

CAROLINA LANARO

**ANÁLISE DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS E SUA
ASSOCIAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE HEMOGLOBINA
FETAL NA ERITROPOESE *IN VITRO* DE CÉLULAS CD34⁺
DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

CAMPINAS

2007

CAROLINA LANARO

**ANÁLISE DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS E SUA
ASSOCIAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE HEMOGLOBINA
FETAL NA ERITROPOESE *IN VITRO* DE CÉLULAS CD34⁺
DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de
concentração em Medicina Experimental.*

ORIENTADOR: DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

2007

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L22a Lanaro, Carolina
Análise dos nucleotídeos cíclicos e sua associação com a produção de hemoglobina fetal na eritropoese *in vitro* de células CD34+ de pacientes com anemia falciforme / Carolina Lanaro. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme. 2. Óxido Nítrico. 3. Hemoglobina fetal. 4. Expressão gênica. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Analysis of cyclic nucleotides and their associations with the production of fetal hemoglobin in the *in vitro* erythropoiesis of CD34+ cells from patients with sickles cell disease”

Keywords: • Sickle Cell Disease

- Nitric oxide
- Fetal hemoglobin
- Gene expression

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora: Prof Dr Fernando Ferreira Costa

Prof Dr Antônio Fabron Junior

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Profa. Dra. Joyce Maria Annichinno-Bizzacchi

Data da defesa: 26-03-2007

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira da Costa

MEMBROS:

1- Prof. Dr. Fernando Ferreira da Costa

2- Prof. Dr. Antônio Fabron Junior

3- Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

4- Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

5- Profa. Dra. Joyce Maria Annichinno-Bizzacchi

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

Data: 26/03/2007

DEDICATÓRIA

*Aos meu pais, Lanaro e Sandra, pelo incentivo, apoio,
paciênciae amor incondicional.*

Aos meus irmãos, Dú e Rafa, pela amizade.

Meu amor e minha gratidão por todos vocês serão sempre eternos!!

À todos os meus amigos verdadeiros, pela ajuda e incentivo.

E à Deus e à Nossa Senhora Desatadora dos Nós!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa pelo apoio, paciência e confiança durante todos estes anos de trabalho. Obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos.

A Dra. Nicola Conran pelo incentivo, apoio, amizade, carinho. Nic, obrigada por tudo!!

À Carlinha, Letícia, Sheley e Marcos André, pela amizade verdadeira e por toda a ajuda durante a realização deste trabalho. Muito obrigada, mesmo!!!!

À Adriana, por ter me ensinado o que é cultura de células, pela amizade e carinho durante todos estes anos de convívio. Dri, valeu por tudo!! Obrigada de coração!!

À Lena, minha psicóloga, amiga e segunda mãe. Leninha, te adoro!!!

À Dul e ao Anderson pela colaboração, amizade e carinho. Obrigada por tudo que vocês me ensinaram!

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular; Mariana, Simone Sene, Simone (Katinha), Andréia, Renata, Camila Almeida, Babi, Gustavo, Helô, Flávia (Boca), Ângela, Ana Flávia, Regiane, Flávia Pinho, Maris, Rose, Lediana.

À Fernanda e ao Alan por toda a ajuda com as citometrias de fluxo.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

*“O que somos é um presente que a vida nos dá.
O que seremos é um presente que daremos à vida”*

(Herbert de Souza)

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxix</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxiii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	37
1.1- Histórico.....	39
1.2- Anemia falciforme.....	39
1.2.1- Fisiopatologia.....	39
1.2.2- Vaso-oclusão.....	42
1.3- Hemoglobina fetal.....	45
1.4- Hidroxiuréia.....	45
1.5- Óxido nítrico e anemia falciforme.....	46
1.6- Nucleotídeos cíclicos e regulação de γ-globina.....	51
2- OBJETIVOS.....	55
2.1- Objetivos gerais.....	57
2.2- Objetivos específicos.....	57
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	59
3.1- Pacientes e controles.....	61
3.2- Aspectos éticos da pesquisa.....	62
3.3- Cultura de células CD34⁺ hematopoéticas de sangue periférico.....	63
3.3.1- Separação de células mononucleares.....	63
3.3.2- Isolamento de células CD34 ⁺ de sangue periférico.....	63
3.3.3- Cultivo de células CD34 ⁺	64

3.3.4- Tratamento com BAY 41-2272.....	66
3.4- Citometria de fluxo.....	66
3.5- Extração de nucleotídeos cíclicos – GMPc e AMPc.....	68
3.6- Quantificação de GMPc e AMPc.....	68
3.7- Extração de RNA.....	69
3.8- Síntese de DNA complementar (cDNA).....	70
3.9- Verificação da síntese de DNA complementar.....	70
3.10- Desenho dos <i>Primers</i> para a reação do PCR quantitativo em tempo real.....	71
3.11- Padronizações necessárias para o PCR quantitativo em tempo real..	72
3.11.1- Concentração de <i>Primer</i>	72
3.11.2- Eficiência de reação.....	74
3.12- PCR quantitativo em tempo real.....	76
3.13- Análise dos dados do PCR em tempo real.....	78
3.14- Análise estatística.....	78
4- RESULTADOS.....	79
4.1- Padronização da cultura de células CD34⁺.....	81
4.1.1- Cultura de persistência hereditária de hemoglobina fetal.....	86
4.2- Caracterização da diferenciação eritróide na AF.....	87
4.2.1- Determinação da diferenciação eritróide.....	87
4.3- Comparação das expressões gênicas de gama Globina, GCs α e β subunidades, em diferentes etapas da diferenciação eritróide de cultura de Células CD34⁺ de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme.....	88

4.4- Níveis de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) durante a diferenciação eritróide de cultura de células CD34 ⁺ de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme.....	92
4.5- Comparação da expressão gênica de PDE-3B, eNOS, CD36, CD49d e CD29 em diferentes etapas da diferenciação eritróide de cultura de células CD34 ⁺ de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme.....	95
4.6- Comparação da expressão de gama globina, GCs alfa e beta subunidades em células CD34 ⁺ tratada com BAY 41-2272.....	101
5- DISCUSSÃO.....	105
6- CONCLUSÕES.....	113
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
8- ANEXOS.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme
ACD	Adenosina Citrato Dextrose
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Epo	Eritropoetina humana
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
Hb F	Hemoglobina fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb A	Hemoglobina adulta
HU	Hidroxiuréia
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
LY 83,583	6-(fenil amino)-5,8-quinolinediona; 6-anilino-5,8-quinolinediona
NO	Óxido nítrico

NS 2028	4H-8-bromo-1,2,4- oxadiazolo [3,4-d] benz [b] (1,4) oxazin-1-one
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE 3B	Fosfodiesterase 3B
PE	Ficoeritrina
RNA	Ácido ribonucleico
SCF	“stem cell factor” ou fator de célula tronco
GCs	Guanilato ciclase solúvel

	PÁG.
Tabela 1- Dados Hematológicos dos Pacientes com Anemia Falciforme e PHHF.....	62
Tabela 2- Seqüência e Tamanho dos Fragmentos Amplificados de Cada par de <i>primer</i> Utilizado na Amplificação dos Genes Estudados pela Técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real.....	73
Tabela 3- Concentrações de <i>primers</i> utilizadas na Amplificação dos Genes de Estudo e Eficiência de Amplificação Obtida. As Concentrações foram Definidas pela Eficiência de Amplificação Gerada nas Condições Testadas.....	74

	PÁG.
Figura 1- Fisiopatologia da anemia falciforme.....	41
Figura 2- Mecanismo de vaso-oclusão.....	44
Figura 3- Esquema guanilato ciclase solúvel.....	48
Figura 4- Seqüestro de NO pela hemoglobina livre da célula.....	50
Figura 5- Esquema de cultura de células CD34 ⁺ - fase I.....	65
Figura 6- Gel desnaturante de RNA.....	69
Figura 7- Gel de amplificação do gene da β -actina.....	71
Figura 8- Análise da eficiência de reação do PCR quantitativo em tempo real.....	75
Figura 9- Curva de dissociação da reação do PCR quantitativo em tempo real.....	77
Figura 10- Morfologia celular das células CD34 ⁺	82
Figura 11- Colônia de células CD34 ⁺	82
Figura 12- Proeritroblastos, coletados no 7º dia de cultura.....	83
Figura 13- Eritroblastos basofílico, coletados no 10º dia de cultura.....	84
Figura 14- Eritroblastos ortocromático: coletados no 13º dia de cultura.....	85
Figura 15- Expressão do gene gama globina – cultura persistência.....	86
Figura 16- <i>Dot plots</i> de citometria de fluxo.....	87
Figura 17- Expressão do gene gama globina-cultura falciforme.....	89
Figura 18- Expressão do gene GCs subunidade alfa-cultura falciforme.....	90
Figura 19- Expressão do gene GCs subunidade beta-cultura falciforme.....	91

Figura 20-	Determinação dos níveis de GMPc.....	93
Figura 21-	Determinação dos níveis de AMPc.....	94
Figura 22-	Expressão do gene PDE 3B.....	96
Figura 23-	Expressão do gene e NOS.....	97
Figura 24-	Expressão do gene CD36.....	98
Figura 25-	Expressão do gene CD49d.....	99
Figura 26-	Expressão do gene CD29.....	100
Figura 27-	Expressão do gene gama globina-cultura com BAY.....	102
Figura 28-	Expressão do gene GCs subunidade alfa-cultura com BAY.....	103
Figura 29-	Expressão do gene GCs subunidade beta-cultura com BAY.....	104

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é causada pela substituição de uma única base no códon 6 do gene da globina beta (GAG → GTG), levando à produção de hemoglobina S. Estudos recentes têm mostrado que a ativação de guanilato ciclase (GCs) em linhagens de células eritrocíticas e em cultura primária de precursores da série vermelha, causa um aumento na transcrição do gene gama globina e conseqüentemente aumento na produção de hemoglobina fetal (Hb F) (Ikuta et al., 2001). Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc são segundos mensageiros responsáveis por vários sinais extracelulares, incluindo hormônios e neurotransmissores e provavelmente têm papel importante na anemia falciforme regulando a produção de HbF. Este trabalho teve como objetivo, primeiramente, estabelecer um sistema de cultura de células CD 34⁺ e posteriormente investigar a existência de uma via NO-GMPc/AMPc envolvida na produção de Hb F nos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme e verificar se haveria aumento da expressão de GCs e de gama globina nestes mesmos pacientes. Amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis e pacientes com anemia falciforme. Foi utilizada cultura de células CD34⁺ hematopoéticas de sangue periférico, e ao longo da diferenciação eritróide (7º, 10º e 13º dia) foram coletadas células para citometria de fluxo, *citospin*, dosagem de GMPc e AMPc e avaliação da expressão gênica de gama globina, GCs alfa e beta subunidades, eNOS, PDE3B, CD36, CD29B e CD49. Observamos que gama globina encontra-se significativamente mais expressa nas culturas falciformes no 13º dia de diferenciação eritróide em relação ao mesmo ponto das culturas controle ($2,945 \pm 0,303$ x $1,445 \pm 0,165$, respectivamente, $p=0,0095$, $n=6$). A expressão de GCs alfa e beta subunidades, eNOS, PDE3B, CD36, CD29B e CD49 não apresentou diferenças significativas durante a diferenciação eritróide nas culturas falciformes e controles. Os níveis de GMPc nas culturas de pacientes com anemia falciforme estavam significativamente diminuídos ao longo da eritropoese *in vitro* em comparação com as culturas controles (dia 7: $0,2765 \pm 0,0527$ x $0,639 \pm 0,1221$ ($p=0,0260$); dia 10: $0,1166 \pm 0,0219$ x $0,268 \pm 0,1181$; dia 13: $0,037 \pm 0,0061$ x $0,093 \pm 0,0236$ ($p=0,0152$), respectivamente), enquanto o AMPc, encontrava-se elevado no dia 7 das culturas falciformes em relação às culturas controles (dia 7: $72,017 \pm 14,849$ x $24,987 \pm 13,497$ ($p=0,048$); dia 10: $36,3384 \pm 16,708$ x $8,663 \pm 4,591$; dia 13: $1,7138 \pm 1,093$ x $0,680 \pm 0,370$, respectivamente). O tratamento com BAY 41-2272 (ativador de GCs) em única cultura controle aumentou aproximadamente 3x os níveis de gama globina após 72 h

de incubação. Nossos resultados sugerem que as células tronco hematopoéticas dos pacientes com AF são diferentes às dos controles, uma vez que ambas, sob as mesmas condições *in vitro* expressaram níveis significativamente diferentes de gama globina. Um *cross talk* entre o GMPc e o AMPc poderia regular a expressão de gama globina ao longo da diferenciação eritróide. Estes dados resultam no primeiro trabalho a demonstrar a expressão basal de gama globina ao longo da diferenciação eritróide de pacientes com anemia falciforme. Desta maneira, o esclarecimento desta via pode contribuir com entendimento da fisiopatologia da anemia falciforme e identificar novos alvos para a regulação farmacológica de hemoglobina fetal.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is caused by the substitution of a single base in codon 6 of the beta globin gene (GAG → GTG), causing the production of S hemoglobin. Recent studies have demonstrated that the activation of soluble guanylate cyclase (sGC) in erythrocytic cell lines and in primary erythroid precursor culture causes an increase in the transcription of the gamma globin gene and, consequently, an augmented production of fetal hemoglobin (HbF) (Ikuta et al., 2001). The cyclic nucleotides, cAMP and cGMP, are second messengers that are responsible for mediating the signaling of various extracellular signals, including those of hormones and neurotransmitters and, probably, have an important role in SCD by regulating the production of HbF. This study aimed to investigate the existence of a NO-cAMP/cAMP pathway involved in the production of HbF in the erythroid cells of patients with SCD and to determine whether there is an increase in the expression of sGC and of gamma globin in these same patients. Blood samples were collected from healthy volunteers and SCD patients. Peripheral blood hematopoietic CD34+ cell culture was used for the investigation; cells were differentiated into erythroid lineage and cells collected (7th, 10th and 13th day) for flow cytometry, citospin, measurement of cGMP/cAMP and evaluation of the gene expression of gamma globin, the sGC alpha and beta subunits, eNOS, PDE3B, CD36, CD29B and CD49. We demonstrate that gamma globin was significantly more expressed in the cultures of SCD cells on the 13th day of erythroid differentiation compared to the same time point in control cells (2.95 ± 0.30 vs. 1.45 ± 0.17 , respectively, $p=0.0095$, $n=6$). The expression of sGC alpha and beta subunits, eNOS, PDE3B, CD36, CD29B and CD49 did not present significant differences during erythroid differentiation in control or SCD cell cultures. Levels of cGMP were significantly decreased during erythropoiesis in the SCD cultures compared to control cultures (day 7: 0.277 ± 0.053 vs. 0.639 ± 0.122 ($p=0.026$); day 10: 0.117 ± 0.022 vs. 0.268 ± 0.118 ; day 13: 0.037 ± 0.006 vs. 0.093 ± 0.024 ($p=0.015$), respectively). In contrast, levels of cAMP were significantly increased in the SCD cultures compared to the control cultures (day 7: 72.02 ± 14.85 vs. 24.99 ± 13.50 ($p=0.048$); day 10: 36.34 ± 16.71 vs. 8.66 ± 4.59 ; day 13: 1.74 ± 1.09 vs. 0.680 ± 0.370 , respectively). Treatment with BAY 41-2272 (sGC inducer) in a single control cell culture increased the levels of gamma globin by approximately 3 times after 72h of incubation. Results suggest that the hematopoietic stem cells of SCD patients are significantly and constitutively different to those of controls, since under the

same *in vitro* culture conditions, differentiation of the two cell types results in consistently significant different levels of gamma globin. A cross talk between cGMP and cAMP may regulate the expression of gamma globin during erythroid differentiation in patients with SCD. Thus, further investigation of this pathway may contribute to the understanding of the physiopathology of the disease and identify new targets for the pharmacological regulation of HbF production.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

Em 1910, Herrick descreveu eritrócitos “peculiarmente alongados e em forma de foice” no sangue de um indivíduo anêmico da raça negra, embora as manifestações clínicas da doença já fossem conhecidas séculos antes na África Ocidental. No Brasil, a primeira referência a um paciente com anemia falciforme (AF) se deve a Castro (1933). Pauling et al. (1949), demonstraram que a hemoglobina S (HbS) era quimicamente diferente da hemoglobina normal, devido a pontos isoelétricos diferentes e lenta migração eletroforética em consequência da ausência de duas cargas negativas na hemoglobina desses indivíduos que sofriam de anemia falciforme. Ingram (1956) demonstrou por análise de seqüências, que a substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia da globina β era a base bioquímica da HbS. Esse achado explicou, entre outras coisas, a diferença eletroforética entre as duas globinas (β^A e β^S) e foi a primeira demonstração de uma substituição de aminoácido em proteína humana. Perutz et al. (1960) decifram a estrutura da hemoglobina, esclarecendo as bases moleculares da sua função e Watson et al. (1948) observaram que os sintomas apareciam em crianças somente depois que a concentração de hemoglobina fetal (HbF) diminuía, estabelecendo um efeito benéfico da HbF nas manifestações dessa doença.

1.2- Anemia falciforme

1.2.1- Fisiopatologia

A anemia falciforme ocorre devido a uma alteração molecular no gene da globina beta. A mutação de ponto resulta na substituição de uma única base no códon 6 do gene da globina beta, onde uma adenina (A) é substituída por uma timina (T), levando conseqüentemente à substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina, com conseqüente produção de uma hemoglobina anômala - HbS (Serjeant & Serjeant, 2001; Steinberg et al., 2001).

O evento fundamental na patogenia da anemia falciforme é a polimerização da HbS. A polimerização da desoxi-HbS (única forma passível de se polimerizar) depende de alguns fatores, tais como: concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais (De Franceschi & Corroche, 2004; Stuart & Nagel, 2004; Costa, 2001). As consequências da polimerização são: deformação, enrijecimento e perda da flexibilidade das células vermelhas, o que resulta em anemia hemolítica, eventos vaso-oclusivos e asplenia funcional, causando um aumento na susceptibilidade a infecções (Kasschau et al., 1996; Fadlon et al., 1998; Rosse et al., 2000). O mecanismo descrito acima pode ser observado na figura 1.

