taq DNA polimerase* 5 U/µL; e 200ng de DNA. A programação usada foi: desnaturação inicial a 96°C por 2 min, seguida de amplificação de 35 ciclos de 96°C por 30 s, 60°C por 45 s e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. A análise do produto do PCR foi realizada em gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV.

### **C – Padronização da técnica de D-HPLC**

A padronização foi feita através do *software Wavemaker* do D-HPLC (Transgenomic WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System) avaliando a sequência do *amplicon* e diferentes temperaturas. As temperaturas usadas para a padronização foram 56,6°C, 59,2°C, 60,0°C e 61,4°C. A composição do tampão A foi TEAA 0,1M e do tampão B foi 55,9%, 52,1%, 52,3% ou 57,9% de acetonitrila para cada temperatura em análise, respectivamente. A padronização foi realizada usando controle negativo (produto da PCR da amplificação de um promotor do gene da

globina  $\gamma^A$  selvagem) e controle positivo (produto da PCR da amplificação de um promotor do gene da globina  $\gamma^A$  com a mutação -195). As amostras foram eluídas numa coluna *DNasep* (Transgenomic) com fluxo de 0,9mL/min, sob condições de desnaturação parcial.

#### **D – Análise de *D-HPLC***

O produto da PCR foi desnaturado a 95°C por 5 min, seguido de resfriamento gradual até atingir a temperatura ambiente para a formação dos homoduplex e heteroduplex. Os produtos da PCR foram analisados pelo aparelho de *D-HPLC*, na temperatura ótima de 59,2°C. A composição do tampão A foi TEAA 0,1M e do tampão B foi 52,1% de acetonitrila. Para cada corrida, foi usado um controle negativo (produto da PCR da amplificação de um promotor do gene da globina  $\gamma^A$  selvagem) e um controle positivo (uma mistura de igual volume dos produtos de PCR das amplificações de um promotor do gene da globina  $\gamma^A$  selvagem e de um com a mutação -195). O produto da PCR de cada amostra em análise foi misturado com igual volume do produto de PCR amplificação de um promotor do gene da globina  $\gamma^A$  com a mutação -195, a fim de evitar que mutações em homozigose não fossem identificadas pela ausência de heteroduplex. As amostras foram eluídas por uma coluna *DNasep* com fluxo de 0,9 mL/ min, sob condições de desnaturação parcial.

#### **E – Sequenciamento**

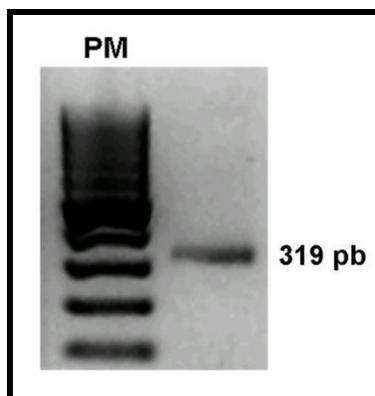
Para o sequenciamento, uma reação de PCR contendo *Dyemonic ET Terminator reagent premix* (GE Healthcare), *primer* globina  $\gamma^A$  Sense 5 $\mu$ M; produto da PCR foi realizada. As condições de reação utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de amplificação 35 ciclos de 94°C por 20 s, 57°C por 15 s e 60°C por 1 min. A purificação do produto de sequenciamento foi feita através da adição de acetato de amônio 7,5M e etanol absoluto. Após homogeneização e incubação a 4°C por 20 min, em ambiente escuro, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 40 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e uma centrifugação a 4.000 rpm por 20 min e 4°C foi feita. Para a completa remoção de etanol, as amostras foram submetidas à centrifugação

invertida (200 rpm, 8 s, 4°C) e incubadas a 65°C por 15 min. O produto da purificação foi ressuspenso em tampão *Load MegaBace* sequenciado no *MegaBace 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics, Amersham, Life Science). O resultado foi analisado com auxílio do programa *Chromas* (Technelysium Pty Ltd).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 – Amplificação específica do promotor do gene da globina $\gamma^A$

A amplificação de 319pb, na região -5 a -324 do promotor do gene da globina  $\gamma^A$ , foi feita usando *primers* desenhados numa não homóloga ao gene da globina  $\gamma^G$ . o perfil das amostras amplificadas está ilustrado na figura 37 .

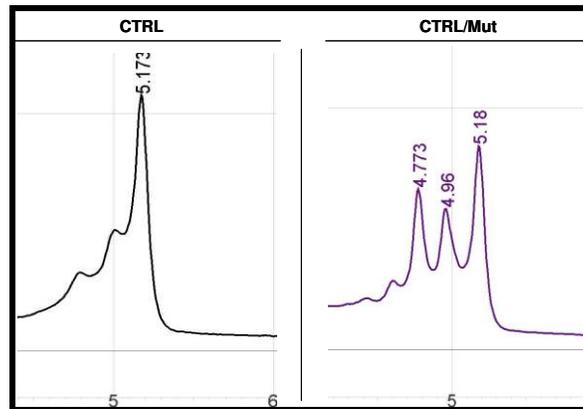


**Figura 37:** Amplificação de parte da região promotora do gene da globina  $\gamma^A$ . Verificação da amplificação, por PCR, de 319 pb usando *primers* específicos para a região promotora do gene da globina  $\gamma^A$ . PM – peso molecular (100 pb).

#### 3.2 – Padronização da técnica de *D-HPLC* em amostras controles e mutadas

A padronização foi feita para o fragmento amplificado, estabelecendo a temperatura ideal na qual esse fragmento deve ser analisado, com base na sua sequência e dependendo da quantidade de GC. Dentre as temperaturas usadas para a padronização, a temperatura de 59,2°C apresentou melhor perfil cromatográfico. Nessa temperatura, a composição do tampão A foi de TEAA 0,1M e do tampão B foi de 52,1% de acetonitrila.

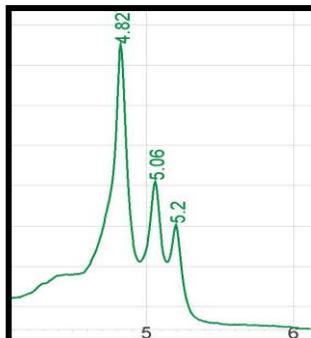
Nos cromatogramas abaixo estão representados os padrões observados na análise do *D-HPLC* para a amostra controle (CTRL), com genótipo -195C/C, e para o controle positivo (CTRL/Mut), mistura de volume iguais dos produtos das PCRs da amostra do indivíduo controle e da do portador heterozigoto da mutação -195 para possibilitar a formação de homoduplexes e heteroduplexes.



**Figura 38:** Padronização do ensaio de *D-HPLC*. **(A)** Cromatograma referente à amostra do indivíduo controle (CTRL), observando-se o fragmento homoduplex. **(B)** Cromatograma da amostra controle positivo (CTRL/Mut), onde se observa o fragmento heteroduplex (eluído primeiramente devido a menor força de ligação) e o fragmento homoduplex.

### 3 – Análise dos resultados do *D-HPLC* evidencia um perfil cromatográfico diferente

A região promotora do gene da globina  $\gamma^A$  foi amplificada e analisada em 36 controles e 405 pacientes com anemia falciforme. Dentre todos esses pacientes, não foi identificado nenhum com a mutação  $\gamma^A$  -195 C→G. Todavia, um perfil cromatográfico diferente do padrão foi observado em 3 pacientes do Hemocentro/UNICAMP e em 5 do HEMOPE (figura 39).





## VII. DISCUSSÃO



O aumento nos níveis de HbF concomitante a certas hemoglobinopatias, como a anemia falciforme e a beta-talassemia, amenizam a gravidade, diminuem a morbidade e a mortalidade, assim como conduzem a um melhor prognóstico dessas doenças (Wilber *et al.*, 2011, Steinberg, 2009; Forget, 1998). Na anemia falciforme, níveis aumentados de HbF diminuem a polimerização da hemoglobina S, reduzindo a frequência das crises de dor e dos episódios vaso-oclusivos (Cokic *et al.*, 2003; Sankaran *et al.*, 2010). O único tratamento farmacológico para a anemia falciforme, aprovado pela *Food and Drug Administration* (Estados Unidos), é a hidroxiureia, um inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, que aumenta os níveis de HbF. Todavia, quando administrado por longos períodos, esse fármaco pode provocar alguns efeitos colaterais, tais como toxicidade e supressão do crescimento celular. Além disso, a resposta individual a essa droga é variável (Atweh *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2011). O entendimento dos mecanismos envolvidos na reativação do gene da globina  $\gamma$  e no *switching* de hemoglobina, assim como a forma com que ocorre a interação entre os promotores dos genes das globinas e o *LCR* são importantes para o desenvolvimento de novos e mais eficientes tratamentos para essas hemoglobinopatias (Ma *et al.*, 2007, Stamatoyannopoulos & Grosveld, 2001; Bunn & Forget, 1986).

Assim, vários estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar essa complexa regulação dos gene das globinas. Em virtude de ser uma alteração hereditária caracterizada por aumentos nos níveis de HbF sem outros distúrbios hematológicos associados, as alterações nos mecanismos genéticos e moleculares em portadores de PHHF tem sido amplamente investigadas. Esses estudos visam identificar elementos gênicos associados à ativação ou à inativação dos genes das globinas e os mecanismos envolvidos na regulação do *switching* da HbF para a HbA (Bunn & Forget, 1986; Stamatoyannopoulos & Grosveld, 2001). O aumento nos níveis de HbF nesses indivíduos pode ser decorrente de deleções no grupamento da globina  $\beta$  (PHHF deletional) ou de mutações de ponto na região promotora dos genes das globinas  $\gamma$  (PHHF não deletional).

Existem várias mutações de ponto descritas tanto no promotor do gene da globina  $\gamma^A$  quanto da globina  $\gamma^G$ . Essa região promotora precede a região codificadora do gene e, dessa forma, não é transcrita. Todavia, possui uma função importante para a regulação gênica, visto que várias sequências *cis* de ligação para diversos fatores de transcrição estão localizadas nessa região. A interação entre os fatores de transcrição (ativadores ou repressores) e as sequências *cis* é um mecanismo importante utilizado pelas células no controle da maquinaria basal de transcrição. Assim, mutações nas sequências do promotor podem resultar em alterações na interação desses fatores com consequente modificação na transcrição do gene.

### **Análise da interação DNA-Proteína**

A região -110 a -230 do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  possui ao menos 15 domínios de ligação para fatores de transcrição. Mutações de ponto nessa região são capazes de alterar a ligação de alguns desses fatores, resultando na expressão continuada do gene da globina  $\gamma$ .

Identificada por Costa e colaboradores em 1990, a substituição -195 C→G no promotor do gene da globina  $\gamma^A$  leva à reativação desse gene com consequente aumento na produção de HbF, caracterizando a ndPHHF-B (Costa *et al.*, 1990). Takahashi e colaboradores demonstraram que a substituição -195 C→G (1) aumenta a força do promotor e (2) não altera a atividade da proteína Sp1, envolvida na persistência da expressão do gene da globina  $\gamma^A$ , na ndPHHF tipo Inglesa (Takahashi *et al.*, 2003). No estudo *in vivo* usando camundongo transgênico foi verificado que a simples presença da mutação -195 é suficiente para desenvolver o fenótipo de ndPHHF-B (Cunha *et al.*, 2009).

Há poucos relatos relacionados à frequência da PHHF, visto que estudos moleculares tem sido prioritários. Kimura e colaboradores encontraram uma prevalência de PHHF de 0,1% nos indivíduos atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP (Kimura *et al.*, 2000). Costa e colaboradores estimaram a incidência de 1 portador de PHHF a cada 1000 doadores de sangue no Hemonúcleo da Universidade São Francisco (Bragança Paulista, SP) (Costa *et al.*, 2002). Entre 2002 e 2011 foram identificados 69 portadores de PHHF num total de 178.161 indivíduos que doaram sangue no Hemocentro da UNICAMP, correspondendo a prevalência de 0,04%.

Não obstante, o mecanismo responsável pela expressão continuada do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF-B não está elucidado. A fim de entender esse mecanismo, realizamos uma busca por sítios de ligação para fatores de transcrição na região -165 a -205 do promotor desse gene, na presença ou na ausência da mutação -195, usando os programas de bioinformática *TRANSFAC*, *JASPAR* e *MatInspector*. Encontramos sequências *cis* referentes aos fatores de transcrição *MAZ*, *WT1*, *PAX1*, *MZF1* e *RREB*.

Iniciamos com a análise dos fatores *MAZ* e *WT1*. A proteína Maz está relacionada à repressão de alguns promotores, como o da neurotoxina derivada de eosinófilo (Wang *et al.*, 2007). Um fato importante é que os fatores de transcrição *MAZ* e *SP1* reconhecem os mesmos elementos *cis* nos promotores de diversos genes e regulam, independentemente, a expressão desses promotores (Song *et al.*, 2001). A opção de analisar a interação do fator *MAZ* foi baseada: (1) na existência de uma interação da proteína Sp1 na região -200 do promotor selvagem do gene da globina  $\gamma^A$ , (2) no fato que a mutação -198 leva a um aumento da afinidade dessa proteína com o promotor do gene da globina  $\gamma^A$  (Ronchi *et al.*, 1989; Sykes e Kaufman, 1990; Gumucio *et al.*, 1991) e (3) na comprovação de que a proteína Sp1 não é a responsável pela expressão continuada do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF-B (Takahashi *et al.*, 2003). O fator de transcrição *Wilms' Tumor 1 (WT1)* foi selecionado por ser expresso nas células hematopoéticas imaturas, como as células CD34<sup>+</sup> (Algar, 2002), e por desempenhar um papel importante na hematopoese.

A análise da interação dos fatores *MAZ* e *WT1* foi realizada através de ensaios de *Super Gel Shift*. Duas sondas (sequências de DNA) foram desenhadas: uma contendo a sequência selvagem do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  e outra com a substituição -195 C→G no promotor do gene da globina  $\gamma^A$  o que caracteriza a ndPHHF-B. Essas sondas, marcadas com biotina, foram hibridizadas a extratos nucleares de células eritroleucêmicas K562, capazes de transcrever os genes das globinas (Donovan-Pelusco *et al.*, 1984). A adição de anticorpos específicos para as proteínas traduzidas pelos genes que codificam esses fatores de transcrição permitiu a confirmação de sua participação na formação de um possível complexo DNA-proteína.

Os resultados mostraram que a ligação desses fatores de transcrição, *MAZ* ou *WT1*, às sondas foi semelhante na presença ou na ausência da mutação -195.

No experimento de *Gel Shift* é possível analisar a atividade de um único fator de transcrição por ensaio. Recentemente foi desenvolvida a técnica de *Array* DNA-proteína que permite a caracterização de diversos fatores de transcrição simultaneamente o que constitui uma vantagem significativa em relação aos ensaios de *Gel Shift* (Jiang *et al.*, 2003). Dessa forma, buscando identificar fatores de transcrição relacionados à expressão continuada do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF-B, optamos pela técnica de *Array* para análise simultânea de 345 fatores de transcrição diferentes.

No ensaio de *Array*, o extrato nuclear foi hibridizado a um *pool* de sondas de DNA biotinizadas, as quais possuem sequências correspondentes especificamente a diferentes fatores de transcrição. Os complexos DNA-proteína foram separados das sondas livres através de centrifugações, usando colunas com membranas de nitrocelulose, e lavagens sucessivas (Jiang *et al.*, 2006). O complexo DNA-proteína foi então hibridizado em uma membrana, a qual contém sequências *cis* não biotinizadas, similares às das sondas de DNA presentes no *pool*.

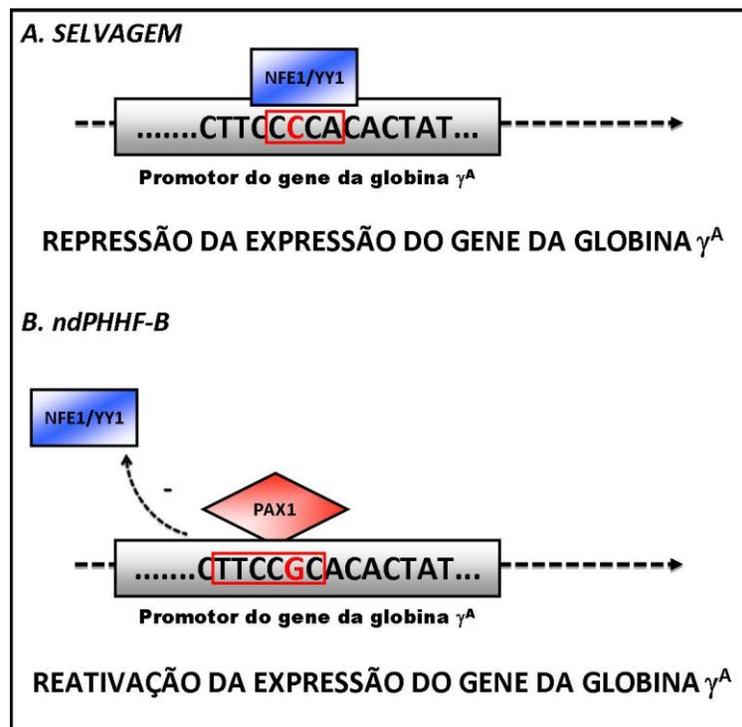
Para a realização dos ensaios de *Array* foi necessária a obtenção de extrato nuclear de células eritroides de indivíduos controles e de portadores de ndPHHF-B. Como as células eritroides nucleadas circulantes no sangue periférico são escassas, sua obtenção dependeria de da coleta de grande quantidade de sangue ou da realização de uma punção de medula óssea, procedimento invasivo e bastante doloroso. Assim, optamos pela realização de culturas de células eritroides a partir de células CD34<sup>+</sup> isoladas do sangue periférico de indivíduos controles e de portadores de ndPHHF-B.

Após a cultura de células eritroides, o extrato do 10º dia, cujo predomínio celular correspondia a eritroblastos basofílicos e policromáticos, foi utilizado para os ensaios de *Array* DNA-proteína. Nesta fase, a maquinaria transcricional está muito ativa, a população celular corresponde, predominantemente, a células nucleadas e existe diferença tanto na expressão do gene da globina  $\gamma$  quanto na produção de HbF entre as culturas dos controles e dos portadores de ndPHHF-B.

Alguns fatores de transcrição apresentaram diferença significativa na atividade de ligação em virtude da presença ou da ausência da mutação -195 C→G no promotor do gene da globina  $\gamma^A$ . A atividade dos fatores *NF-E1/YY1*, *KLF1*, *EGR-1* e *HINFP* estava diminuída enquanto que a dos *PAX1* e *E12* estava aumentada na cultura dos portadores de ndPHHF-B em comparação com as dos controles. Dentre esses fatores, os *NF-E1/YY1* e *PAX1* possuem sítio de ligação ao DNA localizado na região -195 desse promotor. Vale salientar que, conforme descrito anteriormente, o fator de transcrição *PAX1* havia sido identificado pelo nosso grupo através de análise de bioinformática, como um possível candidato na regulação deste gene. O *NF-E1/YY1* apresentou diminuição enquanto que o *PAX1* apresentou aumento na interação nas culturas dos portadores de ndPHHF-B em comparação à dos controles. Por isso, os resultados obtidos no *Array* DNA-proteína foram validados através de *EMSA* e ChIP para os fatores *NF-E1/YY1* e *PAX1*.