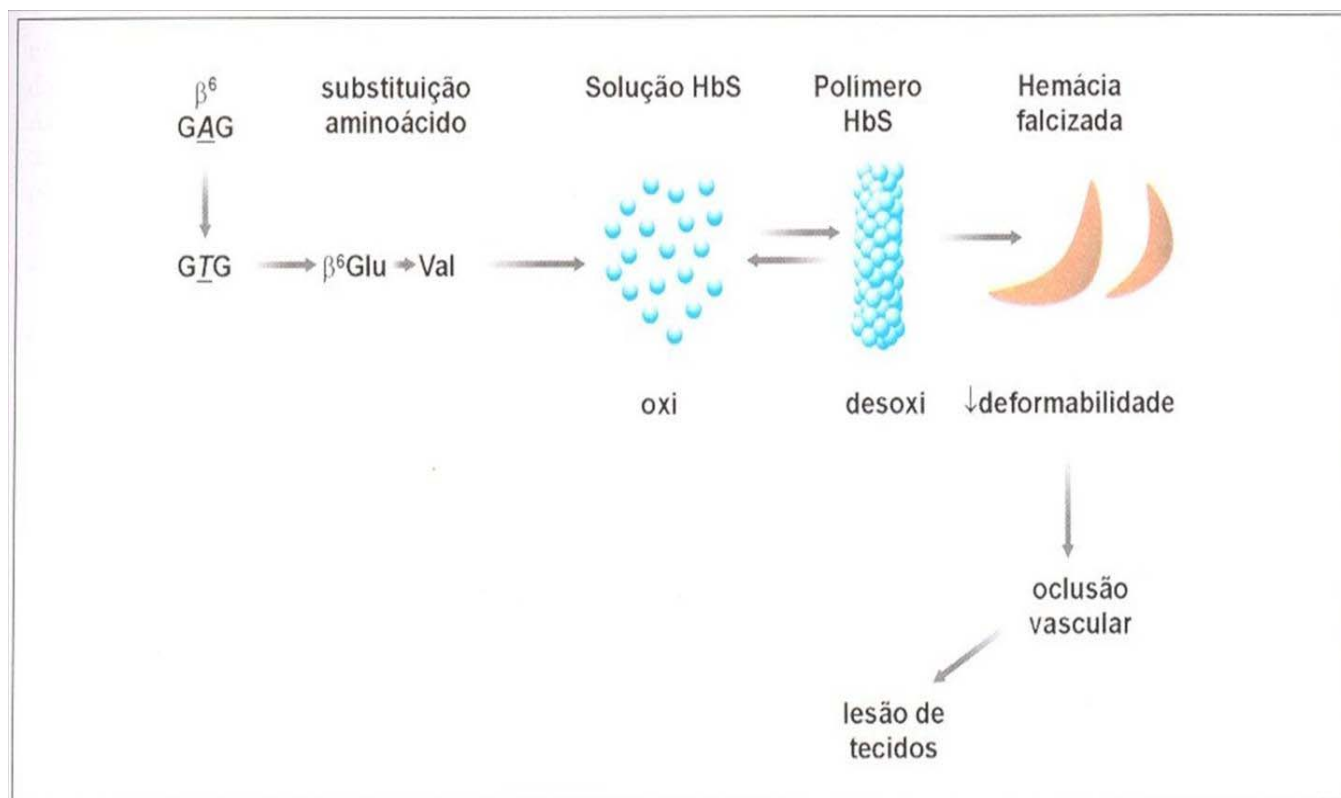


Figura 1- Fisiopatologia da anemia falciforme. A mutação no gene da globina β leva a formação da HbS que desoxigenada causa alterações celulares e manifestações clínicas (Adaptada de Costa *in* Zago, 2001).

1.2.2- Vaso-oclusão

A vaso oclusão é a maior causa de morbidade nos pacientes com anemia falciforme. Os fenômenos vaso-oclusivos acontecem principalmente em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento, a tensão de oxigênio é baixa, ou ainda, naqueles órgãos onde há um suprimento sanguíneo arterial terminal limitado. A hipóxia decorrente da obstrução vascular leva a infartos teciduais e proporciona crises de dor ou danos teciduais crônicos (Labie & Elion, 1999).

Participam dos eventos vaso-oclusivos uma complexa interação entre diferentes tipos celulares como: células falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, células endoteliais anormalmente ativadas, leucócitos, plaquetas e fatores do plasma (Ballas et al., 1992; De Franceschi & Corrocher, 2004). O processo de vaso-oclusão tem início a partir da ativação do endotélio vascular por espécies reativas de oxigênio, adesão de células irreversivelmente falcizadas e infecções que levam à secreção de citocinas inflamatórias. Estes fatores de ativação podem induzir a expressão de moléculas de adesão endotelial e promover o recrutamento de leucócitos; principalmente dos neutrófilos. Os neutrófilos tendem a se aderir ao endotélio e os eritrócitos falciformes a eles, devido à presença de citocinas inflamatórias como: TNF- α , IL-1, GM-CSF e endotelina 1, que contribuem para a ativação do endotélio e possibilitam a oclusão vascular (Frenette, 2002). Pacientes com AF apresentam níveis plasmáticos elevados de TNF- α em relação a indivíduos normais (Lanaro et al, 2006), favorecendo a adesão celular com conseqüente vaso-oclusão. Outras proteínas plasmáticas como a fibronectina, o fibrinogênio, fator de Von Willebrand e trombospondina estão relacionadas à indução da adesão das células falcizadas ao endotélio vascular (Kasschau et al., 1996).

Gambero et al., 2007 demonstraram que reticulócitos de pacientes com anemia falciforme apresentam níveis aumentados de RNAm das moléculas de adesão CD36, CD49d e CD29 quando comparados com reticulócitos de indivíduos normais. Além disso, a expressão protéica dessas moléculas de adesão na superfície da membrana plasmática de reticulócitos de pacientes com anemia falciforme encontra-se também aumentada. Estas três moléculas de adesão estudadas por Gambero et al., 2007 são as principais moléculas envolvidas com o processo de vaso oclusão.

Além das hemácias há evidências para um importante papel dos neutrófilos na vaso-oclusão (Costa, 2001). Neutrófilos de pacientes com anemia falciforme demonstraram adesão aumentada para fibronectina e endotelina (Kasschau et al. 1996; Fadlon et al., 1998; Assis et al., 2005). A contagem de neutrófilos no sangue periférico tem relação direta com a gravidade da doença e a leucocitose é associada com alto relato de mortalidade (Platt et al., 1994; Anyaegber et al., 1998; Manadori et al., 2000; Okpala et al., 2002). Sabe-se que além dos neutrófilos, os eosinófilos possivelmente têm participação nesse mecanismo. Canalli et al. (2004) demonstraram que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme são numericamente maiores e apresentam propriedades adesivas aumentadas.

O mecanismo de vaso-oclusão pode ser observado na Figura 2, mas além das células vermelhas, os neutrófilos e as plaquetas parecem ter um papel importante neste mecanismo.

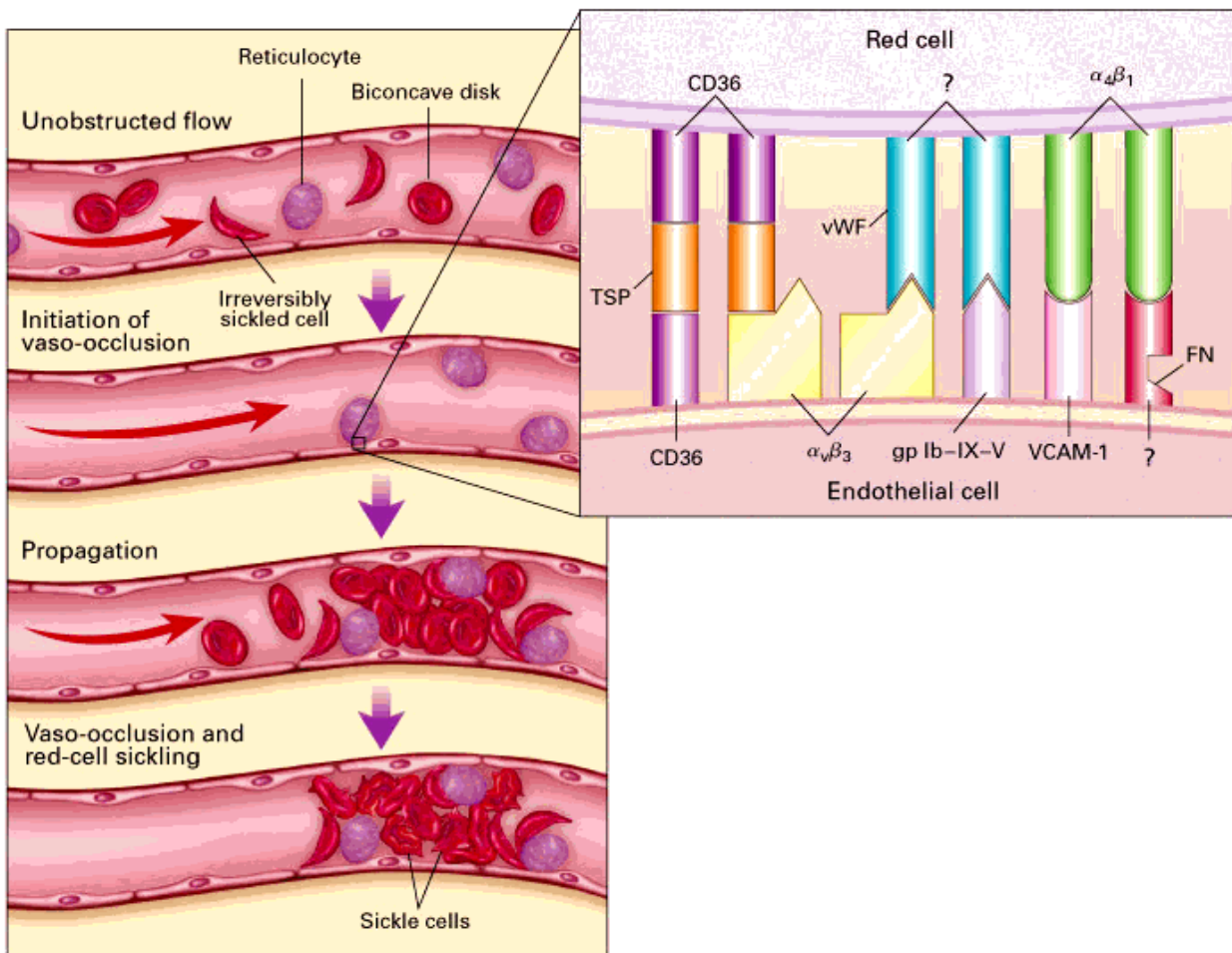


Figura 2- *Mecanismo de vaso-oclusão.* Hemácias e reticulócitos aderem ao endotélio vascular devido à presença de moléculas de adesão na superfície das células vermelhas e endotélio impedindo o fluxo sanguíneo (Hebbel et al., 2000).

1.3- Hemoglobina fetal

A hemoglobina fetal inibe a polimerização da HbS. Os níveis de HbF nos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme são geralmente elevados, porém, quando esse aumento é significativo ocorre melhora no quadro clínico da doença (Rosse et al., 2000). A HbF é composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama globínicas, cuja interação com outros elementos da hemácia confere a essa hemoglobina menor afinidade pelo oxigênio do que a hemoglobina A (Ramalho, 1986). A cadeia gama é produzida em altos níveis nas células da linhagem eritróide durante a fase fetal e depois do nascimento há o “switching” (substituição) para a cadeia beta, que formará a hemoglobina A. No recém nascido portador da doença falciforme, a HbF é substituída pela HbS por volta dos 6 meses de idade, período em que se observam as manifestações clínicas da doença. Em adultos normais, há resquícios da produção de HbF, correspondendo a menos de 1% do total de hemoglobina. No entanto, doenças que determinam um estresse da eritropoese, em particular as anemias hemolíticas, tendem a manter os níveis de HbF ligeiramente mais elevados (Zago, 2004). Portanto, há investigações que têm se concentrado na procura por agentes com a capacidade de reverter esse efeito “gene switching” para aumentar os níveis de Hb F nas hemácias.

1.4- Hidroxiuréia

A hidroxiuréia (HU) é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de pacientes com anemia falciforme por diminuir as crises vaso-oclusivas e as necessidades de transfusões (Charache et al., 1995; Nahavandi et al., 2002). Há evidências que o mecanismo pelo qual a HU induz o aumento de HbF e reduz a contagem de células brancas, é mediado pela inativação de um radical tirosil na ribonuclease reductase (Lassmann et al., 1992; Yarbrow et al., 1992), um efeito que poderia ser mediado por NO (Kwon et al., 1991; Lepoivre et al., 1994) e nitrovasodilatadores (Bundy et al., 1999). Tratamentos longos com HU levam a uma diminuição global das proteínas de superfície dos neutrófilos, monócitos e linfócitos (Okpala, 2006), reduzindo também a contagem de neutrófilos. Altos níveis de

células brancas são um indicativo dos eventos adversos em pacientes com anemia falciforme (Castro et al., 1994).

A HU é responsável por aumentar os níveis de HbF, alterando a cinética e a termodinâmica da polimerização da HbS (Cokic et al., 2003; Nahavandi et al., 2002). No entanto, a habilidade da HU em aumentar os níveis de HbF varia entre os pacientes. Muitos deles apresentam melhora clínica antes de apresentar aumento significativo dos níveis de HbF, sugerindo que a HU possa beneficiar pacientes por outros mecanismos que podem incluir: alterações nas células vermelhas e brancas, células endoteliais, mielossupressão, entre outras (Halsey et al., 2003; King, 2004).

Rodriguez et al. (1998) relataram que a farmacodinâmica da HU possibilita que ela seja uma doadora de NO e também uma estimuladora da produção de NO devido ao tempo de meia vida de 6 horas. Morris et al. (2001) sugeriram que a HU possa ser oxidada pelo grupo heme e produzir radicais livres da molécula de NO *in vitro*. Gladwin et al. (2002) relataram que a terapia com HU promove a geração intravascular e intraeritrocitária de NO e é esse aumento o responsável por aumentar os níveis de HbF. Cokic et al. (2003) mostraram que outros dois doadores de NO aumentam a expressão do gene da gama globina em progenitores eritróides. E isto está associado ao aumento dos níveis de GMPc, sugerindo a presença de uma via mediada por NO na indução do gene da gama globina, com conseqüente aumento na síntese de HbF.

1.5- Óxido nítrico e anemia falciforme

O óxido nítrico (NO) é um gás sinalizador com tempo de meia vida de segundos. É sintetizado no endotélio a partir de um aminoácido – a L-arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Palmer et al., 1988). Fisiologicamente o NO produzido no endotélio tem efeito vasodilatador, mantendo o fluxo sanguíneo normal (Rubanyi et al., 1986). Além disso, ele inibe agregação plaquetária, é capaz de modular a permeabilidade vascular e em condições patológicas protege contra lesão tecidual (Moncada et al., 1986; Chin et al., 1992;

Sun et al., 1993; Yue et al., 1993). Também é capaz de inibir adesão leucocitária, modular a respiração e exercer atividade anti-oxidante e anti-inflamatória (Conran et al., 2001).

O NO formado no endotélio pela ação da enzima eNOS é liberado para as células da musculatura lisa, onde se liga ao heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), resultando no aumento intracelular de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Ignarro et al., 1987; Lohse et al., 1998; Murad, 1999). O GMPc, um segundo mensageiro, ativa as vias de kinases dependentes em GMPc (PKG), diminuindo a concentração de cálcio intracelular nos músculos lisos, produzindo relaxamento, vasodilatação e aumento regional do fluxo sanguíneo (Mack et al., 2006). Há evidências que as células vermelhas humanas expressam a enzima eNOS de forma ativa e funcional, localizada na membrana plasmática e no citoplasma destas células. Esta eNOS é regulada por seu substrato, a L-arginina e a sua atividade regula a deformabilidade da membrana dos eritrócitos e inibe a ativação plaquetária (Kleinbongard et al., 2006).

A guanilato ciclase solúvel é uma enzima heterodímera formada por duas subunidades; α e β . O NO, ao se ligar ao grupo heme (localizado na região N-terminal da subunidade α), induz mudança na conformação da enzima, aumentando cerca de 400x sua atividade catalítica (Humbert et al., 1990; Stone & Marletta, 1994). Esse efeito é responsável pela conversão catalítica de guanosina trifosfato (GTP) em GMPc, o qual é um segundo mensageiro importante para a regulação de proteínas kinases, fosfodiesterases e canais iônicos (Schmidt et al., 1993; Lincoln et al., 1996). A subunidade alfa tem papel importante na modulação da função de GCs (Yuen et al., 1994) bem como GMPc (Ikuta et al., 2001). Já a presença do grupamento heme faz com que vários agentes, particularmente o NO, possam atuar sobre GCs levando a produção de GMPc (Denninger et al., 1999). A estrutura da enzima GCs pode ser observada na figura 3.

Guanilato ciclase solúvel

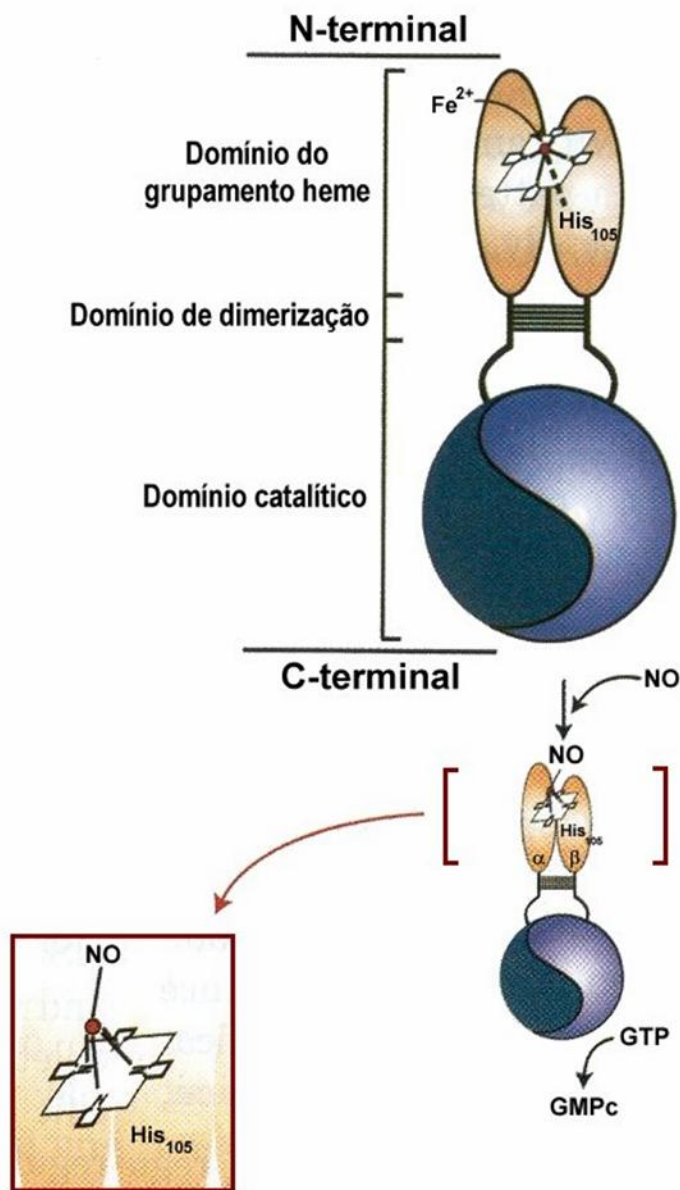


Figura 3- Representação esquemática da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs).

O NO tem papel importante na fisiopatologia da anemia falciforme (Mosseri et al., 1993; Gladwin & Schechter, 2001) e no tratamento das crises vaso-oclusivas (Lopez et al., 2003). Gladwin et al. (2001) sugeriram que uma deficiência na produção de NO possa acontecer nas células endoteliais de pacientes com anemia falciforme. Reiter et al. (2002) evidenciaram que a hemoglobina livre da célula decorrente do processo de hemólise intravascular limita a biodisponibilidade do NO na AF. Três possíveis mecanismos levam à diminuição da biodisponibilidade do NO plasmático em pacientes com anemia falciforme (Mack et al., 2006) são eles:

- a diminuição nos níveis plasmáticos de L-arginina, devido ao aumento de arginases (degradam arginina em ornitina) circulantes;
- seqüestro do NO pela hemoglobina livre no plasma, decorrente do processo de hemólise intravascular freqüente nessa doença;
- interação com espécies reativas de oxigênio, principalmente ânion superóxido.

A inalação de NO pode minimizar esta situação por oxidar a oxi hemoglobina livre da célula na circulação pulmonar e formar metahemoglobina. Com isso a produção endógena de NO fica “livre” para se difundir pela musculatura lisa, regular o tônus vascular e regular a expressão de moléculas de adesão. Este efeito pode ser observado na figura 4.

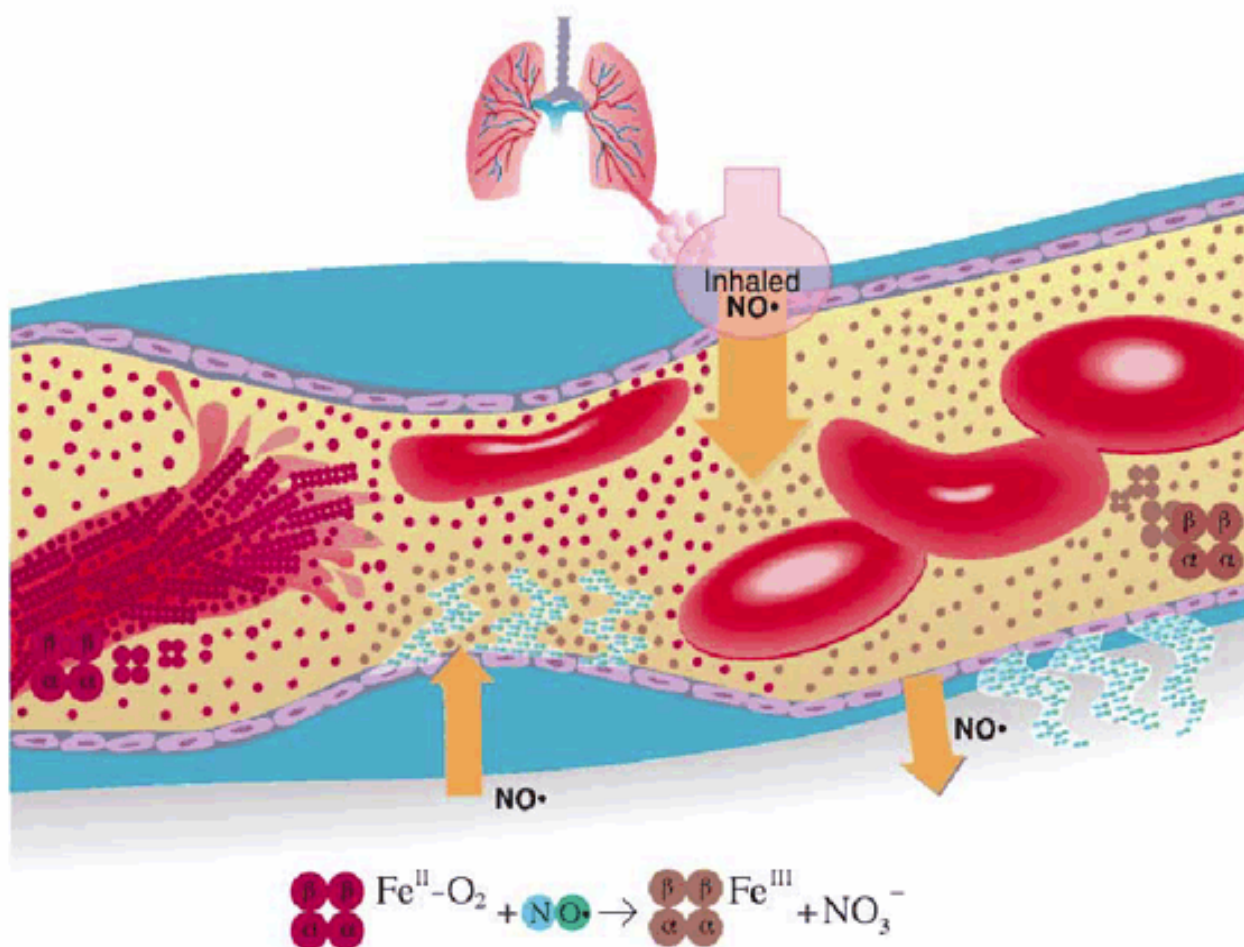


Figura 4- *Seqüestro de NO pela hemoglobina livre da célula.* A inalação de NO reverte o seqüestro do NO endógeno fazendo com que este possa atuar na musculatura lisa, regulação do tônus vascular e expressão de moléculas de adesão (Figura retirada de Reiter et al., 2002).

Progenitores eritróides tratados com HU (hidroxiuréia) apresentaram aumento dos níveis de GMPc associado ao aumento de expressão de γ -globina com conseqüente aumento nos níveis de HbF e GMPc. Adicionalmente, estas mesmas células quando submetidas ao tratamento com inibidores de GCs (ODQ, NS 2028, LY 83,538) apresentaram diminuição dos níveis de expressão de γ -globina. Estes resultados sugerem que a indução de HbF pela HU seja mediada pelo NO, dependente da ativação de GCs. Portanto, na célula eritróide, o NO ativa GCs que aumenta os níveis de GMPc e kinases dependentes em GMPc (PKG), o qual é responsável pela expressão de gama globina e consequentemente pela produção de hemoglobina fetal (Cokic tal., 2003).

O NO pode ter inúmeros efeitos benéficos para os pacientes durante as crises vaso-oclusivas (Lopez et al., 1996), podendo reduzir a adesão de hemácias ao endotélio em culturas de células endoteliais tratadas com doadores de NO (Space et al., 2000). Alguns autores têm sugerido que a terapia com NO ou L-arginina poderia beneficiar os pacientes com anemia falciforme (Gladwin & Schechter, 2001; Morris et al., 2000).

1.6- Nucleotídeos cíclicos e a regulação de expressão de γ -globina

Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc são segundos mensageiros responsáveis por vários sinais extracelulares, incluindo hormônios e neurotransmissores. Estes nucleotídeos cíclicos são formados a partir do ATP e GTP pela reação catalítica da adenilato ciclase e guanilato ciclase, respectivamente. Com o aumento das concentrações intracelulares destes nucleotídeos cíclicos, eles podem se ligar e ativar enzimas alvo; proteína kinase A (PKA) e proteína kinase G (PKG). Estas proteínas kinases fosforilam substratos como canais iônicos, fatores de transcrição os quais regulam funções celulares. A fosforilação altera a atividade destes substratos e como conseqüência há mudanças na atividade celular (Jeon et al., 2005). Como descrito anteriormente, o NO exerce alguns efeitos biológicos pela ativação de GCs com crescente aumento na síntese de GMPc (Murad, 1999).

Conran et al. (2004) evidenciaram que hemácias de pacientes com anemia falciforme apresentam níveis de GMPc elevados em relação a hemácias de indivíduos normais e esses níveis estão significativamente mais elevados em pacientes que fazem uso de HU. Este aumento nos níveis de GMPc nos eritrócitos de pacientes com AF pode ser devido ao aumento da atividade da enzima GCs nos eritrócitos maduros e nas células eritróides imaturas destes pacientes. Dando suporte a essa teoria, foi demonstrado que a via dependente de GMPc constitui um mecanismo de regulação gênica de γ -globina em células da linhagem eritróide (Ikuta et al., 2001).

Alguns estudos sugerem que a HU induz a produção de HbF em células da linhagem eritróide pela ativação de GCs via NO (Cokic et al., 2003). Nahavandi et al. (2002) demonstraram um aumento significativo nos níveis de GMPc plasmático em pacientes com AF em terapia de HU, somente durante as crises vaso-oclusivas, sugerindo um possível papel da via NO/GMPc.

A via dependente de GMPc tem demonstrado um *cross talk* com a via dependente de AMPc em vários tipos celulares. GMPc é capaz de inibir a atividade da enzima fosfodiesterase 3 (PDE 3B), responsável pela degradação de AMPc, resultando em um aumento intracelular de AMPc, com conseqüente ativação da via proteína kinase A (Inoue et al., 2004). As fosfodiesterases (PDEs) são uma super família de enzimas que degradam AMPc e GMPc (Beavo, 1995; Corbin & Francis, 1999; Soderling & Beavo, 2000). Até o momento há 11 famílias de PDEs identificadas, muitas das quais existem como *splice* variante (Beavo et al., 1994; Bolger, 1994). As enzimas específicas para degradação de AMPc são PDE 4, 7 e 8. As responsáveis pela degradação de GMPc incluem 5, 6 e 9. Por outro lado, as PDEs 1, 2, 3, 10 e 11 degradam ambos os nucleotídeos (Mehatas et al., 2002). As PDEs participam de processos farmacológicos, modulando a produção de mediadores pró-inflamatórios, apoptose, lipogênese, glicogenólise e gliconeogênese (Perry & Higgs, 1998). Devido a regulação dos nucleotídeos cíclicos, os quais são responsáveis por diversas funções fisiológicas, as PDEs têm sido alvo de alguns compostos farmacêuticos para o tratamento de várias doenças como: falência cardíaca, depressão, asma, inflamação e disfunção erétil (Conti et al., 1995; Torphy, 1998; Mehats et al., 2002; Rotella, 2002).

Existem duas isoformas da PDE 3; PDE 3A e PDE 3B. Inoue et al (2004) demonstraram que a PDE 3B é expressa em altos níveis em células K562, sugerindo a possibilidade de um *cross talk* entre GMPc e AMPc. Eritroblastos primários tratados com agentes indutores de HbF como: hemina, butirato e HU (todos ativadores de GCs) apresentaram níveis aumentados de GMPc. Este aumento dos níveis de GMPc foi capaz de inibir a ação da PDE 3B, favorecendo o acúmulo intracelular de AMPc com conseqüente ativação da via PKA, regulando negativamente a expressão gênica de gama globina. Em resumo, o aumento dos níveis de GMPc via GCs leva à ativação da via PKG com conseqüente ativação da expressão de gama globina (regulação positiva), por outro lado, o aumento de GMPc inibe PDE 3B favorecendo o acúmulo intracelular de AMPc com conseqüente ativação da via PKA, inibindo a expressão de gama globina (regulação negativa). Estes dados sugerem diferentes efeitos que podem ser ocasionados pelas vias dependentes de AMPc ou GMPc na expressão de gama globina.

Considerando o amplo envolvimento dos nucleotídeos cíclicos na anemia falciforme estabelecemos um sistema de cultura como modelo para estudar e comparar várias etapas da diferenciação eritróide de células provenientes de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme. Utilizando esse método pudemos avaliar a expressão gênica de gama globina durante a diferenciação eritróide, investigar o papel dos nucleotídeos cíclicos e também estudar a expressão de algumas moléculas de adesão eritróides importantes na fisiopatologia da AF durante a diferenciação celular.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais

Comparar o perfil das expressões de GCs e gama globina e a produção de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) durante as diferentes etapas de diferenciação das células eritróides de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais em cultura de células CD 34⁺.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Estabelecer o sistema de cultura de células CD 34⁺ diferenciando-as para a linhagem eritróide.
- 2- Avaliar e comparar os níveis de AMPc e GMPc nos progenitores eritróides durante a diferenciação celular em sistema de cultura *in vitro* de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme.
- 3- Avaliar e comparar a expressão do RNAm de GCs alfa e beta subunidades nas diferentes etapas da diferenciação eritróide de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme.
- 4- Avaliar e comparar a expressão gênica de gama globina durante a diferenciação eritróide de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme.
- 5- Avaliar e comparar a expressão gênica de PDE 3B, eNOS, CD 36, CD49d e CD29 durante a diferenciação eritróide de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Pacientes e controles

Para o estudo realizado foram selecionados pacientes com anemia falciforme (SS) diagnosticados no Hemocentro da UNICAMP, através de eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Estes pacientes apresentavam idade entre 18-50 anos, encontravam-se em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatório, sem transfusão sanguínea por pelo menos três meses e sem crises de dor por este mesmo período e sem terapia com hidroxiuréia. As amostras de indivíduos controles consistiram de voluntários sadios com idade de 18-50anos que tiveram a amostra submetida à HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) para confirmação da normalidade do padrão eletroforético. Todos os participantes deste estudo leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram realizadas 6 culturas de pacientes com AF e 6 culturas controle. Os controles utilizados neste estudo apresentaram média de HbF de 0,6% (0,2-1,6%; n=6). Os valores hematimétricos dos controles encontram-se dentro da normalidade.

As amostras de sangue (36 mL) de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controles foram coletadas em tubo de heparina lítica e processadas imediatamente para o cultivo de células.

Para validação do sistema de cultura *in vitro* utilizamos sangue periférico de um paciente com PHHF- tipo 2 (Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal) (Tabela1), que possui uma deleção de mais ou menos 100kb a partir da região do gene pseudo-beta.

Tabela 1- Dados hematológicos dos pacientes com anemia falciforme e PHHF que participaram do estudo. Os valores estão expressos como média, menor e maior valor.

	<i>Pacientes com Anemia Falciforme (n=6)</i>	<i>Paciente com Persistência Hereditária de HbF</i>
Homem/Mulher	3/3	----
Idade (anos)	41,5 (32-47)	28
Hemácias (x10⁶µl)	2,24 (1,38-2,87)	5,32
Hematócrito (%)	20,8 (13,4-26,8)	46,8
Hemoglobina (g/dl)	6,95 (4,4-9,0)	15,1
Volume corpuscular médio (fl)	93,45 (84,9-102,5)	88,1
Hb Fetal (%)	6,93 (1,9-11,9)	28,2%

3.2- Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CEP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Aprovação pelo CEP em 15 de Julho de 2003 durante a VII Reunião Ordinária de CEP/FCM (registro CEP: 219/2003). Aprovação pelo CONEP em 17 de Novembro de 2003 (registro CONEP: 7988/2003, processo n° 25000.072114/2003-33), segundo as atribuições do Conselho Nacional de Saúde.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) deste estudo foi aprovado pelos conselhos citados e todos os participantes deste estudo o assinaram.

Os TCLE encontram-se na parte final, no capítulo de anexos.

3.3- Cultura de células CD 34⁺ hematopoéticas de sangue periférico

3.3.1- Separação de células mononucleares

Amostras de sangue periférico de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais foram coletadas em tubo contendo heparina lítica e processadas imediatamente após a coleta. As amostras foram diluídas 1:2 em solução de PBS+ACD+BSA e em seguida colocadas em gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppala Sweden) por 30 minutos à 317g em temperatura ambiente. A camada formada na interface (*buffy coat*) foi coletada e as células lavadas em PBS+ACD+BSA. Em seguida, as células foram lisadas em tampão de lise para hemácias por 15 minutos em gelo e centrifugadas por 5 minutos a 361g. Novamente as células foram lavadas em PBS e ressuspensas para contagem em câmara de Neubauer.

3.3.2- Isolamento de células CD 34⁺ de sangue periférico

Após a contagem das células, estas foram incubadas com *FcR Blocking Reagent* e *Hapten-Antibody* por 15 minutos e após lavagem, incubadas com *Anti-Hapten MicroBeads*, segundo as orientações do fabricante (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Após o tempo de incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e passadas por uma coluna magnética LS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) fixada em um suporte magnético. As células de interesse para o nosso estudo ficaram presas à coluna enquanto as contaminantes (monócitos e linfócitos) foram coletadas em tubo falcon. Em seguida, a coluna foi retirada do suporte magnético e uma leve pressão foi realizada através de um êmbolo para fazer com que as células CD 34⁺ se soltassem da coluna e pudessem ser coletadas em um novo tubo. As células CD 34⁺ foram então lavadas com PBS+ACD+BSA por 10 minutos a 203g e ressuspensas em 1mL de PBS+ACD+BSA para contagem em câmara de Neubauer. 1.10^4 células CD 34⁺ de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle foram marcadas com fluoróforo RPE (*anti-mouse immunoglobulins RPE, Rabbit F (ab') 2*) para citometria de fluxo, para verificar a pureza das células obtidas. Lâminas de *cytospin* coradas com Leishman foram

preparadas para verificação da morfologia celular. A viabilidade celular foi analisada por meio da técnica de azul de trypan, sendo superior a 98% em todos os pontos coletados neste trabalho.

3.3.3- Cultivo das células CD 34⁺

As células CD 34⁺ foram cultivadas em metil celulose Methocult™ H-4230 (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, British Columbia, Canadá). Para cada um mL de metil celulose foram cultivadas 3.10^3 células CD 34⁺, acrescidas de 50 ng de *Stem cell factor* (SCF; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), três unidades de Eritropoetina (Epo; Vetter Pharma Fertigung GmbH, Ravensburg, Alemanha) e 30 UI de interleucina 3 (IL-3; Pepro Tech México, S.A. de C.V.). A metil celulose foi pipetada em placa de 6 poços na concentração de um mL por poço em atmosfera úmida no interior da placa. A placa foi incubada por sete dias em estufa de CO₂ - 5%, a 37°C (Fase I). Após sete dias as colônias formadas por unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) e proeritroblastos foram coletadas, lavadas, ressuspensas em meio Minimum Essential Medium Alpha (Alpha MEM; GIBCO™ Grand Island, N.Y., USA) e contadas em câmara de Neubauer. Nesse momento, foram coletadas células para extração de RNA total e GMPc, citometria de fluxo e citospin. O restante das células foi colocado novamente em cultivo, agora em fase líquida, tendo como base o meio Alpha MEM (Fase II). Na Fase II utilizamos 30% de soro fetal bovino (SFB), 8% de albumina sérica bovina (BSA), 300 mg/mL de holotransferrina humana (Calbiochem, USA), 10^{-5} M de β – mercaptoetanol (Sigma Chemical CO, St. Louis, USA) e 2 unidades de Epo. As células foram cultivadas novamente em 5% CO₂ a 37°C (Croisille et al., 1999).

Além do dia 7, foram coletadas células no dia 10 e 13 da fase II para extração de RNA total, AMPc e GMPc. A diferenciação eritróide foi acompanhada por citometria de fluxo e a morfologia por *citospin* corado com Leishman. A viabilidade celular da fase I e II foi analisada por meio da técnica de azul de trypan.