O fator de transcrição *NF-E1/YY1* é um repressor dos genes das globinas primitivas  $\epsilon$  e  $\gamma$  (Zhu *et al.*, 1999; Raich *et al.*, 1995). Os ensaios de *Array* Proteína-DNA e *EMSA* mostraram uma redução na interação do *NF-E1/YY1* com os extratos nucleares de células eritroides dos indivíduos portadores de ndPHHF-B e a análise do ChIP revelou menor recrutamento do *NF-E1/YY1* para a região promotora -195 do gene da globina  $\gamma^A$ . Esse fator possui um motivo *zinc finger* e tem como domínio central de ligação ao DNA a sequência CCAN, onde N pode corresponder a uma das bases nitrogenadas T ou G ou C (Li *et al.*, 1997). No promotor selvagem do gene da globina  $\gamma^A$ , esse domínio é observado entre os nucleotídeos localizados entre as posições -195 e -192. Todavia, a substituição C→G na posição -195, característica da ndPHHF-B, altera o sítio de ligação *NF-E1/YY1* ao DNA, causando diminuição na sua atividade de ligação e, possivelmente, permitindo a interação do *PAX1*, um ativador de transcrição. O fator *PAX1* possui como domínio de ligação ao DNA a sequência TTCCGC, que na presença da mutação -195 é observada entre os nucleotídeos -199 e -194. Os ensaios de *Array* Proteína-DNA e *EMSA* mostraram um aumento na interação do *PAX1* nos extratos nucleares de células eritroides dos portadores de ndPHHF-B e o ChIP revelou aumento do recrutamento do *PAX1* para a região promotora -195 do gene da globina  $\gamma^A$  na presença da mutação -195 C→G.

Os resultados sugerem que a substituição C→G na posição –195 do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  diminui a interação do *NFE1/YY1* e aumenta a do *PAX1* nessa região, levando à reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na fase adulta. Tal mecanismo difere do descrito na ndPHHF tipo Inglesa e constitui um novo meio de reativação do gene da globina  $\gamma^A$ , servindo de base para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas na indução de HbF no tratamento de outras hemoglobinopatias. Na figura 41 apresentamos o modelo proposto para a reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF-B.



**Figura 41:** Representação esquemática do mecanismo molecular proposto para a reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF tipo Brasileira. **(A)** No promotor selvagem do gene da globina  $\gamma^A$ , o fator de transcrição *NFE1/YY1* liga-se na sequência *cis* (CCAC) localizada entre as posições –195 e –192, reprimindo a expressão desse gene. **(B)** A presença da mutação de ponto C→G na posição –195 desse promotor, característica da ndPHHF-B, interrompe esse sítio de ligação ao DNA e cria um novo, TTCCGC, que é o domínio central de ligação do *PAX1*, permitindo a interação do *PAX1* com o promotor do gene da globina  $\gamma^A$ , reativando a expressão desse gene e aumentando a produção de HbF.

## Identificação de Genes Diferencialmente Expressos

O *switching* da HbF para HbA é influenciado por vários elementos *cis* que interagem com diferentes fatores de transcrição, resultando na expressão diferencial dos genes das globinas durante o desenvolvimento. O mecanismo primário corresponde a alterações na ligação de proteínas às sequências do DNA e essa interação é capaz de recrutar outras proteínas que causam modificações epigenéticas, resultando na ativação ou inativação dos genes das globinas. Alguns mecanismos epigenéticos regulatórios conhecidos são modificações das histonas, metilação de DNA e alteração na conformação de cromatina, a qual pode possibilitar a abertura da cromatina, permitindo a interação entre o DNA e os fatores de transcrição (Wilber *et al.*, 2011).

Três loci gênicos, localizados em diferentes cromossomos, já foram identificados como modificadores epigenéticos da expressão do gene da globina  $\gamma$ : o sítio *XmnI*, localizado na posição -158 do promotor do gene da globina  $\gamma^G$  (cromossomo 11), a região intergênica HAMP, localizada entre os genes *HBSL1* e *MYB* (cromossomo 6), e o gene *BCL11A* (cromossomo 2). Esses modificadores genéticos contribuem com 20% a 50% da variação nos níveis de HbF (Pace *et al.*, 2006; Thien & Menzel, 2009).

Outros modificadores epigenéticos já foram identificados e descritos na PHHF. Olave e colaboradores, usando extrato nuclear de células MEL, identificaram um complexo protéico, formado por *Dnmt1*, *Cdc5-like protein*, *Rap74*, *Snev* e *p52*, que se liga ao promotor do gene da globina  $\gamma$  apenas na presença da mutação -198 T→C, substituição característica da ndPHHF tipo Inglesa. Uma das proteínas que compõe esse complexo é a *Dnmt1*, responsável por copiar os padrões de metilação do DNA após a replicação desse DNA. Dessa forma, a proteína *Dnmt1* participa da manutenção de alterações epigenéticas no microambiente celular da ndPHHF tipo Inglesa e, possivelmente, está envolvida na manutenção de níveis elevados de HbF nesses indivíduos (Olave *et al.*, 2007).

Os efeitos biológicos dos modificadores epigenéticos nos níveis de HbF estão relacionados a dois mecanismos: (1) efeito direto na expressão do gene da globina  $\beta$ , ativando ou reprimindo esse gene, o que resulta no aumento ou na diminuição da quantidade de HbF por

célula; ou (2) alteração na cinética da diferenciação e da maturação eritroide, mimetizando a situação encontrada durante o estresse eritropoético, no qual a eritropoese acelerada leva à liberação de uma quantidade expressiva de progenitores eritroides, os quais sintetizam predominantemente HbF, com consequente aumento nos níveis circulantes de HbF (Blank, 2006; Stamatoyannopoulos, 2005).

Complementando o estudo, buscamos identificar genes com possível envolvimento no *switching* de hemoglobina e/ou na manutenção de níveis elevados de HbF nos portadores de ndHPFH-B. Para isso, usamos a técnica de Biblioteca Subtrativa Supressiva para a construção de dois perfis de expressão gênica, representados por duas bibliotecas de cDNA, uma para genes expressos preferencialmente em reticulócitos de controles (CTRL) e outra para aqueles com maior frequência em reticulócitos de portadores de ndPHHF-B. Esse método permite a subtração de genes comuns ou com expressão similar, assim como a identificação de genes menos expressos, após a normalização dos transcritos. Esse fato é conveniente e importante na análise da expressão gênica em reticulócitos, uma vez que, nessas células, a maioria dos transcritos corresponde aos genes das globinas (Diatchenko *et al.*, 1996, Crable *et al.*, 2005, Andrade *et al.*, 2006).

Entre os genes diferencialmente expressos identificados foram encontrados fatores de transcrição (*KLF1*, *NFIA*, *FOXP1*, *FOXO3a*), co-reguladores da transcrição (*MKRN1*, *NCOA4*), genes envolvidos na regulação da GTPase (*HOOK3*, *RASA1*, *DOCK8*) e genes envolvidos na organização da cromatina (*MIER1*, *PPP1R10*, *WHSC1*, *MORF4L1*). Entre esses genes, *FOXO3a*, *KLF1*, *MIER1* and *HOOK3* apresentaram diferença significativa de expressão e foram estudados individualmente.

O gene *FOXO3a* é um fator de transcrição pertencente à família de proteínas *Forkhead*, as quais possuem um domínio conservado de ligação ao DNA, o *forkhead box* (Bakker *et al.*, 2004; Bakker *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram que a expressão desse fator estava aumentada nos portadores de ndPHHF-B comparada a dos indivíduos controles. Além disso, a presença da proteína Foxo3a não-fosforilada, que interage com o DNA, foi detectada através de *western blotting*, apenas nos reticulócitos de portadores de ndPHHF-B. O *FOXO3a* depende

parcialmente da sua atividade de ligação ao DNA para a regulação de genes alvo e, por isso, requer interações com outros fatores de transcrição para mediar a ativação da transcrição (Monsalve e Olmos, 2011). O *FOXO3a* possui sequências *cis* em diversos promotores, incluindo 4 sequências *cis* na região promotora do gene *PAX1*. Nossos resultados indicam que o fator de transcrição *PAX1* apresenta atividade de ligação ao DNA aumentada na presença da mutação -195 C→G. Assim, provavelmente o *FOXO3a* aumenta a expressão do gene *PAX1* e, dessa forma, ambos estão envolvidos na reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF tipo Brasileira.

Outro gene identificado foi o *KLF1*, fator de transcrição conhecido como um regulador do *switching* do gene da globina  $\gamma$  para o da globina  $\beta$  (Bieker, 2005). Zhou e colaboradores demonstraram que os baixos níveis de *KLF1* em progenitores eritroides adultos: (1) favorecem a formação de complexos que se ligam preferencialmente aos promotores dos genes das globinas  $\gamma$ , propiciando uma vantagem competitiva na interação desses genes com o *LCR*; e (2) são insuficientes para ativar a expressão do gene *BCL11A* e, dessa forma, os níveis de *BCL11A* são muito baixos para reprimir a expressão dos genes das globinas  $\gamma$  (Zhou *et al.*, 2010). Em nossas análises, o gene *KLF1* estava mais expresso nos reticulócitos dos indivíduos controles e a atividade de sua proteína nas células das culturas eritroides desses indivíduos estava aumentada, quando comparada a dos portadores de ndPHHF-B. Esses resultados sugerem que a diminuição na expressão do gene *KLF1* nos portadores de ndPHHF-B favorece a interação entre o gene da globina  $\gamma^A$  e o *LCR*. A expressão do gene *BCL11A*, avaliada por PCR em Tempo Real, não apresentou diferença significativa entre os indivíduos controles e os portadores de ndPHHF-B.

O gene *HOOK3* codifica proteínas citosólicas do tipo *coiled-coil* que possuem um domínio N-terminal conservado (que se liga aos microtúbulos) e um domínio C-terminal (que permite sua associação às membranas do Complexo de Golgi) (Walenta *et al.*, 2001). A proteína Hook3 interage com a proteína IIGP, membro da família de proteínas GTPases. A associação dessas GTPases com a membrana intracelular é responsável pela estimulação de vias de sinalização relacionadas ao IFN- $\gamma$  (Kaiser *et al.*, 2004). Chatterjee e colaboradores demonstraram que o sinergismo entre os fatores de transcrição *p65* (*NF- $\kappa$ B*) e *RXR*  $\beta$  pode ser

responsável pelo aumento da transcrição do gene da globina  $\beta$  em resposta ao IFN- $\gamma$ , em células K562. Assim, o IFN- $\gamma$  atua na regulação da transcrição do gene de globina  $\beta$ , através de uma ação conjunta envolvendo a fosforilação das subunidades p50 do complexo p65/p50 e a fosforilação de proteínas RXR *beta like* (Chatterjee *et al.*, 1996). Nossos resultados sugerem que a menor transcrição do gene da globina  $\beta$  nos portadores de ndPHHF-B, em decorrência da reativação do gene da globina  $\gamma^A$ , pode ser responsável por uma diminuição na expressão do gene *HOOK3* nesses indivíduos.

O gene *MIER1* corresponde a um remodelador de cromatina que possui duas isoformas, *MIER1 $\alpha$*  e *MIER1 $\beta$* , as quais diferem em sua região C-terminal e tem, em comum, os domínios ELM2, SANT e de ativação ácida. Ambas as isoformas da proteína Mier1 são capazes de reprimir a transcrição de genes alvos, através de seu domínio ELM2, por meio do recrutamento de enzimas de remodelamento da cromatina, como a histona deacetilase I, levando à formação da heterocromatina com conseqüente silenciamento gênico (Ding *et al.*, 2004; Blackmore *et al.*, 2008). Nos portadores de ndPHHF-B foi observada uma diminuição na expressão do gene *MIER1*, hipotetizando-se que esse gene pode estar envolvido no *switching* do gene da globina  $\gamma$  para a globina  $\beta$ , atuando na formação e manutenção da heterocromatina e levando ao silenciamento do gene da globina  $\gamma$ , em indivíduos que apresentam níveis baixos de HbF.

Ao nosso conhecimento, não existem descrições da participação do gene *HOOK3*, do fator de transcrição *FOXO3a* e do remodelador de cromatina *MIER1* na regulação da síntese dos genes das globinas. Esses estão sendo descritos, pela primeira vez, como genes candidatos, em nosso trabalho. Além disso, alguns dos outros genes identificados na Biblioteca Subtrativa poderiam atuar em sinergismo para o desenvolvimento do fenótipo de ndPHHF-B.

### **Mutação -195 C→G no promotor do gene da globina $\gamma^A$ em pacientes com anemia falciforme**

A heterogeneidade clínica é uma característica importante da anemia falciforme (Steinberg, 2009). Os possíveis indicadores da variação fenotípica da anemia falciforme são as

alterações nos níveis de HbF, os haplótipos do grupamento do gene da globina  $\beta$ , mutações que causam ndPHHF e a presença de talassemia alfa (Costa, 2001).

Os haplótipos da anemia falciforme – Benin, Bantu, Senegal, Camarões e Árabe–Indiano – são definidos por diversos polimorfismos do DNA, ligados ao grupamento da globina  $\beta$ , que podem influenciar a expressão do gene da globina  $\gamma$  e, conseqüentemente, os níveis de HbF (Costa, 2001). Os diferentes haplótipos estão relacionados ao quadro clínico e às variações nos níveis de HbF (Steinberg, 2001). O haplótipo Senegal está associado a níveis elevados de HbF (> 15%) e curso clínico menos grave; o Benin, a níveis moderados de HbF (5% a 15%) e curso clínico intermediário; o Bantu, a níveis diminuídos de HbF (< 5%) e quadro clínico mais grave; e o Árabe–Indiano apresenta níveis elevados de HbF e curso clínico heterogêneo (Powars, 1991).

Em 1975, Stamatoyannopoulos e colaboradores sugeriram que as formas de PHHF podem modificar o curso clínico da anemia falciforme, incrementando a síntese de HbF e tendo, como consequência, manifestações clínicas moderadas (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1975).

Como o aumento nos níveis de HbF na anemia falciforme conduz a uma melhor evolução clínica dessa doença, buscamos identificar pacientes com anemia falciforme que também apresentem ndPHHF tipo Brasileira (-195 C→G). Para isso, rastreamos, através do método de *D-HPLC*, a região promotora do gene da globina  $\gamma^A$  no DNA extraído de amostras de sangue de pacientes com anemia falciforme.

A técnica de DHPLC é baseada no fato de que, após a desnaturação do DNA, as fitas podem se anelar aleatoriamente durante o resfriamento gradual, formando duplas-fitas onde há um pareamento perfeito (homoduplex) ou duplas-fitas onde não há um pareamento perfeito decorrente de uma alteração na sequência de pares de bases no DNA (heteroduplex). Como as fitas heteroduplex são menos estáveis do que as homoduplex, há uma retenção diferencial na coluna do D-HPLC (Xiao & Oefner, 2001).

Em nossas análises, a mutação -195 C→G no promotor do gene da globina  $\gamma^A$  não foi identificada em nenhum dos 405 pacientes com anemia falciforme estudados.

Em 2010, Barbosa e colaboradores analisaram a região promotora dos genes das globinas  $\gamma$  em pacientes com anemia falciforme, para tentar compreender as variações na

síntese de cadeias  $\gamma$ . Quatro novos polimorfismos,  $-324 C \rightarrow T$ ,  $-317 A \rightarrow G$ ,  $-309 A \rightarrow G$  e  $-307 G \rightarrow A$ , e quatro mutações já descritas,  $-398 G \rightarrow A$ ,  $-369 C \rightarrow G$ ,  $-271 C \rightarrow T$  e a deleção de 4 pb ( $-225$  a  $-222$  pb) foram identificados no promotor dos genes da globina  $\gamma^A$ . Todavia, a presença da mutação  $-195 C \rightarrow G$  nesse promotor não foi encontrada em nenhum dos paciente (Barbosa *et al.*, 2010).

Em nosso estudo foi identificada, em 8 pacientes com anemia falciforme, a presença de uma deleção de 4 pares de base na região  $-226$  a  $-222$  do promotor do gene da globina  $\gamma^A$ . A deleção de 4 pb na região  $-225$  a  $-222$ , correspondendo aos nucleotídeos AGCA, foi descrita por Gilman e colaboradores, em 1987. Esses pesquisadores hipotetizaram que essa deleção poderia causar redução na expressão do gene da globina  $\gamma^A$ , sugerindo que a região  $-225$  a  $-117$  desse promotor era importante para a regulação negativa da expressão desse gene em indivíduos adultos (Gilman *et al.*, 1987). Em 2000, Huang e colaboradores identificaram, em uma família chinesa, uma deleção de 4 pb AAGC na região  $-226$  a  $-223$  que estaria associada a um pequeno aumento na expressão do gene da globina  $\gamma^A$  na vida adulta (Huang *et al.*, 2000). Todavia, esse último trabalho não descreve como deve ser feita ou se é possível a distinção entre essas duas deleções, uma vez que, em ambas, os fragmentos resultantes da deleção são idênticos. Dessa forma, nossos experimentos não permitiram caracterizar se a deleção ocorreu na região  $-225$  a  $-222$  ou na  $-226$  a  $-223$ , indicando apenas a presença de uma deleção nessa região. Essa deleção de 4 pares de base também foi identificada, através de D-HPLC e sequenciamento, em indivíduos controles indicando que, provavelmente, não está relacionada a alterações nos níveis de HbF.

## VIII. CONCLUSÃO



A presença da mutação C→G na posição -195 do promotor do gene da globina  $\gamma^A$ , característica da ndPHHF tipo Brasileira, (1) interrompe o sítio de ligação ao DNA do fator de transcrição *NF-E1/YY1*, diminuindo a sua interação, e (2) cria um novo sítio que é o domínio central de ligação do *PAX1*, permitindo sua interação com o promotor do gene da globina  $\gamma^A$ , o que reativa a expressão desse gene e aumenta a produção de HbF na fase adulta. Além disso, é provável que a expressão do gene *PAX1* esteja aumentada devido à ativação de seu promotor pelo fator de transcrição *FOXO3a*, o qual possui 4 sequências *cis* no promotor do *PAX1* e expressão de *FOXO3a* estava significativamente aumentada nos reticulócitos dos portadores de ndPHHF-B.

A presença de outros fatores e / ou proteínas que produzem um estado de cromatina aberto nessa região promotora pode ser importante para que a reativação do gene da globina  $\gamma^A$  seja mantida. O aumento significativo da expressão do gene *MIER1* nos indivíduos controles pode estar relacionado à participação desse gene no *switching* do gene da globina  $\gamma$  para a globina  $\beta$ , visto que é um remodelador de cromatina capaz de levar à formação da heterocromatina com conseqüente silenciamento gênico. Outro gene identificado, o *KLF1*, já descrito na literatura, apresentou expressão gênica diminuída e menor atividade de sua proteína nos portadores de ndPHHF tipo Brasileira, o que pode favorecer a interação entre o gene da globina  $\gamma^A$  e o *LCR*.