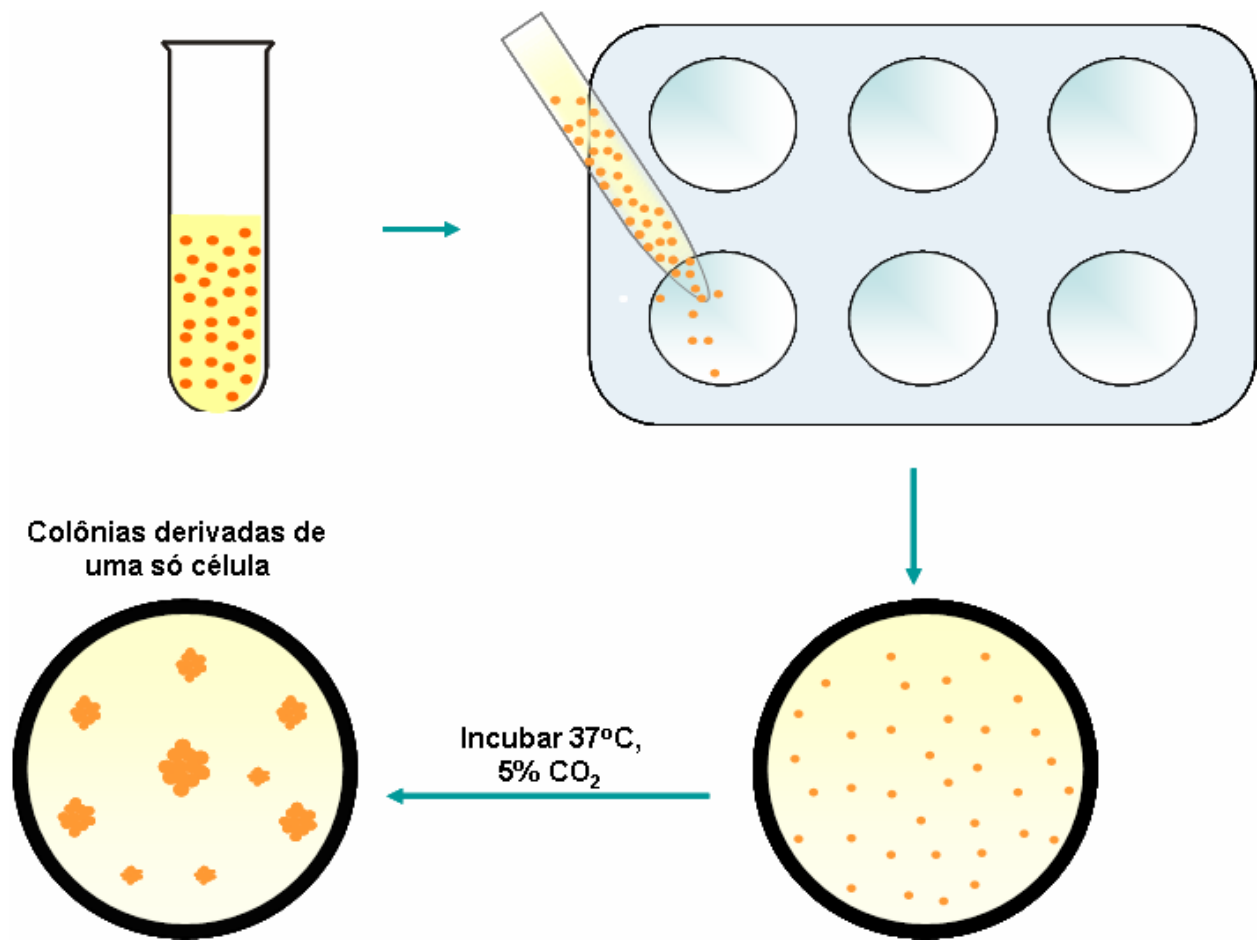


Figura 5- Representação esquemática da cultura de células CD34⁺ - Fase I.

As culturas foram realizadas sempre em conjunto, ou seja, para cada cultura de paciente com anemia falciforme foi realizado um controle em paralelo. Cada cultura realizada utilizou sangue periférico de um único indivíduo com anemia falciforme e um único doador.

3.3.4- Tratamento com Bay 41-2272

Este composto é um derivado pirazolopiridínico, o qual é capaz de estimular GCs independente de NO, resultando em vasodilatação e atividade anti-plaquetária.

O Bay 41-2272 se liga às cisteínas 238 e 243 da subunidade α_1 de GCs, induzindo a conversão de GTP em GMPc. GMPc por sua vez, como segundo mensageiro, é capaz de causar uma série de efeitos biológicos. Quando em associação com o NO, este composto apresenta sinergismo, porém quando há remoção ou oxidação do grupo prostético heme de GCs ocorre perda da ativação sobre esta enzima (Becker et al., 2001, Evgenov et al, 2006).

Uma única cultura foi tratada com 60nM deste composto, a adição dele foi feita a uma parte das células eritróides no dia 7 de cultivo e as células coletadas no dia 10 e 13. O restante das células seguiu a diferenciação somente com a adição do diluente do Bay; DMSO.

3.4- Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, com um anticorpo marcado com um fluorocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocianato (FITC). Estes fluorocromos ao serem estimulados por um feixe de laser emitem um fóton que é captado por sensores no aparelho. O citômetro de fluxo faz análises qualitativas (quantas células expressam este produto) e quantitativas (quanto de certo produto é expresso por célula) da mesma amostra (Owens et al., 1995).

O processo de diferenciação eritróide foi acompanhado através da técnica de citometria de fluxo utilizando os seguintes anticorpos (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) de superfície celular:

- Anti-receptor de Transferrina (conjugado com FITC) (CD 71): marcador de células eritróides jovens;
- Anti-Glicoforina A (conjugado com PE): marcador de células eritróides maduras.

Como controle negativo, utilizamos um isotipo controle não relacionado (Ig G; Caltag Laboratories, Burlingame, CA).

Utilizamos um anticorpo de marcação citoplasmática: Anti – Hemoglobina fetal (conjugado com FITC) para acompanhar a produção de hemoglobina fetal durante o processo de diferenciação celular. Antes da marcação com o anticorpo anti-Hemoglobina fetal foi realizada a permeabilização das membranas citoplasmáticas das células eritróides com o Kit Fix & Perm (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) e em seguida a marcação com o anticorpo.

Outros anticorpos de marcação de superfície celular (Dako Cytomation Denmark A/S, Denmark) foram utilizados para verificar a presença de contaminação por outras linhagens celulares (mielóide e linfóide) durante a diferenciação celular, são eles:

- Anti-CD 3: anti-linfócito T (Clone UCHT1);
- Anti-CD 19: anti-linfócito B (Clone HD37);
- Anti-CD 14: anti-precursor de monócito (Clone TUK4);
- Anti-CD 15: anti-precursor de granulócito (Clone C3D-1).

Para todos os anticorpos de superfície celular citados anteriormente a concentração de células utilizadas variou de 1.10^4 a 1.10^5 células por tubo num volume final de 100 μ l em PBS. As células foram então incubadas com 3-5 μ l dos anticorpos por 30

minutos a 4°C, na ausência de luz. Em seguida, estas foram lavadas com 500 µl de PBS, centrifugadas a 203g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 500 µl de PBS. As células foram conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição pelo citômetro. Já as células marcadas com anticorpo anti-hemoglobina fetal, tiveram primeiramente suas membranas fixadas por 15 minutos pela Solução A e após lavagem com PBS, foi adicionado a Solução B para permeabilização das mesmas. Depois disso, o anticorpo foi adicionado num volume de 3 µl, incubado por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz. As células foram lavadas com PBS e o pellet ressuspensionado em 500 µl. As células foram conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição pelo citômetro.

As células foram analisadas a 488 nm em um FACScalibur Becton-Dickinson. *Dot plots* foram utilizados para análise dos dados obtidos. A intensidade da fluorescência de cada célula foi comparada com as células incubadas com um controle isotipo (Ig G).

3.5- Extração de nucleotídeos cíclicos - GMPc e AMPc

Células coletadas foram lavadas e incubadas com 1mmol/L de 3-isobutil-1-metil xantina (IBMX) por 30 minutos a temperatura ambiente para impedir a degradação dos nucleotídeos cíclicos pelas fosfodiesterases. Em seguida foi adicionado ácido perclórico para concentração final de 0,5 mol/L e as amostras foram centrifugadas 6000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e teve seu pH neutralizado com a adição de solução 8 mol/L de KOH. As amostras foram estocadas a - 80°C até o ensaio.

3.6- Quantificação de GMPc e AMPc

As amostras de nucleotídeos cíclicos foram acetiladas e aplicadas em Kit comercial (Cayman Laboratories, Ann Arbor, MI, USA) para quantificação de GMPc e AMPc por meio da técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Os resultados foram expressos em pmol/mL em $5 \cdot 10^6$ células.

3.7- Extração de RNA

As amostras de RNA foram extraídas com Kit comercial – Rneasy Mini e Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden) segundo as instruções do fabricante. Optamos pelo uso do Kit, uma vez que a quantidade de células disponíveis não era abundante. Além disso, a pureza e a qualidade do RNA eram fundamentais para o sucesso da transcrição destas amostras.

A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1,2%. As amostras íntegras apresentaram duas subunidades ribossomais: 18S e 28S (Figura 6). Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer - 80°C.

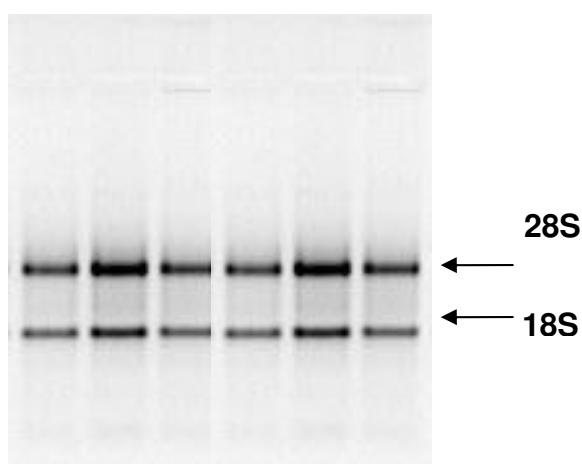


Figura 6- Gel desnaturante de agarose a 1,2%, com amostras de RNA de células de cultura de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme, onde se observa as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A presença dessas subunidades é indicativa do grau de integridade da amostra.

3.8- Síntese de DNA complementar (cDNA)

A leitura do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, DE). As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RTTM (Invitrogen, Life Technologies).

Para transcrição, utilizou-se 3 µg de RNA que foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies) para remoção de DNA contaminante. O tratamento com DNase consistiu na adição de 1,0 µl de 1u/µl DNase I, 1,0 µl de 10x DNase I *Reaction Buffer* (200mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl₂) e água suficiente para um volume final de 10,0 µl de reação. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e a reação bloqueada com a adição de 1,0 µl de 25 mM de EDTA com posterior incubação por 5 minutos a 65°C. Após essa etapa, iniciou-se a síntese do cDNA complementar com a adição de 1,0 µl de 50 µM oligo (dT)₂₀ e 1,0 µl de 10 mM dNTP's. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C e em seguida por 1 minuto a 4°C. Para cada amostra, adicionamos 10,0 µl da seguinte mistura de reação: 2 µl de 10xRT *buffer*, 4,0 µl de 25 mM MgCl₂, 2,0 µl de 0,1 M DTT, 1,0 µl de 40U/µl Rnase OUTTM e 1,0 µl de 200 U/µl Superscript III RTTM. A reação ocorreu por 50 minutos a 50°C, seguida de 5 minutos a 85°C.

3.9- Verificação da síntese de DNA complementar

A verificação da síntese de cDNA foi feita através da reação de polimerase em cadeia (PCR) para o gene da beta-actina (β-actina). As reações de PCR foram realizadas com: 5,0 µl de 10xPCR *buffer* (20 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µl de 50 mM MgCl₂, 1,0 µl de 10 mM dNTP's, 1,0 µl de 10 mM de *primer* BAC_F (5' – AAGAGATGGCCACGGCTGCT – 3'), 1,0µl de 10 mM de *primer* BAC_R (5' – TCGCTCCAACCGACTGCTGT – 3'), 0,5 µl de Taq DNA polimerase, 1,0 µl de cDNA e 39,0 µl de água, para um volume final de 50,0 µl. O programa foi iniciado por 2 minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C/30 segundos, 58°C/45 segundos e 72°C/40

segundos, sendo finalizado por 72°C/7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificar a amplificação de um fragmento de 640 pares de base (pb) (Figura 7).

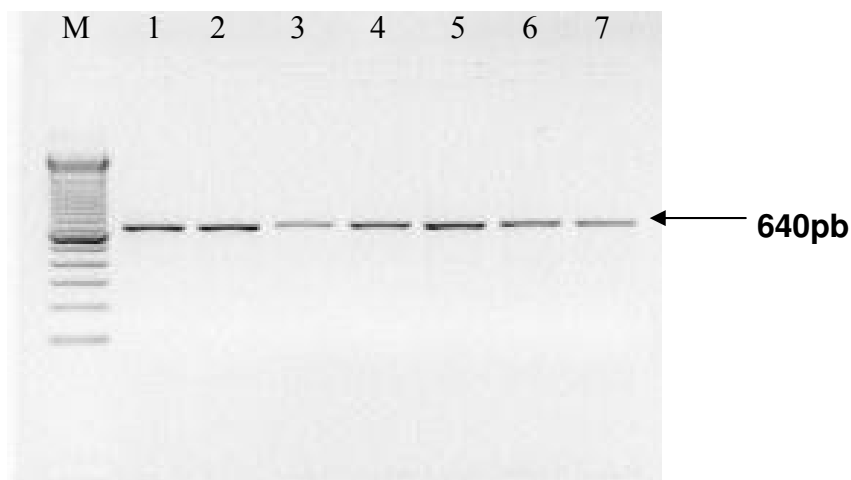


Figura 7- Gel de agarose a 1,5%, com amplificação do gene da beta actina. Na coluna M, marcador de peso molecular 100 pb; nas colunas 1-7 amostras de cDNA de células de cultura de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme. A seta indica o tamanho do fragmento obtido após a reação de PCR.

3.10- Desenho dos *Primers* para a reação do PCR quantitativo em tempo real

Os *primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real foram desenhados com o uso do site www.invitrogen.com e com o *software* “Primer Express” (Applied Biosystems). Os fragmentos desenhados foram submetidos ao programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar homologia com o gene de interesse. A formação de estruturas como *hairpins* e *dimers* também foram avaliadas através do programa Gene Runner. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na tabela 2.

3.11- Padronizações necessárias para PCR quantitativo em tempo real

3.11.1- Concentração de *Primer*

Em PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) a concentração ideal de *primer* a ser utilizada, deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 150 nM, 300 nM, 600 nM e 900 nM. A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), ou seja, foi a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente. Na tabela 3 estão listadas as concentrações dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo e a eficiência de amplificação obtida.

Tabela 2- Sequência e tamanho dos fragmentos amplificados de cada par de *primer* utilizado na amplificação dos genes estudados pela técnica de PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Sequência <i>Primer</i>	Tamanho do fragmento amplificado
GCs alfa-F	5'-ATGCACTGTACACTCGCTTCGA-3'	243pb
GCs alfa-R	5'- CAACGACGCCAGCAAAAAC-3'	
GCs beta-F	5'- GCCAGGTTCAAGTAGATGGTG-3'	91pb
GCs beta-R	5'- GGCATCCGCTGTCCTATG-3'	
Gama globina-F	5'- CCAGCTGAGTGAAGTGCAGTGT-3'	81pb
Gama globina-R	5'- ACGGTCACCAGCACATTTC-3'	
PDE 3B-F	5'- TGGTGATGATGAAGACGGTGA-3'	94pb
PDE 3B-R	5'- CCGTCTGCTTTTCCTTCTTG-3'	
eNOS-F	5'-GCGGCTGCATGACATTGAG-3'	110pb
eNOS-R	5'-CGTTCTGCACCTCGTCGC-3'	
CD 36-F	5'- AAACCTCCTTGGCCTGATAG-3'	61pb
CD 36-R	5'- AGCAACAAACATCACCACAC-3'	
CD 49d-F	5'- TTCCTACGGGCTGTGTTC-3'	85pb
CD 49d-R	5'- CTGAAGTTTGCCAGTTTGG-3'	
CD 29-F	5'- TCCAACCTGATCCTGTGTC-3'	82pb
CD 29-R	5'- TCGTTGTTCCCATTCACTG-3'	
Beta actina-F	5'- AGGCCAACCGCGAGAAG-3'	79pb
Beta actina-R	5'- ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'	
GAPDH-F	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	89pb
GAPDH-R	5'- CCACTTGATTTTTGGAGGGATCT-3'	

Tabela 3- Concentração de *primers* utilizadas na amplificação dos genes de estudo e eficiência da amplificação obtida. As concentrações foram definidas pela eficiência de amplificação gerada nas condições testadas.

Primer	Concentração utilizada	Eficiência do <i>primer</i>
GCs alfa	150 nM	100%
GCs beta	300 nM	100%
Gama globina	150 nM	100%
PDE 3B	150 nM	100%
eNOS	150 nM	99,8%
CD 36	300 nM	99,4%
CD 49d	600 nM	99,78%
CD 29	300 nM	100%
Beta actina	300 nM	100%
GAPDH	300 nM	100%

3.11.2- Eficiência de reação

A reação de PCR em tempo real precisa ser confiável e reprodutiva. Para isso são necessárias condições ótimas de reação, onde as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo da reação de PCR. A eficiência de amplificação é obtida através da fórmula $10^{(-1/slope)}$, onde *slope* é derivado da inclinação da curva, e esse valor quando aplicado a fórmula de eficiência, tem que ser próximo de 2, que significa que a cada ciclo de amplificação o material genômico está sendo duplicado e isso equivale a 100% de eficiência (Meijerink *et al.*, 2001). Na figura 8 está representada as curvas de eficiência dos *primers* utilizados neste estudo.

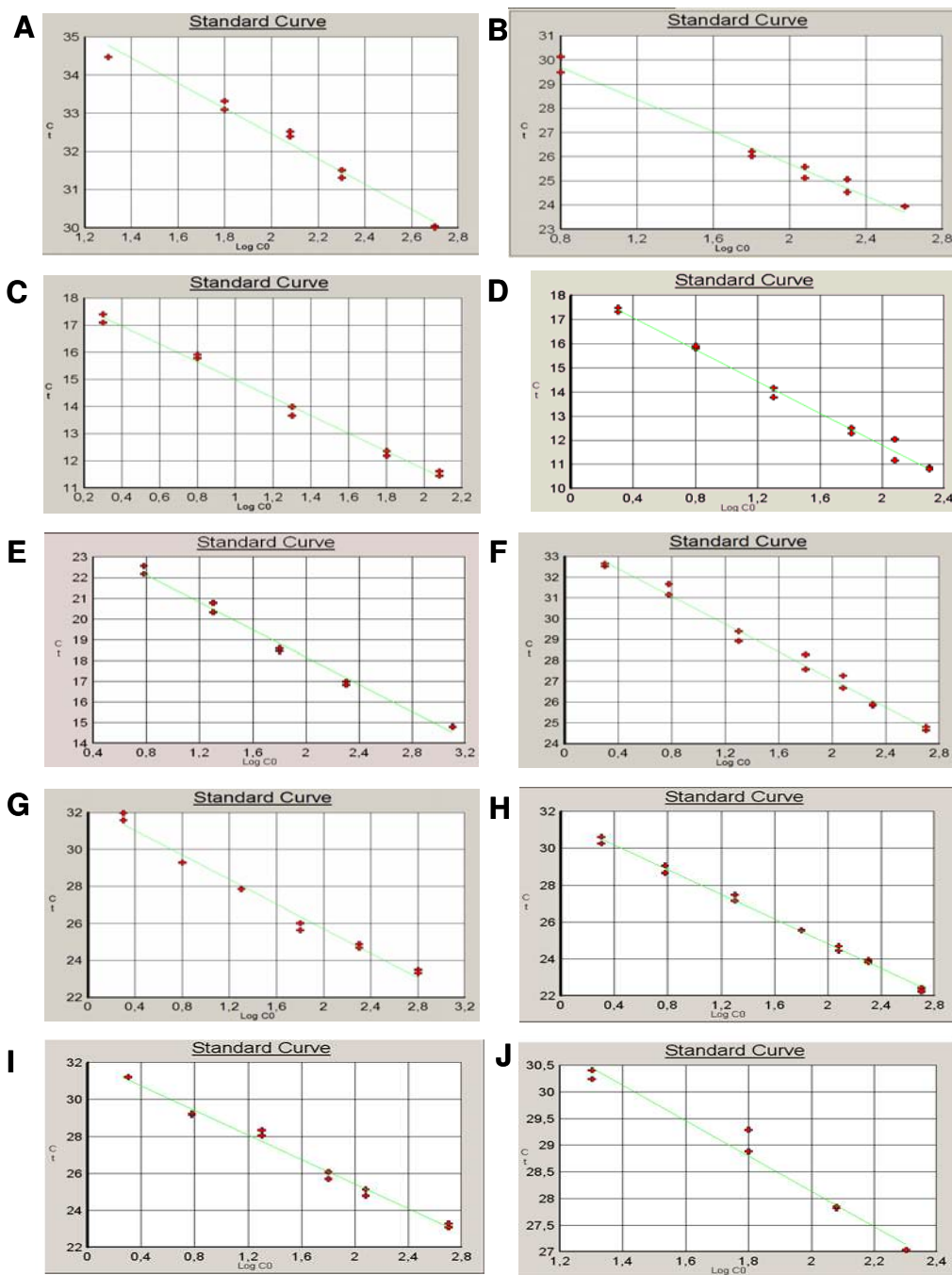


Figura 8- Análise da eficiência de amplificação dos primers GCs beta(A), eNOS (B), gama globina (C), GAPDH (D), beta actina (E), GCs alfa (F), PDE 3B (G), CD36 (H), CD49d (I) e CD29(J).

3.12- PCR Quantitativo em tempo real

A PCR em tempo real é uma técnica utilizada para a avaliação da expressão gênica. A expressão é dita relativa porque leva em consideração também a expressão de controles endógenos como, beta actina e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (Higuchi *et al.*, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada.

As amostras de cDNAs utilizadas na reação de qRT-PCR foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, DE).

As reações foram feitas em duplicatas utilizando como sistema de detecção o reagente SYBRTM Green PCR Máster Mix[®] (Applied Biosystems, USA), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBR Green; uma molécula que emite maior quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla fita. Para cada gene analisado foram utilizados *primers* específicos.

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, USA) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. Quanto maior a expressão de um determinado gene, isto é, quanto mais cópias existirem dele no início da reação, mais precocemente ocorrerá a amplificação e consequentemente, menor será o Ct.

Todas as amostras foram ensaiadas em 25 µl de volume final; sendo 12,5 µl do reagente SYBR Green PCR Máster Mix[®], 50 µg de amostra de cDNA para o gene gama globina ou 250 ng para os demais genes e a concentração ótima de *primer* determinada. Em todas as placas foram pipetados controles negativos (NTC), ou seja, para cada *primer* avaliado foram feitos poços contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem da luz. O programa foi iniciado a 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto. Ao final de uma amplificação normal

adiciona-se um passo de 20 minutos, no qual a temperatura aumenta gradualmente de 60° para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento de temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de T_m (temperatura de *melting*) entre os produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada produto. A representação das curvas de dissociação está apresentada na figura 9.

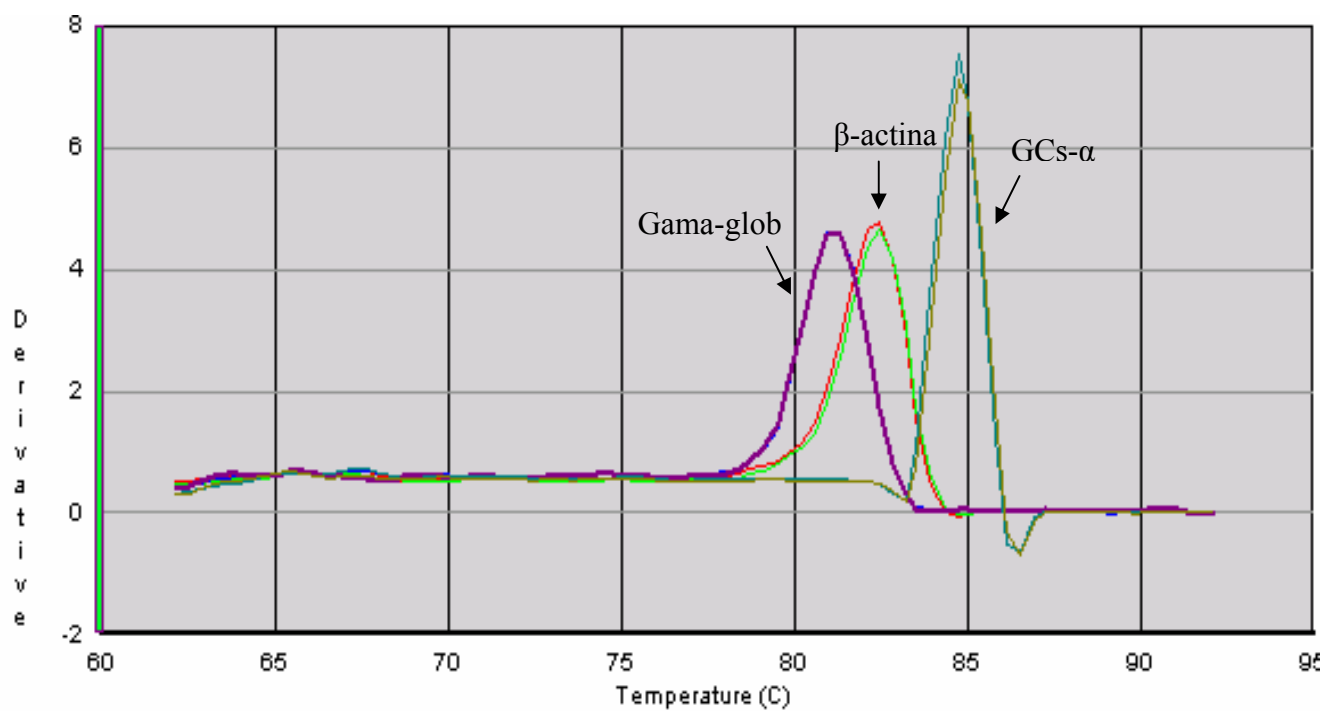


Figura 9- Curva de dissociação utilizada para analisar a ausência de contaminantes.

3.13- Análise dos dados do PCR em tempo real

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão são normalizados em relação a genes chamados de “controles endógenos”. Neste trabalho foi utilizado o gene da Beta actina (β -actina) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. No entanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que a expressão desses genes pode variar consideravelmente (Vandesompele, *et al.*, 2002; Schmittgen, *et al.*, 2000).

Os valores de Ct de cada gene foram obtidos em duplicata, dessa forma, foram calculadas as médias aritméticas destas, para cada amostra que teve um determinado gene estudado. Em seguida foi obtido o valor de delta Ct (Δ Ct), que consistiu na subtração do menor Ct de um gene de uma determinada amostra com os demais Cts desse mesmo gene de outras amostras estudadas. O próximo cálculo foi o de “Q” valor, que corresponde a $2^{\Delta\text{Ct}}$. Os valores de Q dos genes Beta actina e GAPDH de cada amostra analisada foram submetidos ao programa geNorm (Vandesompele, *et al.*, 2002), que calculou a média geométrica entre eles, valor este denominado de Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor de Q do gene de interesse da amostra pelo fator de normalização da amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (UA) ou valor absoluto de expressão.

3.14- Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e os dados de cada grupo (indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme) foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com uma significância estabelecida de $p < 0,05$. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Instat.

4- RESULTADOS

4.1- Padronização da cultura de células CD34⁺

A cultura de células CD34⁺ foi padronizada com sucesso para indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme. Participaram deste estudo 6 pacientes com AF com alguns critérios de inclusão citados anteriormente. Foi observado durante a cultura todos os estágios da eritropoese; proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático e reticulócito. Os pontos de coleta escolhidos basearam-se no predomínio celular encontrado em um determinado dia de cultivo. Foi optado pelo dia 7, dia em que as colônias são coletadas, lavadas e antes das células serem colocadas para diferenciação terminal em meio líquido Alpha MEM, uma amostragem foi retirada. Nesse dia de coleta temos o predomínio celular de CFU-E e proeritroblastos. A próxima coleta de células foi realizada no dia 10 (o número de dias é contado na sequência de dias da fase I), nesse dia de cultura temos o predomínio celular de eritroblastos basófilos. E por fim, o último ponto escolhido foi o do dia 13, onde a população de células predominante era de eritroblastos ortocromáticos, mas também visualizamos células com núcleo em extrusão e reticulócitos.

As células CD34⁺ foram separadas por meio da técnica de separação magnética com *Beads* (Figura 10) e as células CD34⁺ após sete dias em metil celulose que proliferavam e diferenciavam em unidades formadoras de colônia eritróide (CFU-E) e proeritroblastos (Figura 11). As figuras 12, 13 e 14 representam as células coletadas no 7º, 10º e 13º dia de cultivo, respectivamente.

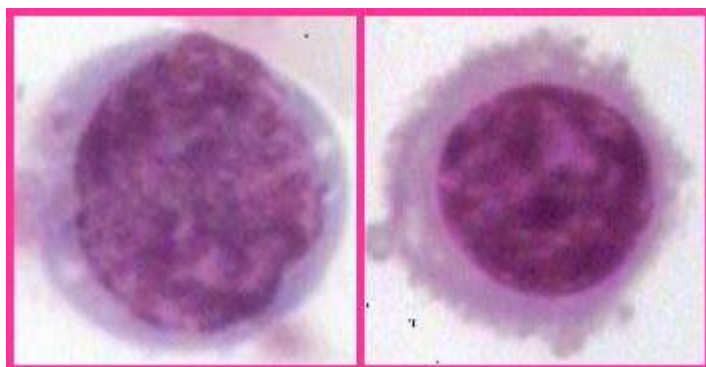


Figura 10- *Morfologia celular das células CD34⁺ isoladas de sangue periférico de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme. Coloração de Leishman. Aumento de 100X.*

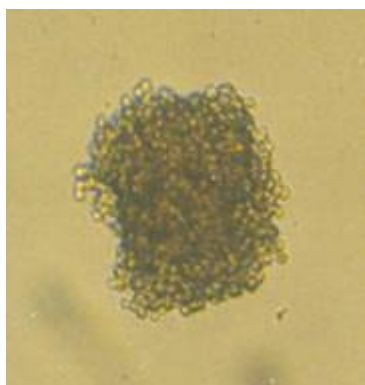


Figura 11- *Colônia de células eritróides visualizada após sete dias de cultura em metilcelulose. Aumento de 20X.*

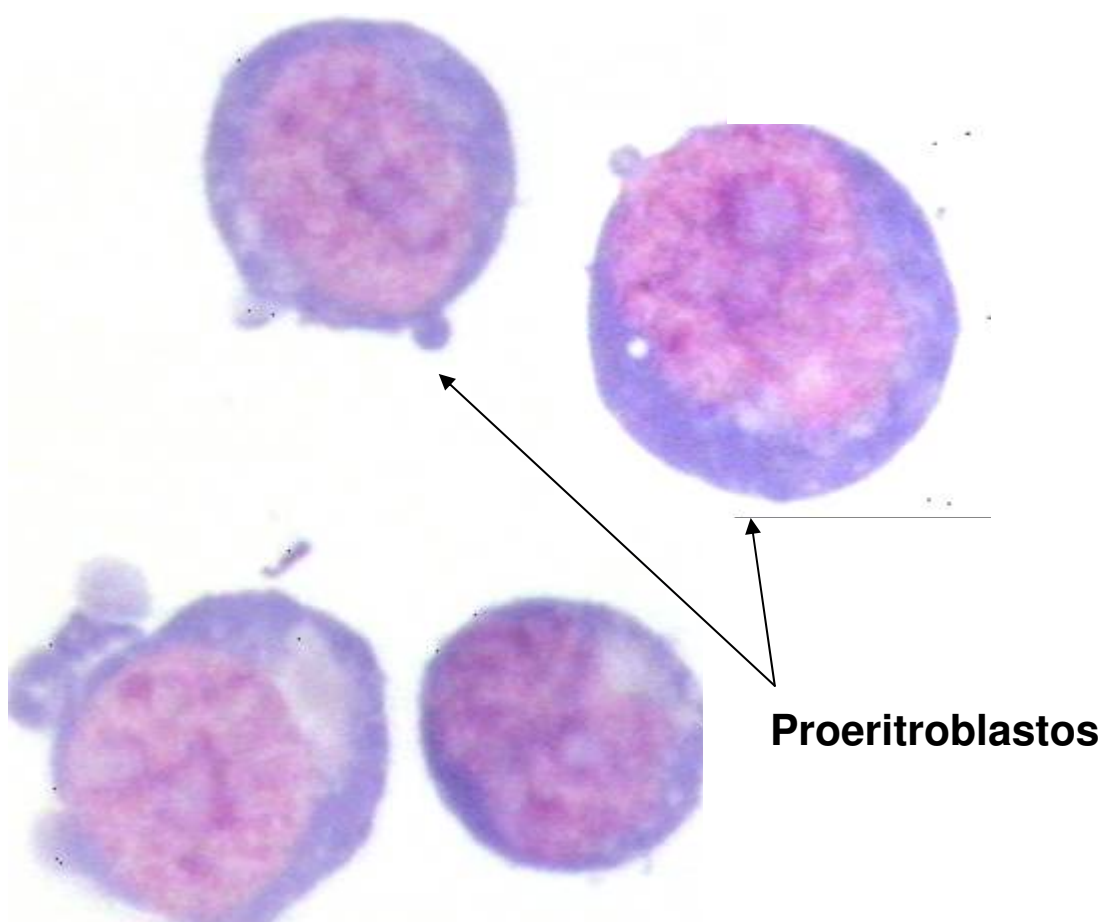


Figura 12- *Células coletadas no dia 7. A seta indica a presença de proeritroblastos. Células coradas por Leishman. Aumento de 100x.*

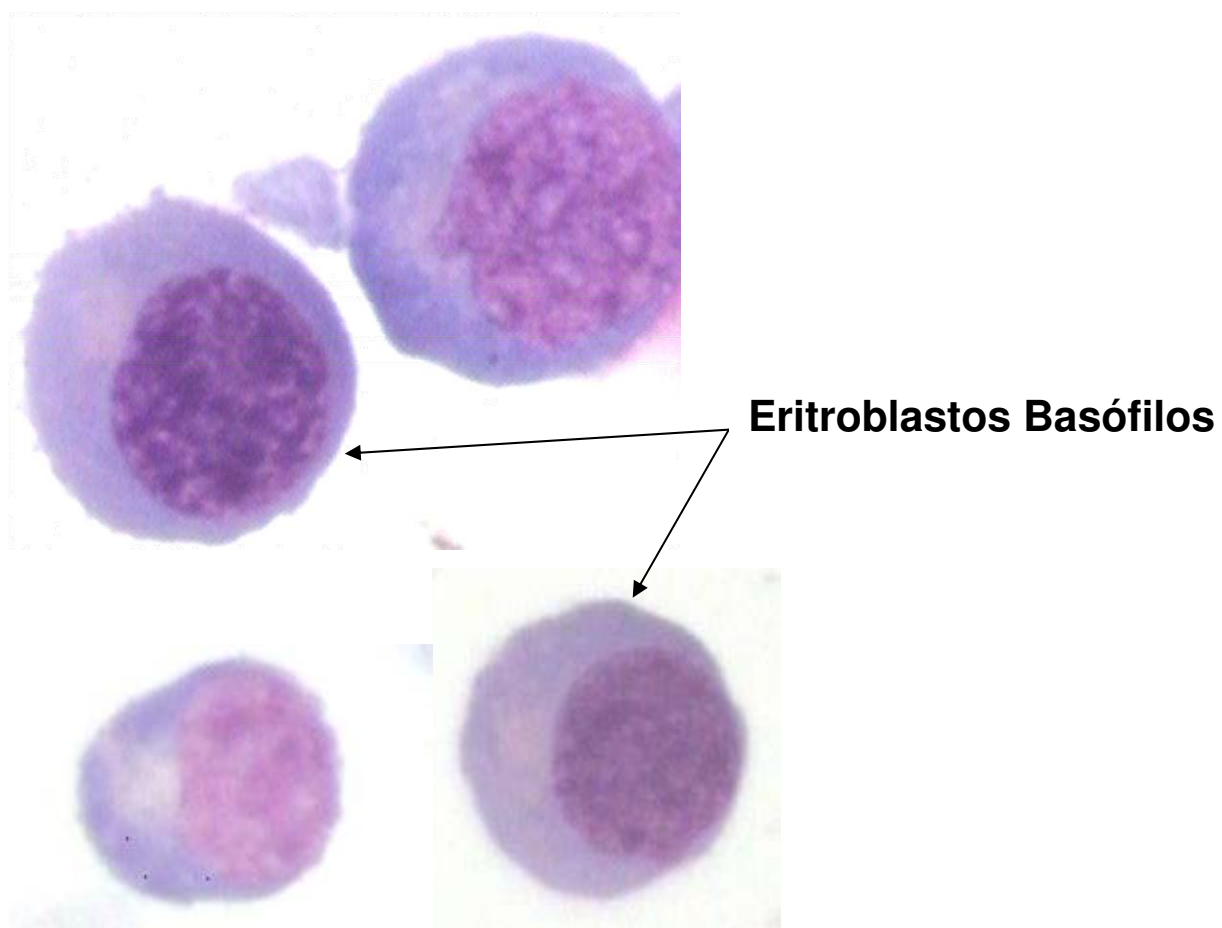


Figura 13- *Células coletadas no dia 10. A seta indica a presença de eritroblastos basófilos.*
Lâmina corada com Leishman. Aumento de 100x.