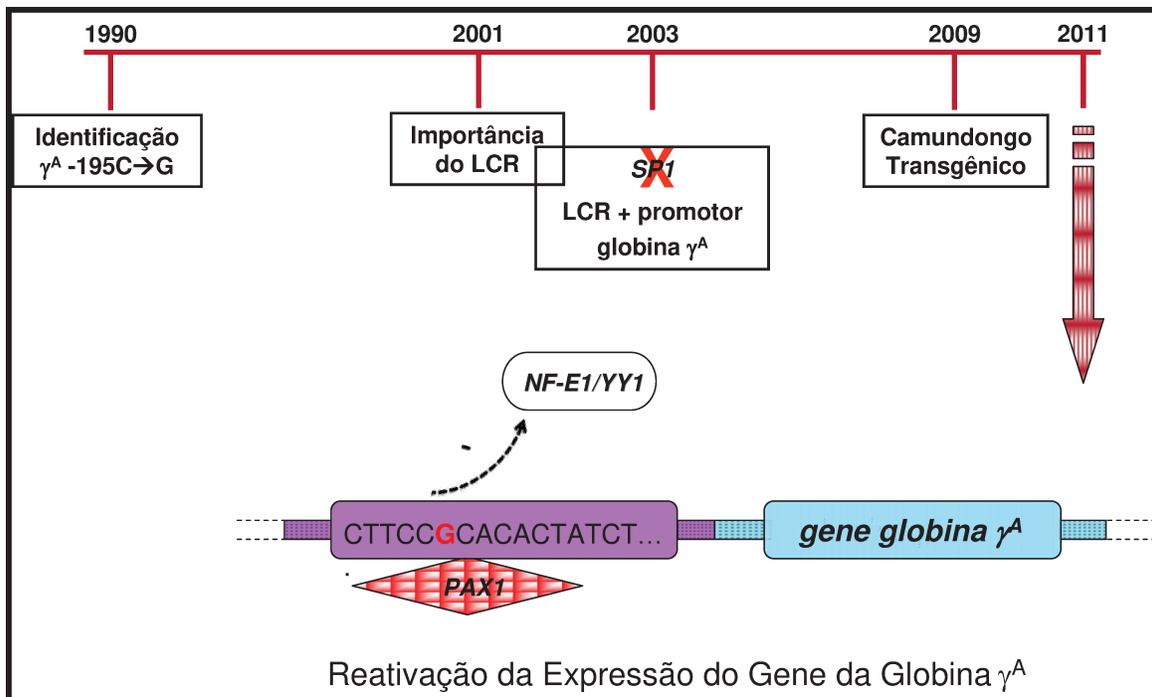
Podemos inferir que os fatores de transcrição e os genes diferencialmente expressos identificados nos ensaios de *Array* DNA-proteína e nas Bibliotecas Subtrativas Supressivas, respectivamente, devem atuar em sinergismo para a produção do fenótipo de ndPHHF tipo Brasileira e, conseqüentemente, para a manutenção de níveis elevados de HbF na vida adulta.

Nesse trabalho, apresentamos a primeira descrição da participação direta dos fatores de transcrição, *NF-E1/YY1*, *PAX1*, *FOXO3a*, e do remodelador de cromatina *MIER1* na regulação da síntese dos genes das globina. Isso pode representar novas vias celulares de reativação do gene da globina  $\gamma^A$  e de controle do *switching* de hemoglobina nas células eritroides.

## Conclusão

Em virtude do aumento nos níveis de HbF em pacientes com anemia falciforme ser benéfico, buscamos identificar a substituição  $-195\text{ C}\rightarrow\text{G}$  na região promotora do gene da globina  $\gamma^A$  nesses pacientes. Todavia, essa mutação não foi identificada em nenhum paciente com anemia falciforme estudado. Uma deleção de 4 pb na região  $-226$  a  $-222$  do promotor do gene da globina  $\gamma^A$  foi identificada em 8 pacientes com anemia falciforme. Como essa deleção também foi observada em alguns indivíduos controles, é provável que não esteja relacionada a alterações nos níveis de HbF.

Nossos resultados fornecem as primeiras evidências *in vitro* para o provável mecanismo molecular de reativação do gene da globina  $\gamma^A$  na ndPHHF tipo Brasileira: alteração na interação dos fatores de transcrição *NF-E1/YY1* e *PAX1* e a região  $-195$  do promotor desse gene. Nossos dados também sugerem a participação de novos genes, como *HOOK3* e *MIER1*, na regulação dos genes da globina  $\gamma^A$  e na manutenção de níveis elevados de HbF, o que pode representar novas vias de controle do *switching* de hemoglobina em células eritroides.



# IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Algar E. A review of the Wilms' tumor 1 gene (WT1) and its role in hematopoiesis and leukemia. **J Hematother Stem Cell Res**. 2002;11(4):589-99.

Andrade TG, Peterson KR, Cunha AF, Moreira LS, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Identification of novel candidate genes for globin regulation in erythroid cells containing large deletions of the human beta-globin gene cluster. **Blood Cells Mol Dis**. 2006;37(2):82-90.

Andrade TG. Mecanismos reguladores da síntese de globinas: Avaliação funcional da região R/PYR e análise da expressão gênica diferencial na persistência hereditária de hemoglobina fetal e na delta-beta talassemia [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Amoyal I, Fibach E. Hemoglobin switch in the newborn: a flow cytometry analysis. **Neonatal**. 2007;91(1): 61-8.

Arcasoy MO, Romana M, Fabry ME, Skarpidi E, Nagel RL, Forget BG. High levels of human  $\gamma$ -globin gene expression in adult mice carrying a transgene of deletion-type hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Mol Cell Biol**. 1997;17(4): 2076-89.

Atweh GF, DeSimone J, Sauntharajah Y, Fathallah H, Weinberg RS, Nagel RL *et al*. Hemoglobinopathies. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2003:14-39.

Bacolla A, Ulrich MJ, Larson JE, Ley TJ, Wells RD. An intramolecular triplex in the human gamma-globin 5'-flanking region is altered by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. **J Biol Chem**. 1995. 270(41):24556-63.

Ballas SK. Sickle cell disease: current clinical management. **Semin Hematol**. 2001;38(4):307-14.

Bakker WJ, van Dijk TB, Parren-van Amelsvoort M, Kolbus A, Yamamoto K, Steinlein P *et al*. Differential regulation of Foxo3a target genes in erythropoiesis. **Mol Cell Biol**. 2007;27(10):3839-54.

Bakker WJ, Blázquez-Domingo M, Kolbus A, Besooyen J, Steinlein P, Beug H *et al*. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. **J Cell Biol** 2004. 164(2):175-84.

Blackmore TM, Mercer CF, Paterno GD, Gillespie LL. The transcriptional cofactor MIER1-beta negatively regulates histone acetyltransferase activity of the CREB-binding protein. **BMC Res Notes**. 2008;1:68.

Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood**. 2006;107(2):435-443.

Barbosa CG, Gonçalves-Santos NJ, Souza-Ribeiro SB, Moura-Neto JP, Takahashi D, Silva DO, *et al*. Promoter region sequence differences in the A and G gamma globin genes of Brazilian sickle cell anemia patients. **Braz J Med Biol Res**. 2010;43(8):705-11.

Bieker JJ. Probing the onset and regulation of erythroid cell-specific gene expression. **Mt Sinai J Med**. 2005;72(5):333-8.

Bradley TB, Ranney HM. Acquired disorders of hemoglobin. **Prog Hematol**. 1973;8:77-98.

Bunn H, Forget BG. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. Published by WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, US. 1986.

Calzolari R, McMorrow T, Yannoutsos N, Langeveld A, Grosveld F. Deletion of a region that is a candidate for the difference between the deletion forms of hereditary persistence of fetal hemoglobin and deltabeta-thalassemia affects beta- but not gamma-globin gene expression. **EMBO J**. 1999;18(4):949-58.

Camaschella C, Serra A, Gottardi E, Alfarano A, Revello D, Mazza U *et al*. A new hereditary persistence of fetal hemoglobin deletion has the breakpoint within the 3' beta-globin gene enhancer. **Blood**. 1990;75(4):1000-5.

Chatterjee M, Agrawal S, Agarwal SS. Differential effect of IFN-alpha and IFN-gamma on phosphorylation of p65 and p50 (rel) in the K562 cell line: implications for altered interaction with RXR beta. **Cytokine**. 1996;8(5):357-64.

Clarke G, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemia: review and update. **Clin Chem**. 2000;46:1284-1290.

Crable SC, Hammond SM, Papes R, Rettig RK, Zhou GP, Gallagher PG *et al*. Multiple isoforms of the KC1 cotransporter are expressed in sickle and normal erythroid cells. **Exp. Hematol**. 2005;33(6): 624–631.

Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, Schechter AN. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest**. 2003;111(2):231-9.

Collins FS, Cole JL, Lockwood WK, Iannuzzi MC. The deletion in both common types of hereditary persistence of fetal hemoglobin is approximately 105 kilobases. **Blood**. 1987;70(6):1797-1803.

Collins FS, Metherall JE, Yamakawa M, Pan J, Weissman SM, Forget BG. A point mutation in the  $\text{A}^\gamma$ -globin gene reporter in Greek hereditary persistence of fetal haemoglobin. **Nature**. 1985;313(6000):325-6.

Collins FS, Stoeckert CJ Jr, Serjeant GR, Forget BG, Weissman SM.  $\text{G}^\gamma\beta^+$  hereditary persistence of fetal hemoglobin: cosmid cloning and identification of a specific mutation 5' to the  $\text{G}^\gamma$  gene. **PNAS**. 1984;81(15):4894-8.

Costa FF. Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia, Fundamentos e Prática. Atheneu, São Paulo, Brasil. 2001.

Costa FF, Zago MA, Cheng G, Necthtman JF, Stoming TA, Huisman THJ. The Brazilian type of nondeletional  $\text{A}^\gamma$ -fetal hemoglobin has a C→G substitution at nucleotide -195 of the  $\text{A}^\gamma$ -globin gene. **Blood**. 1990;76(9):1896-7.

Costa VA, Acedo MJ, Polimeno NC, Bertuzzo CS. Estimation of the frequency of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin in Brazil. **Cad Saude Publica**. 2002;18(5):1469-71.

Cunha AF, Brugnerotto AF, Corat MA, Devlin EE, Gimenes AP, Melo MB *et al*. High levels of human gamma-globin are expressed in adult mice carrying a transgene of the Brazilian type of hereditary persistence of fetal hemoglobin ((A)gamma -195). **Hemoglobin**. 2009;33(6):439-47.

Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. **Biotechniques**. 2004;37(6):961-69.

Davis L, Dibner MD, Battey JF. Preparation of DNA from eukaryotic cells. In: *Basis Methods in Molecular Biology*. Edited by Davis L, Dibner MD, Battey JF. Published by Elsevier Science Publishing, New York, US. 1986.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, *et al*. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **PNAS**. 1996;93(12):6025-30.

Ding Z, Gillespie LL, Mercer FC, Paterno GD. The SANT domain of human MI-ER1 interacts with Sp1 to interfere with GC box recognition and repress transcription from its own promoter. **J Biol Chem.** 2004;279(27):28009-16.

Donovan-Peluso M, Young K, Dobkin C, Bank A. Erythroleukemia (K562) cells contain a functional beta-globin gene. **Mol Cell Biol.** 1984;4(11):2553-5.

Dzierzak E. A developmental approach to hematopoiesis. In: Disorders of hemoglobin. Edited by Steinberg MH, Forget BG; Higgs D, Nagel RL. Published by Cambridge University Press. Cambridge, UK. 2001.

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** 1998;8(3):186-94.

Feingold EA, Forget BG. The breakpoint of a large deletion causing hereditary persistence of fetal hemoglobin occurs within an erythroid DNA domain remote from the beta-globin gene cluster. **Blood.** 1989;74(6):2178-86.

Ferrone FA. Polymerization and sickle cell disease: a molecular view. **Microcirculation.** 2004;11(2): 115-28.

Forget BG. Molecular genetics of the human globin genes. In: Disorders of hemoglobin. Edited by Steinberg MH, Forget BG; Higgs D, Nagel RL. Published by Cambridge University Press. Cambridge, UK. 2001.

Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Ann NY Acad Sci.** 1998;850:39-45.

Fucharoen S, Shimizu K, Fukumaki Y. A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the G gamma-globin gene in the Japanese HPFH: implication of factor binding in elevated fetal globin expression. **Nucleic Acids Res.** 1990;18(17):5245-53.

Gale R, Clegg J, Huehns E. Human embryonic hemoglobins Gower-1 and Gower-2. **Nature.** 1979;280:162-164.

Gelinas R, Bender M, Lotshaw C, Waber P, Kazazian JrH, Stamatoyannopoulos G. Chinese  $\text{A}_\gamma$ -fetal haemoglobin: C to T substitution at position -196 of the  $\text{A}_\gamma$  gene promoter. **Blood.** 1986;67(6): 1777-9.

Gilman JG, Mishima N, Wen XJ, Kutlar F, Huisman TH. Upstream promoter mutation associated with a modest elevation of fetal hemoglobin expression in human adults. **Blood**. 1988;72(1):78-81.

Gilman JG, Johnson ME, Mishima N. Four base-pair DNA deletion in human A gamma globin-gene promoter associated with low A gamma expression in adults. **Br J Haematol**. 1987;68(4):455-8.

Green NS, Barral S. Genetic modifiers of HbF and response to hydroxyurea in sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer**. 2011;56(2):177-81.

Gumucio DL, Rood KL, Blanchard-McQuate KL, Gray TA, Saulino A, Collins FS. Interaction of Sp1 with the human gamma globin promoter: binding and transactivation of normal and mutant promoters. **Blood**. 1991;78(7):1853-63.

Hecht F, Motulsky A, Lemire R, Shepard T. Predominance of human hemoglobin Gower-1 in early human embryonic development. **Science**. 1966;152(178):91-2.

Henthorn PS, Mager DK, Huisman TH.J & Smithies O. A gene deletion ending within a complex array of repeated sequences 3' to the human beta-globin gene cluster. **PNAS**. 1986;83(14):5194-8.

Hofmann OM, Mould R, Brittain T. Allosteric modulation of oxygen binding to the three human embryonic hemoglobins. **Biochem J**. 1995;306(Pt2):367-70.

Huang DY, Kuo YY, Lai JS, Suzuki Y, Sugano S, Chang ZF. GATA-1 and NF-Y cooperate to mediate erythroid-specific transcription of Gfi-1B gene. **Nucleic Acids Res**. 2004;32(13):3935-46.

Huang XD, Yang XO, Huang RB, Zhang HY, Zhao HL, Zhao YJ *et al*. A novel four base-pair deletion within the A gamma-globin gene promoter associated with slight increase of A gamma expression in adult. **Am J Hematol**. 2000;63(1):16-9.

Huisman THJ, Carver MFH & Baysal E. Hereditary persistence of fetal haemoglobin 1. In: A Syllabus of Thalassemia Mutations. Edited by Huisman THJ, Carver MFH & Baysal E. Published by The Sickle Cell Anemia Foundation in Augusta, GA, US. 1997.

Indrak K, Indrakova J, Kutlar F, Pospisilova D, Sulovska I, Baysal E *et al.* Compound heterozygosity for a  $\beta^0$ -thalassemia (frameshift codons 38/39; -C) and a nondeletional Swiss type of HPFH (A→C at NT -110,  $G_\gamma$ ) in a Czechoslovakian family. **Ann Hematol.** 1991;63(2):111-5.

Jiang X, Roth L, Lai C, Li X. Profiling activities of transcription factors in breast cancer cell lines. **Assay Drug Dev Technol.** 2006;4(3):293-305.

Jiang X, Norman M, Li X. Use of an array technology for profiling and comparing transcription factors activated by TNF $\alpha$  and PMA in HeLa cells. **Biochim Biophys Acta.** 2003;1642(1-2):1-8.

Kaiser F, Kaufmann SH, Zerrahn J. IIGP, a member of the IFN inducible and microbial defense mediating 47 kDa GTPase family, interacts with the microtubule binding protein hook3. **J Cell Sci.** 2004;117(Pt 9):1747-56.

Katsantoni EZ, Langeveld A, Wai AWK, Drabek D, Grosveld F, Anagnou NP *et al.* Persistent  $\gamma$ -globin expression in adult transgenic mice is mediated by HPFH-2, HPFH-3, and HPFH breakpoint sequences. **Blood.** 2003;102(9):3412-9.

Kimura EM, Duarte DF, Santana SC, Borges SE, Silva NM, Gervasio AS *et al.* Hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) an structural alterations of  $\gamma$  globin in Brazil. **Genet Mol Biol.** 2000;23:573.

Kosteas T, Palena A, Anagnou NP. Molecular cloning of the breakpoints of the hereditary persistence of fetal hemoglobin type-6 (HPFH-6) deletion and sequence analysis of the novel juxtaposed region from the 3' end of the beta-globin gene cluster. **Hum Genet.** 1997;100(3-4):441-5.

Kutlar A, Gardiner MB, Headlee MG, Reese AL, Cleek MP, Nagle S *et al.* Heterogeneity in the molecular basis of three types of hereditary persistence of fetal hemoglobin and the relative synthesis of the G gamma and A gamma types of gamma chain. **Biochem Genet.** 1984;22(1-2):21-35.

Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. **Blood.** 1987;69(1):255-263.

Li Q, Duan Z, Stamatoyannopoulos G. Analysis of the mechanism of action of non-deletion hereditary persistence of fetal hemoglobin mutants in transgenic mice. **EMBO JB.** 2001;20(1-2):157-64.

Li WW, Hsiung Y, Zhou Y, Roy B, Lee AS. Induction of the mammalian GRP78/BiP gene by Ca<sup>2+</sup> depletion and formation of aberrant proteins: activation of the conserved stress-inducible grp core promoter element by the human nuclear factor YY1. **Mol Cell Biol.** 1997;17(1):54-60.

Liu LR, Du ZW, Zhao HL, Liu XL, Huang XD, Shen J *et al.* T to substitution at -175 or -173 of the gamma-globin promoter affects GATA-1 and Oct-1 binding in vitro differently but can independently reproduce the hereditary persistence of fetal hemoglobin phenotype in transgenic mice. **J Biol Chem.** 2005;280(9):7452-7459.

Ma YN, Zhang X, Zhang JW, Zhang XH, Wang RX. Screening for trans-acting factors and other factors involved in the activating or silencing of the gamma-globin gene during human ontogeny. **Biochem Cell Biol.** 2007;85(3):347-57.

Magis W, Martin DI. HMG-I binds to GATA motifs: implications for an HPFH syndrome. **Biochem Biophys Res Commun.** 1995;214(3):927-33.

Mantovani R, Margaretti N, Nicolis S, Ronchi A, Ottolenghi S. The effects of HPFH mutations in the human  $\gamma$ -globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid specific nuclear factors. **Nucleic Acids Res.** 1988;16(16):7783-93.