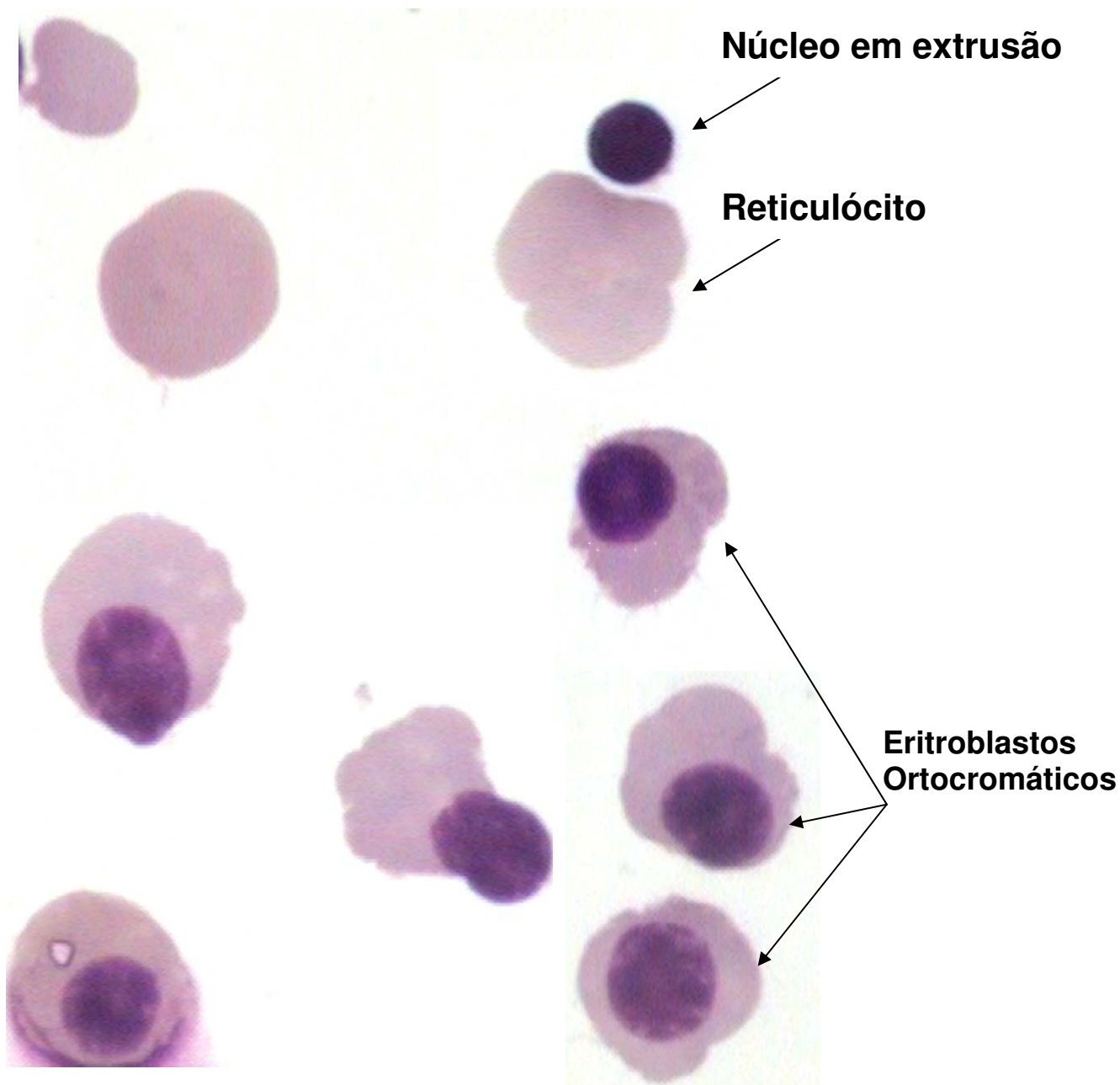


Figura 14- *Células coletadas no dia 13.* As setas indicam a presença de eritroblastos ortocromáticos. Também se observa a presença de núcleo em extrusão e reticulócito. Lâmina corada com Leishamn. Aumento de 100x.

4.1.1- Cultura de persistência hereditária de hemoglobina fetal

Uma única cultura de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) foi realizada com o objetivo de validar esse sistema de cultura de células CD 34⁺. Se o método fosse válido, conseguiríamos reproduzir *in vitro* um mecanismo *in vivo*, caracterizado pelo aumento de gama globina na cultura de PHHF.

A expressão de gama globina foi maior na cultura de PHHF do que na cultura controle ao longo da diferenciação eritróide. Esses resultados mostraram que o sistema é válido, pois reproduziu *in vitro* o aumento de expressão de gama globina (Figura 15).

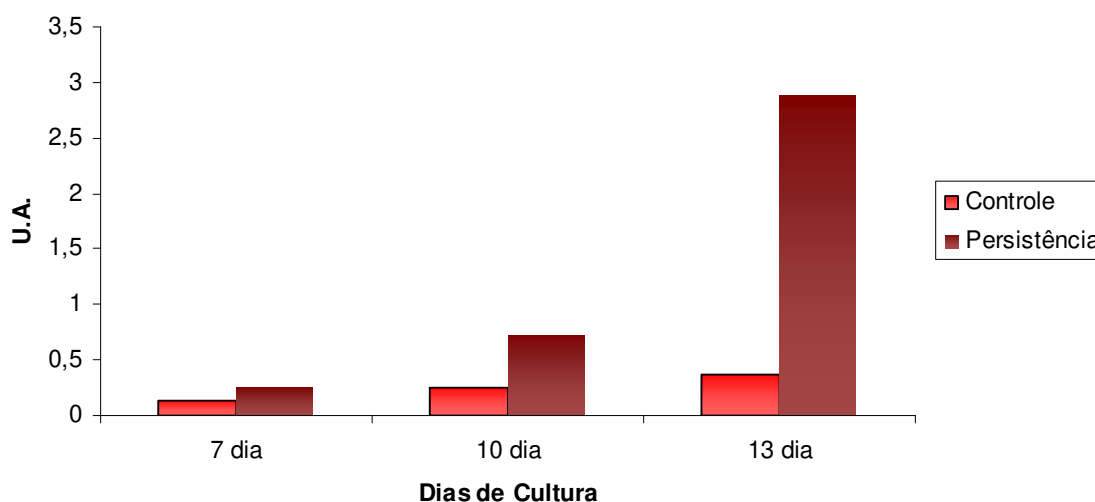


Figura 15- Expressão do gene gama globina durante a diferenciação eritróide em cultura de células de um indivíduo normal (Controle) e um paciente com PHHF. O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.).

4.2- Caracterização da diferenciação eritróide na anemia falciforme

4.2.1- Determinação da diferenciação eritróide

A diferenciação eritróide foi acompanhada por citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti receptor de transferrina e anti Glicoforina A. Observa-se com a diferenciação que a células que possuem marcação anti receptor de transferrina passam a “ganhar” marcação anti Glicoforina A também, indicando maturação celular (Figura 16).

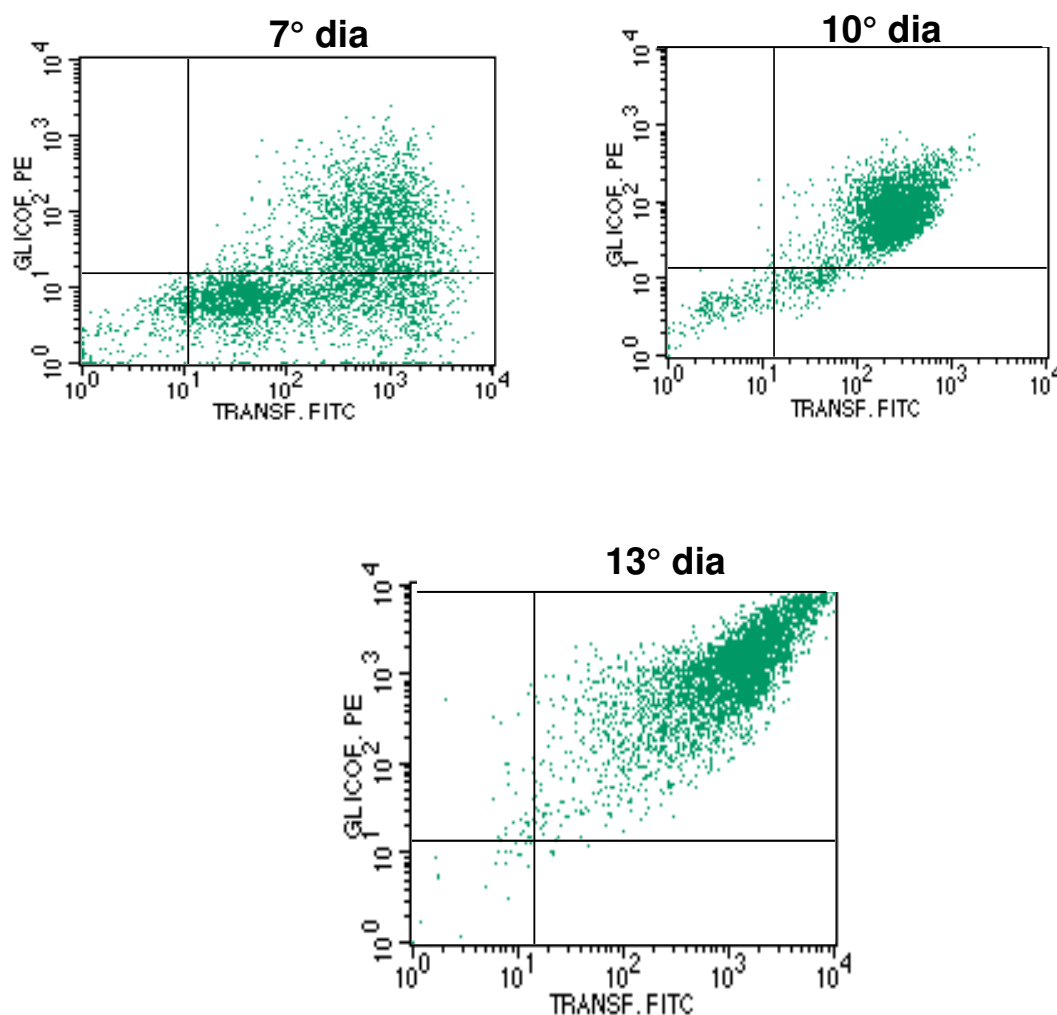


Figura 16- Dot plots de citometria de fluxo. O eixo X representa a marcação anti receptor de transferrina e o eixo Y a marcação anti Glicoforina A. O quadrante superior direito indica a marcação dupla; ambos os anticorpos.

4.3- Comparação das expressões gênicas de gama globina, GCs alfa e beta subunidades, em diferentes etapas da diferenciação eritróide de cultura de células CD34⁺ de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme

A expressão do gene da gama globina foi acompanhada durante a diferenciação eritróide, tanto nas culturas controle, como nas de pacientes com anemia falciforme. Foi observado que o gene gama globina encontra-se significativamente mais expresso nas culturas falciformes no 13º dia (predomínio de eritroblastos ortocromáticos) de diferenciação eritróide em relação ao mesmo ponto das culturas controle. Nos dias 7 e 10 não observamos diferenças significativas da expressão de gama globina nas culturas falciformes em comparação com as culturas controle (Figura 17).

A expressão das subunidades alfa e beta da enzima GCs não foi diferente entre as culturas de pacientes com AF e os controles (Figura 18 e 19, respectivamente).

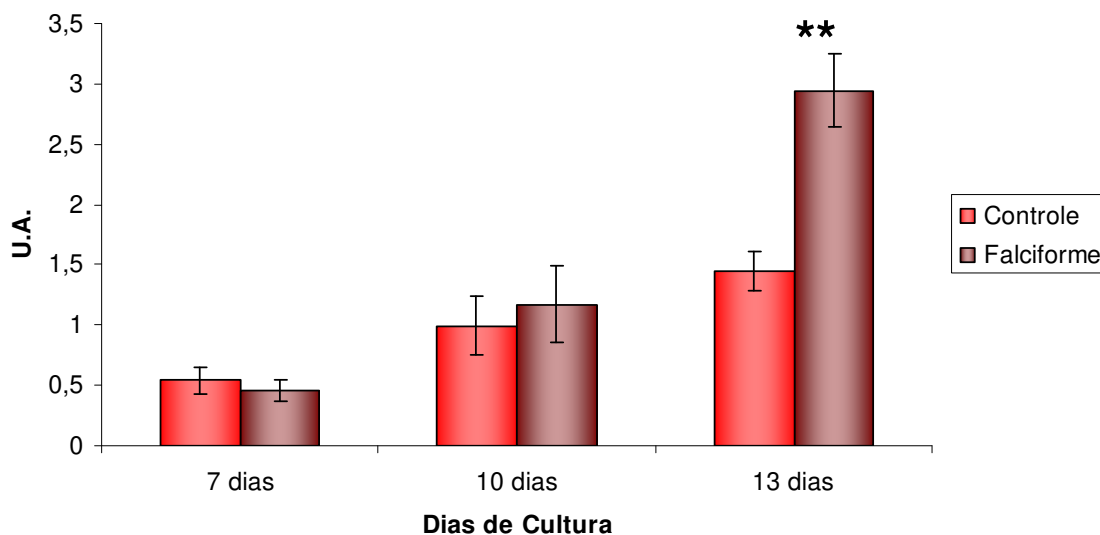


Figura 17- *Expressão do gene gama globina durante a diferenciação eritróide em cultura de células de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (Falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.). Os valores são representados por média $\pm$ EPM. ** $p < 0.01$ ($p=0,0095$, $n=6$). Teste de Mann-Whitney.*

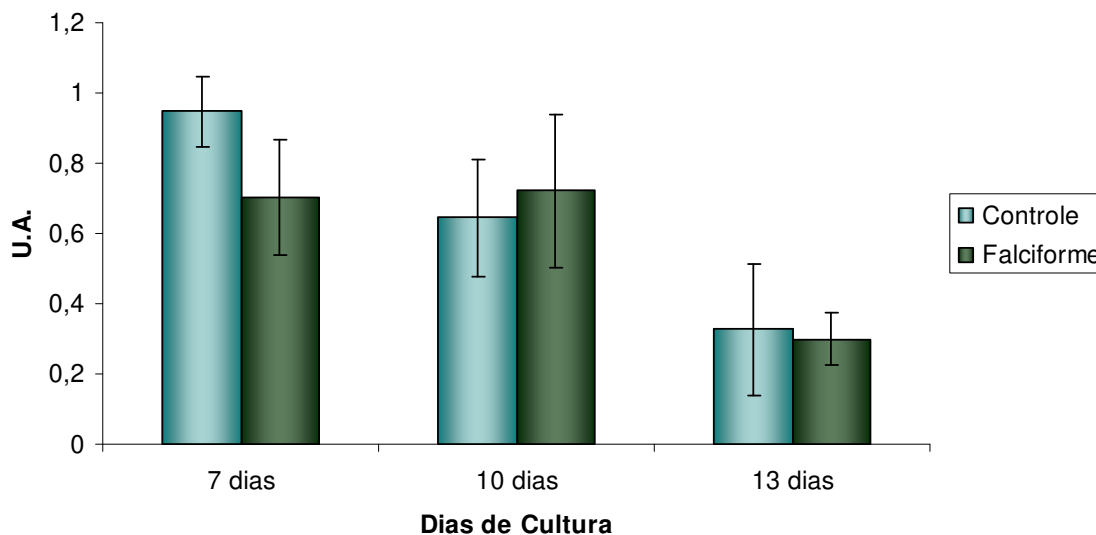


Figura 18- *Expressão do gene GCs alfa subunidade durante a diferenciação eritróide em cultura de células de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (Falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.). Os valores são representados por média $\pm$ EPM. $p > 0,05$ (n=6). Teste de Mann-Whitney.*

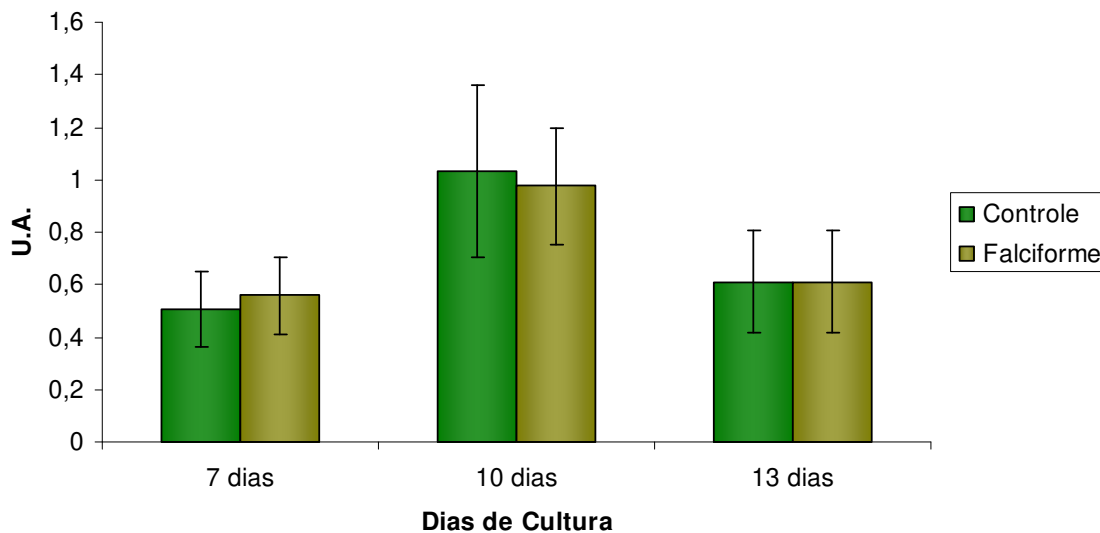


Figura 19- *Expressão do gene GCs beta subunidade durante a diferenciação eritróide em cultura de células de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (Falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.). Os valores são representados por média $\pm$ EPM. $p > 0,05$ ($n=6$). Teste de Mann-Whitney.*

4.4- Níveis de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) durante a diferenciação eritróide de cultura de células CD34⁺ de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme

Os níveis de GMPc nas culturas de pacientes com anemia falciforme estão significativamente diminuídos ao longo da eritropoese *in vitro* em comparação com as culturas controle (Figura 20).

Os níveis de AMPc encontram-se aumentados no dia 7 das culturas falciformes em relação às culturas controles, nos demais pontos há maior concentração de AMPc na cultura falciforme, porém devido ao erro padrão, não conseguimos um resultado estatístico significativo (Figura 21).