Monsalve M, Olmos Y. The Complex Biology of FOXO. **Curr Drug Targets.** 2011;12(9):1322-1350.

Motum PI, Deng ZM, Huong L, Trent RJ. The Australian type of nondeletional G gamma-HPFH has a C-->G substitution at nucleotide -114 of the G gamma gene. **Br J Haematol.** 1994;86(1):219-21.

Motum PI, Hamilton TJ, Lindeman R, Le H, Trent RJ. Molecular characterisation of Vietnamese HPFH. **Hum Mutat.** 1993;2(3):179-84.

Nagel RL, Platt OS. General Pathophysiology of Sickle Cell Disease. In: Disorders of hemoglobin. Edited by Steinberg MH, Forget BG; Higgs D, Nagel RL. Published by Cambridge University Press. Cambridge, UK. 2001.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. The molecular and biochemical basis of genetic disease: hemoglobinopathies. In: Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Edited by Nussbaum RL. Published by WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, US. 2004.

Olave IA, Doneanu C, Fang X, Stamatoyannopoulos G, Li Q. Purification and identification of proteins that bind to the hereditary persistence of fetal hemoglobin -198 mutation in the gamma-globin gene promoter. **J Biol Chem.** 2007;282(2):853-62.

Oner R, Kutlar F, Gu LH, Huisman TH. The Georgia type of nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin has a C→T mutation at nucleotide-114 of the A gamma-globin gene. *Blood.* 1991 Mar 1;77(5):1124-5.

Ottolenghi S, Nicolis S, Taramelli R, Margaretti N, Mantovani R, Comi P *et al.* Sardinian G gamma-HPFH: a T→C substitution in a conserved "octamer" sequence in the G gamma-globin promoter. **Blood.** 1988;71(3):815-7.

Pace BS, Zein S. Understanding mechanisms of gamma-globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. **Dev Dyn.** 2006;235(7):1727-37.

Perutz MF. Species adaptation in a protein molecule. **Mol Biol Evol.** 1983;1(1):1-28.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 2001;29(9):e45.

Powars DR. Beta-s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematological features. **Hematol Oncol Clin North Am.** 1991;5(3):475-93.

Raich N, Clegg CH, Grofti J, Roméo PH, Stamatoyannopoulos G. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. **EMBO J.** 1995;14(4):801-9.

Raich N, Papaynnopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Enver T. Demonstration of a human epsilon-globin gene silencer with studies in transgenic mice. **Blood.** 1992;79(4):861-4.

Randhawa Z, Jones R, Lie-Injo L. Human hemoglobin Portland II (z2b 2). **J Biol Chem.** 1984;259(11):7325-7330.

Robinson J, Sieff C, Delia D, Edwards PA, Greaves M. Expression of cell-surface HLA-DR, HLAABC and glycophorin during erythroid differentiation. **Nature.** 1981;289: 68-71.

Ronchi A, Nicolis S, Santoro C, Ottolenghi S. Increased Sp1 binding mediates erythroid-specific overexpression of a mutated (HPFH)  $\gamma$ -globin promoter. **Nucleic Acids Res.** 1989;17(24):10231-41.

Sankaran VG, Nathan DG. Reversing the hemoglobin switch. **N Engl J Med**. 2010;363(23):2258-60.

Schreiber R, Goncalves MS, Junqueira ML, Saad ST, Krieger JE, Costa FF. The  $\Lambda$ gamma -195 (C→G) mutation in hereditary persistence of fetal hemoglobin is not associated with activation of a reporter gene in vitro. **Braz J Med Biol Res**. 2001;34(4):489-92.

Schroeder WA, Huisman TH, Sukumaran PK. A second type of hereditary persistence of foetal haemoglobin in India. **Br J Haematol**. 1973;25(1):131-135.

Song J, Ugai H, Kanazawa I, Sun K, Yokoyama KK. Independent repression of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements. **J Biol Chem**. 2001;276(23):19897-904.

Spector DL, Gasser SM. A molecular dissection of nuclear function. **EMBO Rep**. 2003;4(1):18-23.

Stamatoyannopoulos G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Exp Hematol**. 2005;33(3):259-271.

Stamatoyannopoulos G, Grosfeld F. Hemoglobin switching. In: The Molecular Basis of Blood Diseases. Edited by Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM & Varmus H. Published by WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, US. 2001.

Stamatoyannopoulos G, Wood WG, Papayannopoulou T, Nute PE. A new form of hereditary persistence of fetal hemoglobin in blacks and its association with sickle cell trait. **Blood**. 1975;46(5):683-92.

Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **ScientificWorldJournal**. 2009;9:46-67.

Steinberg M. Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Hemoglobin**. 2001;25(2):195-211.

Stoming TA, Stoming GS, Lanclos KD, Fei YJ, Altay C, Kutlar F, Husman THJ. A  $\Lambda$  $\gamma$  type of nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin with a T → C mutation at position -175 to the cap site of the  $\Lambda$  $\gamma$ -globin gene. **Blood**. 1989;73(1):329-33.

Superti-Furga G, Barberis A, Schaffner G, Buslinger M. The -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CAAT region of the  $\gamma$  globin gene. **EMBO J**. 1988;7(10):3099-4107.

Sykes K, Kaufman R. A naturally occurring gamma globin gene mutation enhances SP1 binding activity. **Mol Cell Biol**. 1990;10(1):95-102.

Takahashi T, Schreiber R, Krieger JE, Saad STO, Costa FF. Analysis of the mechanism of action of the Brazilian type ( $\gamma$ <sup>A</sup> -175 C  $\rightarrow$  G) of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Eur J Haematol**. 2003;71(6):418-24.

Tasiopoulou M, Boussiou M, Sinopoulou K, Moraitis G, Loutradi-Anagnostou A, Karababa P. G gamma-196 C $\rightarrow$ T, A gamma-201 C $\rightarrow$ T: two novel mutations in the promoter region of the gamma-globin genes associated with nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin in Greece. **Blood Cells Mol Dis**. 2008;40(3):320-2.

Tate VE, Wood WG, Weatherall DJ. The british form of hereditary persistence of fetal haemoglobin results from a single base substitution adjacent to an S 1 hypersensitive site 5' to the  $\gamma$ <sup>A</sup>-globin gene. **Blood**. 1986;68:1389-93.

Thein SL, Menzel S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. **Br J Haematol**. 2009;145(4):455-67.

Townes TM, Behringer RR. Human globin locus activating region: role in temporal control. **Trends Genet**. 1990;6(7):219-23.

Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lecluse Y, Debili N *et al*. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. **Exp Hematol**. 2004;32(2):179-87.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al*. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**. 2002;3(7): RESEARCH0034.

Vitale M, Calzolari R, Di Marzo, Acuto S, Maggio A. A region upstream of the human  $\delta$ -globin gene shows a stage-specific interaction with globin promoters in erythroid cell lines. **Blood Cells Mol Dis**. 2001;27(5):874-81.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. **Hum Mutat.** 2001;17(6):439-74.

Wang HY, Chang HT, Pai TW, Wu CI, Lee YH, Chang YH *et al.* Transcriptional regulation of human eosinophil RNases by an evolutionary- conserved sequence motif in primate genome. **BMC Mol Biol.** 2007;8:89.

Walenta JH, Didier AJ, Liu X, Krämer H. The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. **J Cell Biol.** 2001;152(5):923-34.

Weatherall DJ, Clegg JB. Recent developments in the molecular genetics of human hemoglobin. **Cell.** 1979;16(3):467-479.

Weatherall DJ. The molecular basis for abnormal gene action: recent lessons from the thalassaemia model. **Clin Sci Mol Med.** 1977;52(3):223-227.

Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. **Blood.** 2011;117(15):3945-53.

Wood WG. Hereditary Persistence and Fetal Hemoglobin and  $\delta\beta$ Thalassemia. Disorders of Hemoglobin. In: Disorders of hemoglobin. Edited by Steinberg MH, Forget BG; Higgs D, Nagel RL. Published by Cambridge University Press. Cambridge, UK. 2001.

Zamaro PJA, Canalli AA, Silva Junior WA, Domingos CRB. **J Bras Patol Me Lab.** 2002;38(4):261-66.

Zertal-Zidani S, Merghoub T, Ducrocq R, Gerard N, Satta D, Krishnamoorthy R. A novel C→A transversion within the distal CCAAT motif of the Ggamma-globin gene in the Algerian Ggammabeta+-hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Hemoglobin.** 1999;23(2):159-69.

Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. **Nat Genet.** 2010;42(9):742-4.

Zhu W, TomHon C, Mason M, Campbell T, Sheldon E, Richards N, Goodman M, Gumucio DL. Analysis of linked human epsilon and gamma transgenes: effect of locus control region hypersensitive sites 2 and 3 or a distal YY1 mutation on stage-specific expression patterns. **Blood.** 1999;15;93(10):3540-9.