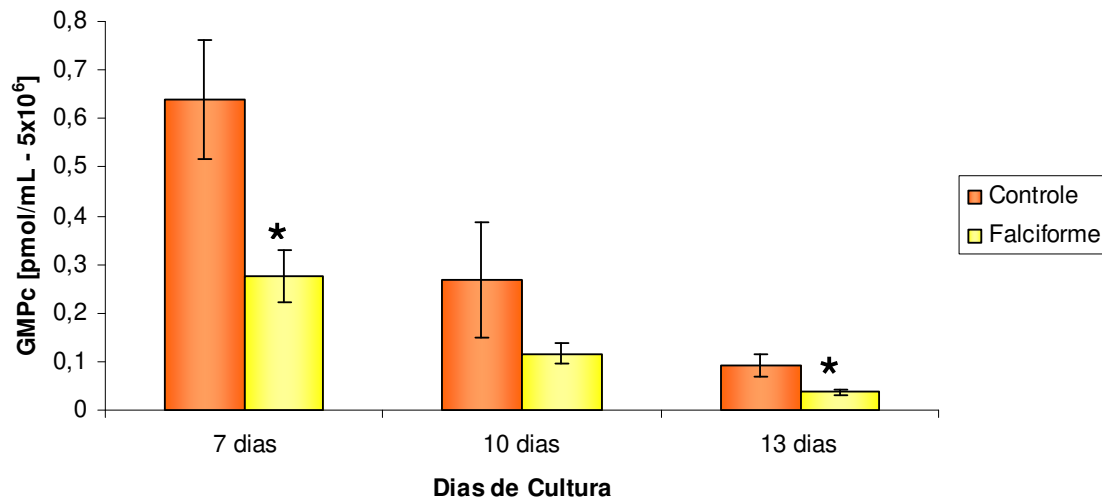


Figura 20- *Níveis de GMPc durante a diferenciação eritróide in vitro de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (Falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y a concentração de GMPc em pmol/ml em $5 \cdot 10^6$ células. Os valores são representados por média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ (n=6). Teste de Mann-Whitney.*

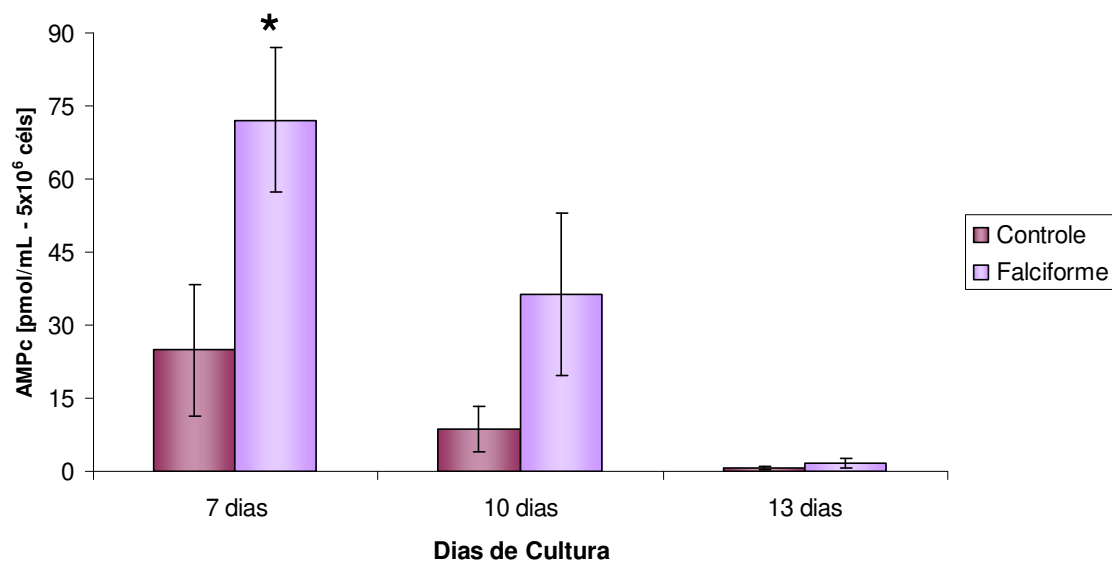


Figura 21- Níveis de AMPc durante a diferenciação eritróide *in vitro* de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (Falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y a concentração de AMPc em pmol/ml em $5 \cdot 10^6$ células. Os valores são representados por média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ (n=6). Teste de Mann-Whitney.

4.5- Comparação das expressões gênicas de PDE 3B, eNOS, CD36, CD49d e CD29 em diferentes etapas da diferenciação eritróide de cultura de células CD34⁺ de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme

A expressão de PDE 3B foi avaliada ao longo da diferenciação eritróide *in vitro* de indivíduos normais e pacientes com anemia falciforme, mas nenhuma diferença entre os grupos estudados foi obtida nos diferentes dias de cultura (Figura 22).

A expressão da eNOS ao longo da diferenciação eritróide não apresentou nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 23).

Em relação à expressão gênica das moléculas de adesão CD 36, CD 29b e CD 49 durante a diferenciação eritróide, nenhuma diferença de expressão foi obtida em relação às culturas falciformes e as culturas controles (Figuras 24, 25 e 26, respectivamente).

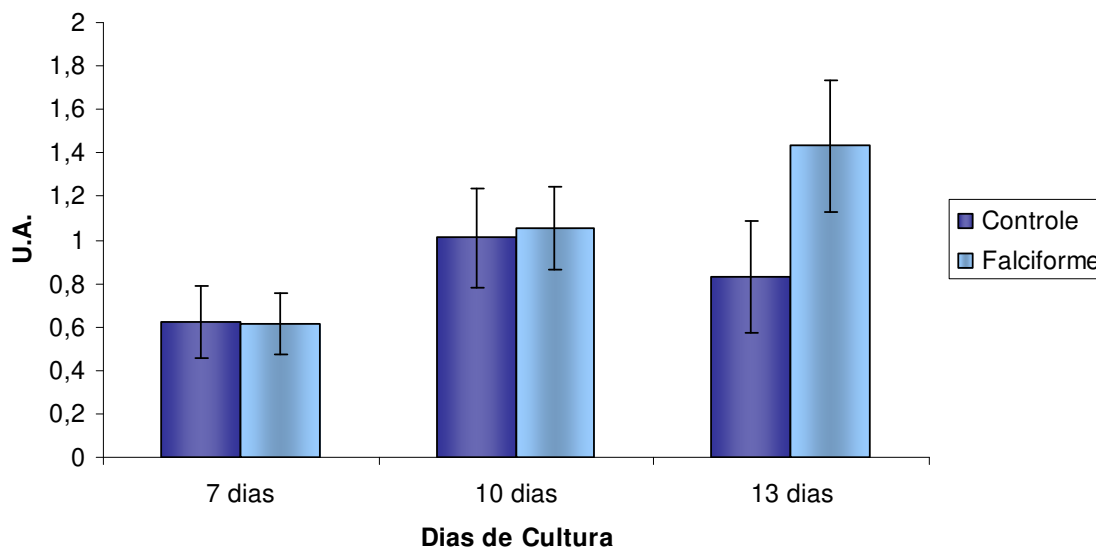


Figura 22- *Expressão do gene PDE 3B durante a diferenciação eritróide em cultura de células de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.). Os valores são representados por média $\pm$ EPM. $p > 0,05$ (n=6). Teste de Mann-Whitney.*

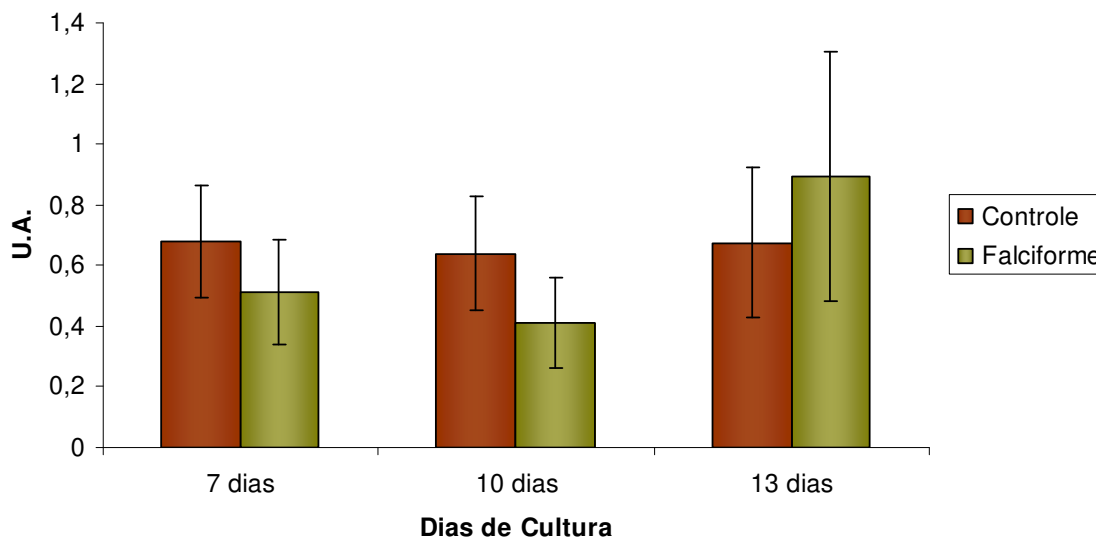


Figura 23- *Expressão do gene eNOS durante a diferenciação eritróide em cultura de células de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.). Os valores são representados por média $\pm$ EPM. $p > 0,05$ ($n=6$). Teste de Mann-Whitney.*

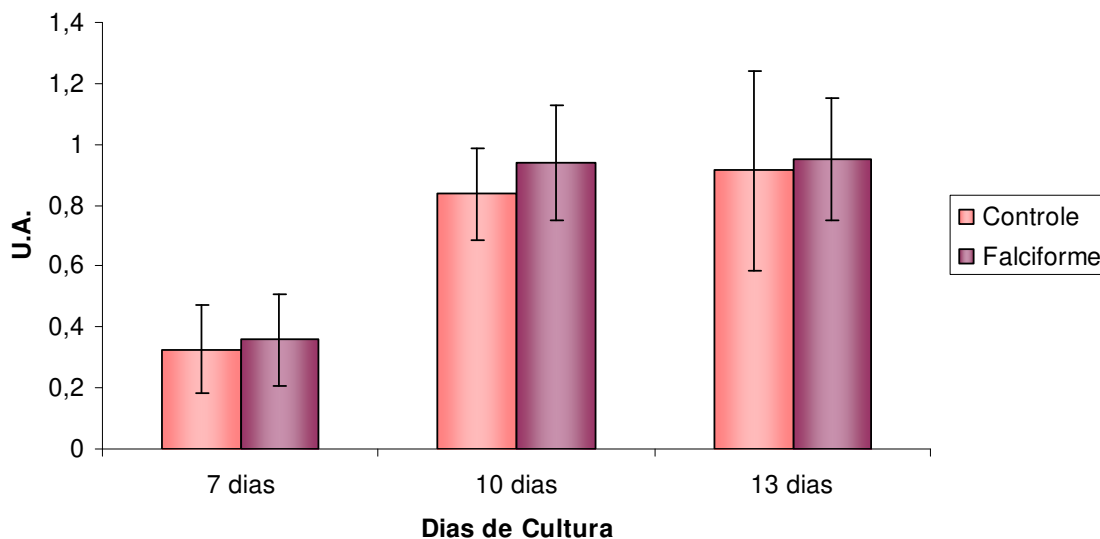


Figura 24- *Expressão do gene CD36 durante a diferenciação eritróide em cultura de células de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.). Os valores são representados por média $\pm$ EPM. $p > 0,05$ ($n=6$). Teste de Mann-Whitney.*

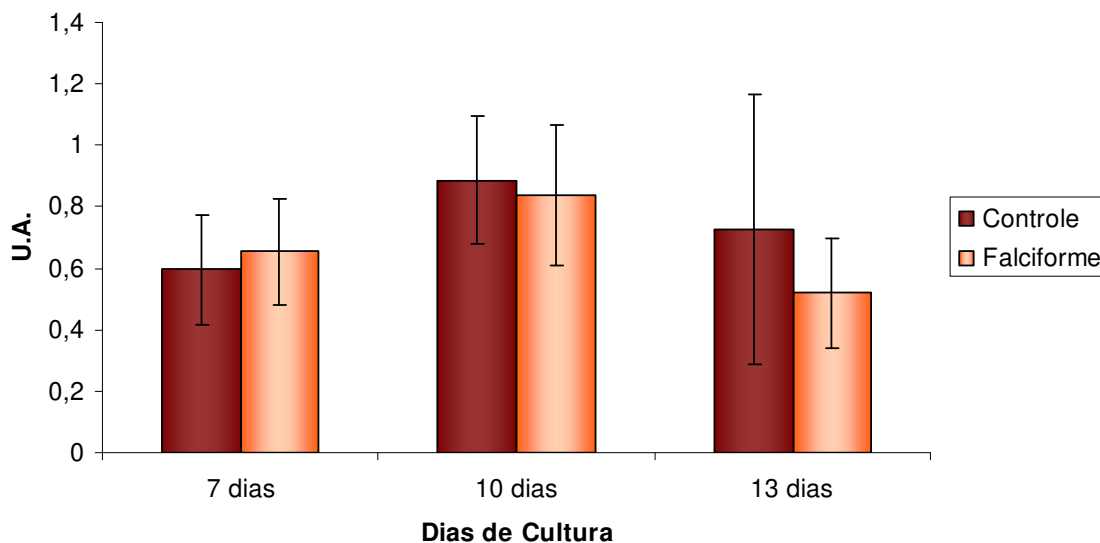


Figura 25- *Expressão do gene CD49d durante a diferenciação eritróide em cultura de células de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.). Os valores são representados por média $\pm$ EPM. $p > 0,05$ ($n=6$). Teste de Mann-Whitney.*

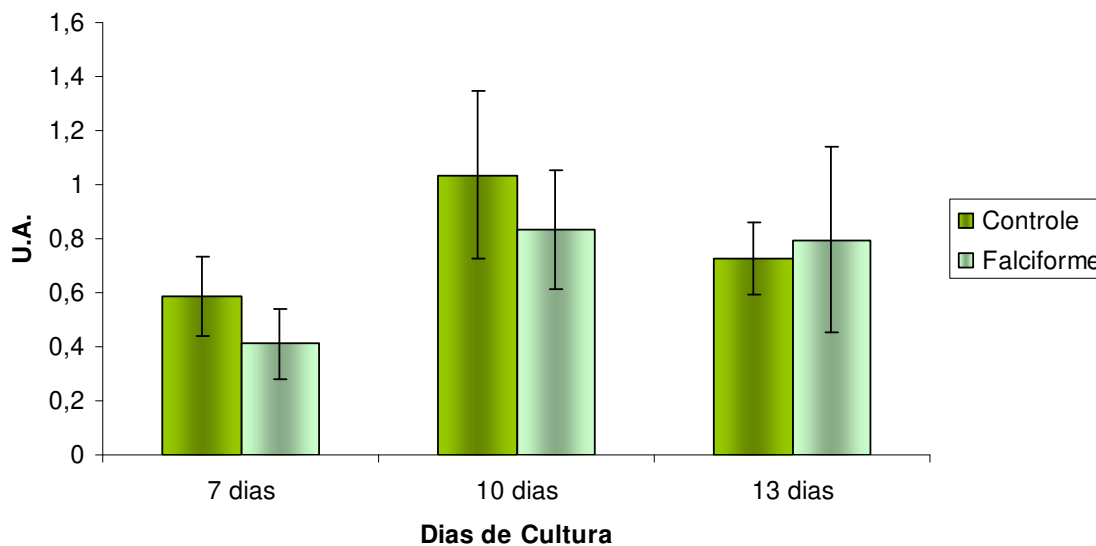


Figura 26- *Expressão do gene CD29 durante a diferenciação eritróide em cultura de células de indivíduos normais (Controle) e pacientes com anemia falciforme (falciforme). O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.). Os valores são representados por média $\pm$ EPM. $p > 0,05$ ($n=6$). Teste de Mann-Whitney.*

4.6- Comparação da expressão de gama globina, GCs alfa e beta subunidades em células CD34⁺ tratada com BAY 41-2272

Uma única cultura controle foi tratada com 60 nM do composto Bay 41-2272, ativador de GCs. O composto foi adicionado a uma parte das células no dia 7, e o restante das células seguiu sem o tratamento com o composto para compararmos a diferença de expressão entre elas. As células foram coletadas no dia 10 e 13 e a expressão de gama globina determinada. Os resultados demonstram que a expressão gênica de gama globina aumentou com o tratamento com Bay cerca de 3x no 10º dia de cultura em relação ao mesmo período das células sem o composto. Nenhuma diferença foi observada em relação ao 13º dia (Figura 27).

Foi avaliada também a expressão de GCs alfa e beta subunidades. A expressão gênica da subunidade alfa aumentou aproximadamente 2x com o tratamento com Bay no dia 10 de coleta, enquanto que no dia 13 nenhuma diferença foi observada (Figura 28). A subunidade beta de GCs não apresentou nenhuma diferença de expressão gênica com o tratamento com Bay 41-2272 (Figura 29).

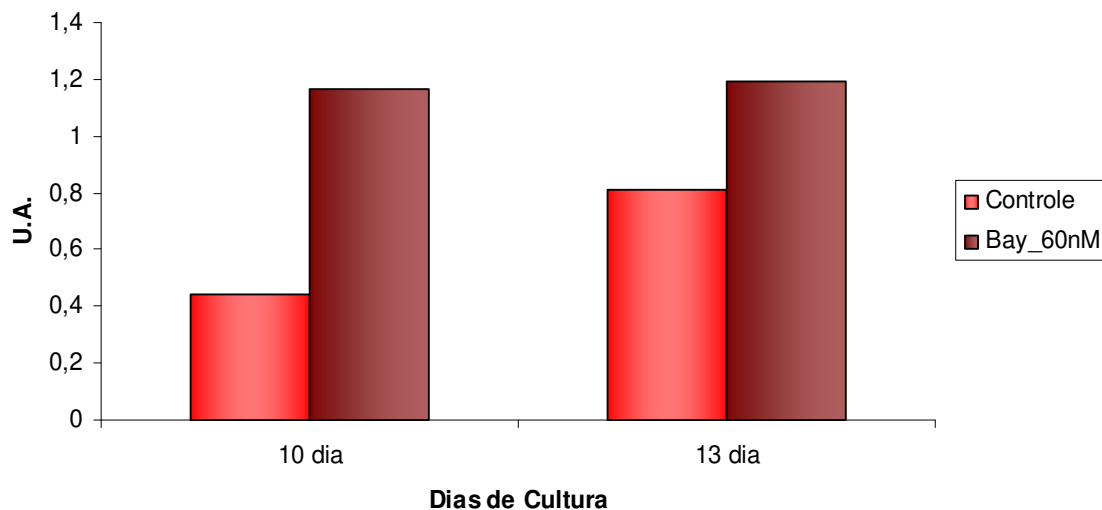


Figura 27- *Expressão do gene gama globina durante a diferenciação eritróide em cultura de células de um indivíduo normal (Controle).* As células foram tratadas no dia 7 com 60 nM de Bay 41-2272 e coletadas nos dias 10 e 13, respectivamente com as células sem tratamento. O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.).