# X. ANEXOS



ANEXO 1

ESQUEMA ARRAY DNA-PROTEÍNA

ComboArray: Schematic Diagram of Protein/DNA ComboArray

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	AP-1 (1)	GAS/ISRE	Pho1	Stat6	C/EBPβ/IRF3	Freac-2 (1)	HNF-3	MT-Box	PPAR	AMC-1	CSBP	HOXD-8 (1)	MITF (1)	PPUR (1)	TEF-3	AP-2 (2)	c-myc BP	EIF	ISGF	MHC W box	MREB (3)	PREB	T3K	
B	AP-2 (1)	GATA	Ph-1 (1)	TRID	CE-1 (1)	Freac-2 (2)	HFH-8	MUSE-1	PPAR	AREB-6	CTCF	HOXD-8 (2)	MyoD	PPUR (2)	TF-1	α/β-PAL	c-Myc	Fre-1/JUN	KBF-A	max-1/2/3	M-rim BP	PTF-1β	Tat	
C	AR	GRO/PR	PPAR (1)	TR	CS-2 (1)	Freac-4	HIF-1	MZF-1	NRRE	ARP	E12 (1)	HOXD-9/10	Myo6	Pur-1	TRE-1/2	AP-3 (2)	COUP-TE (2)	GATA-1 (2)	Larso-Fern BP	Mrb (2)	OCT (3)	PTF-1	TEF-1/AP-5	
D	Bm-3	IRF-1	PRE	TR/DR-4	CEP-CRE	Freac-7	HNF-3 (1)	ME-7 (1)	NSRECA	ATE/CRE	EBP-40/45	ICSBP	Myo7	PKR	+Mad	ATF-α/α/β	CP-1B	GRF-1/2/3/HIS (2)	LF-A1 (2)	myc/CT	DOC	PUL1	TEF1	
E	CEBP (1)	MEF-1 (1)	MAA/DR-5 (1)	USF-1 (1)	COUP-IF (1)	GAG	HNF-3 (2)	Hlx-2.5	SMA	ATF (2)	EBLF (1)	Isl-1 (1)	MZF1 (1)	RB (1)	Wt1 (1)	ATF-α	GOLF	LF-42	myc/PRE (2)	p53 (2)	POR	TFE-3L		
F	CBF (1)	MEF-2 (1)	PXX/DR-1	VDR/DR-3	CREB-BP-1	GAS	HNF-4 (2)	HPAS-2	Sm	CACC	EBLF (2)	KPS-1	MZF1 (2)	MZF1 (2)	Wt1 (2)	β M glob factor B1	CRE	HNF-1 (2)	LF-82	MLAM BP	PAX-1 2/3 (3)	TEEB		
G	CEP	Myo-Max	SE	HSE	c-Mid	GATA-1 (1)	HNF-4/COUP-IF	MZF-3	SKY	COAT	EIF	KIP-1	ME-4FA	Wt1 (3)	BZP	C/TA1	HNF-1/1b/1/a	LFH	IRF-1	PAX-2 (2)	RORE	Ily-1BP		
H	c-Myc (1)	ME-1 (1)	SMAD/SRE	MRE	E47	GATA-1/2	HNF-1	ORE	Tox/CREB	COAC	HEH-1	LCR-F1	HNF-Gm (1)	SF-1	XZ BP	CEBP (2)	DE-1	HNF-1 (2)	LSF	PAX-5 (2)	RVF	Trans-form BP		
I	CREB (1)	HNF-1 (1)	SMAD-3/4	ADR-1 (1)	E4BP-4 (1)	GATA-2	HNF-1/2	p300	TCE/TEF	CO2BRC (1)	HNF-8/9/LUN	LF-A1	NFL-2	SF-2	XBP-1 XZ BP	CEBP (3)	E12/E47	HNF-4	LXRE-1	PAX-6 (2)	Suall	TF-1 (1)		
J	E2F-1 (1)	ME-EL/YY1	Sp-1	Amr/Amr	E4E/ATF	GATA-3	ISRE (1)	PARP	XBP-1	CO2BRC (2)	HNF	LR-1	ME-Y (2)	SF-3	ZNF174	CEBP (4)	E2	HNF-8/HNF-1	MRE-1 (1)	PBGD BP	SPEM-1	ToxRE		
K	EGR (1)	ME-E2 (1)	SRE	ANG-IRE	Elk-1	GATA-4	ISRE (2)	PAX-2 (1)	XRE	Cdx-2	HIF	LxP (1)	HNF-1	SP-1/ASP	MAF	CEBP (5)	EBP-80	HNF-7/3	MRE-1 (2)	ME-Mip	PCF	SRE (2)	URE	
L	ERE (1)	MREB (1)	Stat-1	Arctox-ident RE	EVI-1	GATA-6	L-HI BP	PAX-3	ADR-1	CEA	HMG (2)	LxP (2)	p53 (3)	TCE	ABF-1	CBF	EGF BP	HNF-1 α/β/ε	MORP (1)	PEPCK PR	SSAP	v-rel 50-55k		
M	Ets (1)	OCT (1)	Stat-3 (1)	AP-3 (1)	FRHR (1)	GFP-1	KKLF	PAX-4	ATF-1	CPT/CTF/CTIF	HNF-1A (2)	LxP (3)	p55	SRE SAP	AGF	CBF (2)	EGF (2)	HNF-4a 2/1	MORP (2)	ME-E2 (2)	PO-B	Stat-1/3	WAP BP	
N	Ets/PEA3 (1)	p53 (1)	Stat-4 (1)	AP-4 (1)	FKHR (2)	HFH-1 (1)	MZF-3 (1)	PAX-6 (1)	ATF-3 (1)	CPE	HOXAC	MAZ	PEBP	TEEB	ACPB	ESR-2 c-EB-1	ESR-2 (1)	HOXA-4	MZF-2a	ME-E2/CP1	PROH-Bfgf	Stat-5b	XBP-1 (2)	
O	Foxo-1 (1)	PAX-5 (1)	Stat-5	Bate-RE	AlbA/Foxo4	HFH-2	MSP-1	PAX-8	ME/CBF	CREB-2	HOXD-8/9/10	PEBP-2 (1)	TELF	ALF-1	EL-1/2/3	EL-1/2/3	IL-6 RE-BP	Mb-1	MEB (2)	PROH-BE1	Stat-2 (2)	YB-1		
P																								



## ANEXO 2

### APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 21/11/07.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 606/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0446.0.146.000-07

#### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES RELACIONADOS À EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM PORTADORES DE PERSISTÊNCIA DE HEMOGLOBINA FETAL NÃO DELECIONAL TIPO BRASILEIRO”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Fernanda Marconi Roversi

**INSTITUIÇÃO:** Hemocentro

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 03/10/2007

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 23/10/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

#### II - OBJETIVOS

Investigar os mecanismos genéticos e moleculares relacionados ao aumento da síntese de hemoglobina fetal em portadores de Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal não delecional tipo Brasileira.

#### III - SUMÁRIO

Serão estudados 2 voluntários e 2 pacientes portadores de PHHF que serão selecionados entre doadores e pacientes, respectivamente, do Hemocentro. O único procedimento adicional será a coleta de 4 tubos de sangue.

#### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2.007.

  
**Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP



### ANEXO 3

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (resolução 196/96; 340/04; 347/05)

**Pesquisa: Estudo dos Mecanismos Moleculares relacionados à Expressão Diferencial em Portadores de Persistência Hereditária de Hemoglobina não deletional Tipo Brasileira**

**Pesquisadores:** Fernanda Marconi Roversi, Dr. Anderson Ferreira da Cunha, Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

**Local:** HEMOCENTRO / FCM - UNICAMP

A finalidade deste projeto é trazer informações para o paciente sobre o estudo “**Estudo dos Mecanismos Moleculares relacionados à Expressão Diferencial em portadores de Persistência Hereditária de Hemoglobina não deletional Tipo Brasileira**”. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que o paciente possa ter sobre este termo e sobre o estudo.

Algumas pessoas, depois de adultos, continuam tendo um tipo de hemoglobina que, normalmente, só é produzida até cerca do 6º mês de idade. Essa alteração não é uma doença e é conhecida como Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF). Entender o que acontece seria importante para algumas doenças. O presente projeto pretende estudar um tipo específico (não deletional, tipo Brasileira) de PHHF.

Para participar, caso você queira, deverá doar 2 frascos (4 colheres de sopa cada) de sangue. Essa coleta será feita por um profissional treinado e, no máximo, poderá ficar uma pequena mancha roxa e a região poderá ficar um pouco dolorida. Além disso, serão levantados alguns dados de seu prontuário médico. O material desse estudo, caso você permita, será armazenado no Hemocentro / Unicamp e somente será utilizado para outros estudos após nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Você terá direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo. Os resultados deste projeto poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

A participação neste estudo é voluntária e você pode se recusar a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem prejuízos, inclusive retirando o material biológico. Além disso, você terá direito a qualquer esclarecimento sobre o estudo mesmo durante o seu decorrer, ligando para o telefone do pesquisador.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro ter recebido todas as informações relativas ao estudo “Estudo dos Mecanismos Moleculares relacionados à Expressão Diferencial em Portadores de Persistência Hereditária de Hemoglobina não deletional Tipo Brasileira”. Autorizo a coleta de amostras de sangue periférico que serão utilizadas nesse estudo.

Outros pontos importantes foram enfatizados:

- 1- Ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento ou amostra biológica em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo.
- 2- Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.
- 3- Garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.
- 4- Quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou dos pesquisadores, posso contatar o CEP da FCM / UNICAMP.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe responsável, à manipulação dos dados e ao armazenamento de material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros depois de submetidos ao CEP e ao CONEP.

Consentimento para participação no estudo:      Autorização para armazenamento de material biológico:  
 Sim                                       Não

\_\_\_\_\_  
Voluntário/ Responsável

\_\_\_\_\_  
Voluntário/ Responsável

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

### **Consulta de questões éticas**

Pesquisador: Fernanda Marconi Roversi  
Endereço: Rua Carlos Chagas, 480  
Hemocentro / FCM / Unicamp  
13083-970 - Campinas - SP  
Telefone: (19) 3521-8661

Comitê de Ética em Pesquisa  
Endereço: Rua Tessália Viera de Camargo,  
126 - Caixa Postal 6111  
13084-971 - Campinas - SP  
Telefone: (19) 3521-8936  
cep@fcm.unicamp.br