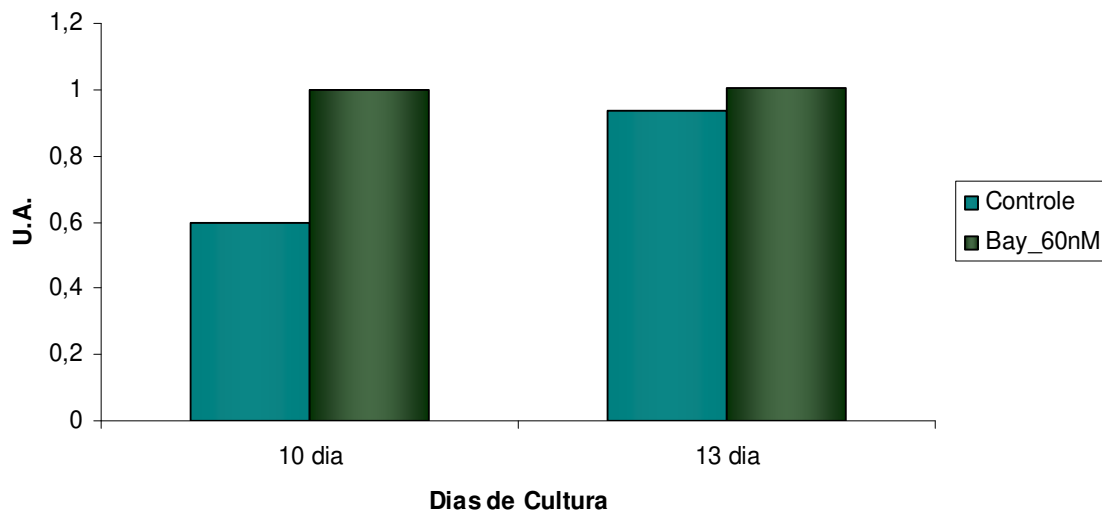


Figura 28- *Expressão do gene GCs alfa subunidade durante a diferenciação eritróide em cultura de células de um indivíduo normal (Controle). As células foram tratadas no dia 7 com 60 nM de Bay 41-2272 e coletadas nos dias 10 e 13, respectivamente com as células sem tratamento. O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A.).*

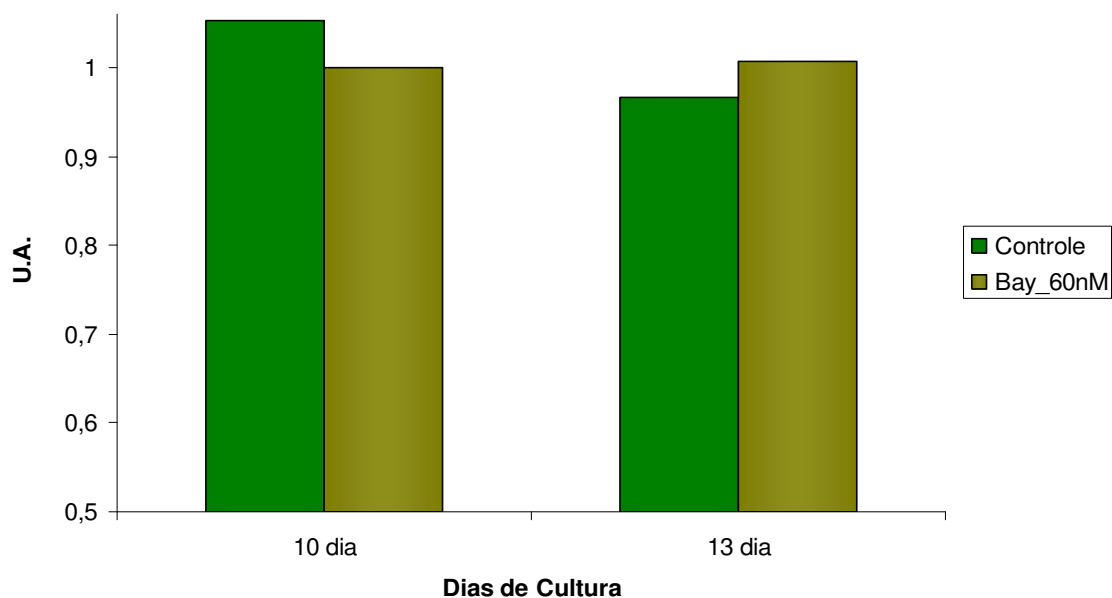


Figura 29- *Expressão do gene GCs beta subunidade durante a diferenciação eritróide em cultura de células de um indivíduo normal (Controle). As células foram tratadas no dia 7 com 60 nM de Bay 41-2272 e coletadas nos dias 10 e 13, respectivamente com as células sem tratamento. O eixo X representa os dias de coleta das células e o eixo Y as unidades arbitrárias de expressão (U.A).*

5- DISCUSSÃO

A hemoglobina S ocorre devido a uma alteração molecular no gene da globina β . Uma única mutação de ponto no códon 6 leva à substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina, levando à formação da HbS ao invés da HbA. Em indivíduos homozigotos, esta hemoglobina anormal polimeriza quando desoxigenada causando deformação, enrijecimento, diminuição da flexibilidade das células vermelhas, o que resulta em anemia hemolítica, eventos vaso-oclusivos e asplenia funcional, aumentando a susceptibilidade à infecções.

Apesar da alteração molecular ser a mesma em todos os pacientes com AF, uma grande heterogeneidade clínica é observada nestes pacientes. Vários são os fatores que podem atuar influenciando nos aspectos fisiopatológicos e modular a gravidade do quadro clínico da AF, dentre os quais se destaca, a presença de elevados níveis de Hb F (Costa, 2001).

O NO parece ter papel importante na fisiopatologia da anemia falciforme, uma vez que a sua biodisponibilidade está diminuída nesta doença (Mosseri et al., 1993; Gladwin & Schechter, 2001). Na célula eritróide o NO ativa GCs que aumenta os níveis de GMPc e kinases dependentes em GMPc (PKG), sendo responsável pela expressão do gene da gama globina e consequentemente a produção de hemoglobina fetal (Cokic et al., 2003). Além deste provável mecanismo, outras vias de regulação sobre γ -globina podem modular a produção de Hb F.

A GCs é uma enzima heterodímera formada por duas subunidades; α e β . A subunidade alfa tem papel importante na modulação da função de GCs (Yuen et al., 1994) e parece estar associada com a expressão do gene da gama globina em células eritróides, bem como GMPc (Ikuta et al., 2001). A presença do grupamento heme faz com que vários agentes, particularmente o NO, possam atuar sobre a GCs induzindo a produção de GMPc (Denninger et al., 1999). Conran et al. (2004) evidenciaram que hemácias de pacientes com anemia falciforme tratados ou não tratados com HU apresentam níveis de GMPc elevados em relação a indivíduos normais, sugerindo que o aumento da atividade de GCs nessas células seja um dos múltiplos mecanismos que atuam para o aumento da expressão de gama globina na anemia falciforme.

Entender os mecanismos envolvidos na produção de HbF na AF é importante pois a hemoglobina fetal dificulta a polimerização da HbS. Os níveis de HbF nos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme são moderadamente elevados, porém, quando esse aumento é maior que um determinado nível, pode ocorrer evolução no quadro clínico da doença (Rosse et al., 2000).

Foi padronizado neste trabalho o sistema de cultura *in vitro*, onde células CD34⁺ de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme foram isoladas e cultivadas na presença de Epo com o propósito de estudarmos os possíveis mecanismos envolvidos no aumento de HbF. Este sistema é válido por mimetizar um ambiente de diferenciação celular e tem a vantagem de constituir uma única linhagem hematopoética, no caso a eritróide. Uma outra técnica de cultura celular descrita por Fibach et al., 1989, também tem sido utilizada na literatura, porém a presença de “células contaminantes” como exemplo, os macrófagos e os linfócitos podem vir a interferir nos resultados finais por terem em seu citoplasma nucleotídeos cíclicos, como o GMPc e o AMPc. Um fato interessante nesta técnica é que não há o processo de *switching* da HbF pela HbA, ambas as cadeias globínicas γ e β são sintetizadas ao mesmo tempo, durante o desenvolvimento celular.

Nossos resultados demonstraram que durante a diferenciação eritróide *in vitro* os níveis de RNAm de gama globina encontraram-se significativamente elevados no 13º dia (predomínio de eritroblastos ortocromáticos) da cultura de pacientes com AF em relação aos controles. Este resultado nos leva a inferir que as células tronco hematopoéticas dos pacientes com AF provavelmente possuem características diferentes às dos controles, uma vez que ambas sob as mesmas condições *in vitro* expressaram níveis significativamente diferentes de gama globina. Uma hipótese é que provavelmente existe um mecanismo de seleção das células tronco com maior produção de Hb fetal nesses pacientes e estas proliferam e diferenciam ao longo do andamento da cultura.

A possibilidade da via GCs-GMPc estar envolvida no aumento de expressão de gama globina nas células de pacientes com AF foi avaliada neste trabalho. Ikuta et al, 2001, demonstraram o envolvimento desta via em células K562 e em cultura de eritroblastos primários, porém, ambas as células foram tratadas previamente com agentes indutores de

HbF (Hemina e Butirato). Por esse motivo, procuramos investigar se a atividade da GCs poderia estar envolvida no mecanismo de aumento de gama globina constitutivo durante a diferenciação eritróide.

Surpreendentemente, os níveis de GMPc encontraram-se significativamente reduzidos nas culturas falciformes em relação às culturas controles. Enquanto que a expressão gênica de GCs alfa e beta subunidades não apresentaram diferenças de expressão entre falciforme e controle. Estes dados sugerem que provavelmente o aumento de gama globina nas culturas falciformes seja modulado por outra via. É importante ressaltar, que avaliamos a expressão gênica basal de gama globina das células ao longo da diferenciação eritróide, ou seja, nenhuma cultura foi estimulada com compostos indutores de HbF, o que poderia explicar essa discrepância. Os resultados deste trabalho representam a primeira descrição da expressão basal de gama globina ao longo da diferenciação eritróide de pacientes com anemia falciforme.

Em 2004, Inoue et al., sugeriram uma possível regulação negativa de gama globina em células K562 tratadas com indutores de HbF pela via do AMPc. Esses agentes indutores ao ativarem GCs levam ao acúmulo intracelular de GMPc, este por sua vez, é capaz de inibir a atividade da enzima fosfodiesterase 3B responsável pela degradação de AMPc, conseqüentemente aumentando os níveis intracelulares de AMPc o qual provavelmente regula negativamente a expressão de gama globina via PKA. Os níveis de AMPc foram determinados durante a diferenciação eritróide de pacientes com AF e controles, como resultado obtivemos que os níveis de AMPc encontram-se aumentados significativamente no 7º dia da cultura de pacientes com AF em relação às culturas normais. Nos demais pontos também houve um aumento em relação ao controle, porém, estes dados não foram estatisticamente significativos. É importante mencionar que Keefer et al., 2006 demonstraram um papel importante para o AMPc em aumentar nos níveis de HbF em cultura de células CD34⁺ de indivíduos normais, tratadas com hidroxiuréia, 5-azacitidina e butirato de sódio em um único ponto de coleta, no entanto, a técnica utilizada pelo grupo foi bem distinta da utilizada neste trabalho. Os níveis de AMPc que foram observados nas culturas de pacientes com AF sugerem a participação deste nucleotídeo cíclico num possível mecanismo em elevar os níveis de gama globina, sendo este o primeiro trabalho a descrever esse fato.

Devido ao aumento dos níveis de AMPc encontrados nas culturas de pacientes com AF, foi avaliado o nível de expressão gênica ao longo da diferenciação eritróide do gene PDE 3B. Como descrito no trabalho de Inoue et al., 2004, a enzima PDE 3B é responsável pela degradação de AMPc e pode ser inativada na presença de altas concentrações de GMPc permitindo o acúmulo de AMPc nas células da linhagem eritróide o que poderia contribuir para a atividade do gene da gama globina. Desta forma, foi avaliado a expressão de PDE 3B entre as culturas falciformes e controles ao longo da diferenciação eritróide, visto que os níveis de AMPc são diferentes entre elas. Porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas de expressão entre os grupos estudados.

Kleinbongard et al., 2006 demonstraram que as células vermelhas expressam uma enzima eNOS funcional. Como o NO (sintetizado pela eNOS) ativa GCs produzindo GMPc, foi avaliada, a expressão da eNOS durante a diferenciação eritróide. No entanto, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as culturas de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais, sugerindo que a eNOS não participaria como um fator indutor do aumento de gama globina e da diminuição dos níveis de GMPc durante a diferenciação eritróide neste modelo experimental.

Também foi avaliada a expressão gênica das principais moléculas de adesão envolvidas no processo de vaso-oclusão, uma vez que, relatos da literatura demonstram a importância dessas moléculas na doença falciforme. Foram estudadas as moléculas de adesão CD36, CD49d e CD29 ao longo da diferenciação eritróide de pacientes com AF e indivíduos normais. Nenhuma destas moléculas apresentou diferenças de expressão gênica em relação às culturas controles. No entanto, Gambero et al., 2007 evidenciaram que reticulócitos de pacientes falciformes apresentavam níveis de expressão aumentados em relação à de controles. Uma possível explicação para este resultado pode ser o micro ambiente de cultivo celular, ou seja, durante o processo de diferenciação celular que ocorre a 37°C, não há condição de hipóxia, presença de citocinas inflamatórias ou outros fatores que gerem dano oxidativo, o que o torna bem diferente do micro ambiente *in vivo* dos pacientes com AF. É sabido que pacientes com AF apresentam níveis aumentados de citocinas e mediadores inflamatórios como IL-8, TNF-alfa e PGE-2 (Lanaro et al., 2006),

que provavelmente possam modular também a expressão gênica das moléculas de adesão quando na circulação sanguínea.

Outro trabalho realizado em nosso laboratório (Almeida et al., observações não publicadas) demonstrou que células K562 quando tratadas por 48 horas com o composto Bay 41-2272, tiveram os níveis de expressão de gama globina aumentados em relação às células sem tratamento com concomitante aumento nos níveis de GMPc. O mecanismo de ação deste composto ocorre através da ligação à subunidade alfa de GCs na região das cisteínas (Cys) 238 e 243 com conseqüente conversão de GTP em GMPc, independente de NO. Uma cultura controle foi tratada com 60 nM de Bay. A expressão de gama globina nas células tratadas com Bay aumentou cerca de 3x no 10º dia de cultura, indicando que o composto foi eficaz em elevar os níveis de RNAm de gama globina. A expressão de GCs alfa subunidade aumentou aproximadamente 2x com o tratamento com Bay no dia 10 de coleta, sugerindo que esta via foi ativada. A subunidade beta de GCs não apresentou nenhuma diferença com o tratamento com Bay 41-2272, como esperado. Enquanto a via GCs-GMPc parece não estar envolvida no aumento da expressão constitutiva de gama globina em pacientes com AF, a ativação farmacológica (Bay 41-2272) desta via parece capaz de aumentar gama globina apoiando o trabalho de Ikuta et al. 2001 e realçando a complexidade dos mecanismos envolvidos na produção de HbF.

Tomados em conjunto, os dados deste trabalho resultam no primeiro estudo que compara o perfil de expressão gênica basal de gama globina ao longo da diferenciação eritróide de pacientes com AF e controles, sugerindo uma possível participação dos nucleotídeos cíclicos (principalmente AMPc) na regulação deste gene. Provavelmente, as células tronco dos pacientes com AF são constitutivamente diferentes às dos controles ou há uma seleção entre as células F com maior produção de HbF e estas proliferam e diferenciam ao longo do andamento da cultura, estabelecendo esse perfil. O esclarecimento da participação destes nucleotídeos cíclicos neste processo de diferenciação pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos no aumento da HbF e eventualmente para a fisiopatologia da anemia falciforme e identificação de novos alvos para a regulação farmacológica da hemoglobina fetal.

6- CONCLUSÕES

- Este é o primeiro estudo que compara diferenciação eritróide de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais;
- Os níveis de RNAm de gama globina estão mais expresso nas culturas de pacientes com anemia falciforme no dia 13 (predomínio de eritroblastos ortocromáticos);
- Os genes da PDE3B e eNOS provavelmente não participam da regulação dos níveis de gama globina ao longo da diferenciação eritróide;
- A via do GMPc não tem participação direta no aumento dos níveis de RNAm de gama globina em cultura de células CD34⁺ *in vitro* de pacientes com anemia falciforme;
- O ativador de GCs independente de NO (Bay 41-2272) induz aumento nos níveis de RNAm de gama globina e GCs alfa em cultura de células CD34⁺ de indivíduos normais;
- A via do AMPc pode estar envolvida na modulação da expressão gênica de gama globina porém experimentos futuros são necessários para o esclarecimento deste mecanismo.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anyaegebu, C.C.; Okpala, I.E.; AkenÓva, A.Y.; Salimonu, L.S. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anemia. **Eur J Haematol.** 60: 267-8, 1998.

Assis, A.; Conran, N.; Canalli, A.A.; Lorand-Metz, I.; Saad, S.T.; Costa, F.F. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectina. **Acta Haematol.** 113(2): 130-6, 2005.

Ballas, S.K.; Smith, E.D. Red blood cell changes during the evolution of sickle cell painful crisis. **Blood.** 79: 2154-63, 1992.

Beavo, J.A.; Conti, M.; Heasley, J. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Mol Pharmacol.** 46: 3399-405, 1994.

Beavo, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol Rev.** 75: 725-48, 1995.

Becker, E.M.; Alija, C.A.; Apeler, H.; Gerzer, R.; Minuth, T.; Pleiß, U.; et al. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. **BMC Pharmacology.** 13(1): 1-12, 2001.

Bolger, G.B. Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. **Cell Signal.** 6: 851-9, 1994.

Bundy, R.; Marczin, N.; Chester, A.H.; Yacoub, M. Differential regulation of DNA synthesis by nitric oxide and hydroxyurea in vascular smooth muscle cells. **Am J Phys.** 277: 1799-807, 1999.

Canalli, A.A. Função e expressão das integrinas nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme. Tese de mestrado. **Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.** 2004.

Canalli, A.A.; Conran, N.; Fattori, A.; Saad, S.T.O.; Costa, F.F. Increased adhesive properties of eosinophils of sickle cell anemia. **Experimental Hematology.** 32: 728-34, 2004.

Castro, O.; Branbilla, D. J.; Thorington, B.; Reindorf, C.A.; Scott, R.B.; Gillette, P. et al. The acute syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The cooperative study of sickle cell disease. **Blood**. 643-9, 1994.

Charache, S.; Terrin, M.L.; Moore, M.D.; Dover, G.J.; Barton, F.B.; Eckert, S.V. et al. Effect of hydroxyurea on frequency of painful crises in sickle cell anemia. **N Engl J Med**. 332: 1317-22, 1995.

Chin, J.H.; Azhar, S.; Hoffman, B.B. Inactivation of endothelium derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. **J Clin Invest**. 89: 10-8, 1992.

Cokic, V.P.; Smith, R.D.; Beleslin-Cokic, B.B.; Njoroge, J.M.; Miller, J.L.; Gladwin, M.T. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-depend activation of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest**. 111(2): 231-9, 2003.

Conran, N.; Ferreira, H.H.A.; Lorand-Metze, I.; Thomazzi, S.M.; Antunes, E.; de Nucci, G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. **Br J Pharmacol**. 134: 632-8, 2001.

Conran, N.; Oresco-Santos, C.; Acosta, H.C.; Fattori, A.; Saad, S.T.; Costa, F.F. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br J Haematol**. 124(4): 547-54, 2004.

Conti, M.; Nemoz, G.; Sette, C.; Vicini, F. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **Endocr Rev**. 16: 370-89, 1995.

Corbin, J.D.; Francis, S.H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. **J Biol Chem**. 274: 13729-32, 1999.

Costa, F.F. Anemia Falciforme. In: Zago, M.A.; Falcão, R.P.; Pasquini, R. Hematologia, Fundamentos e Prática. 1ª edição, São Paulo. **Atheneu**. Cap7, p.289-308, 2001.

Croisille, L.; Chiron, M.; Vainchenker, W.; Romeo, P.H.; Rince, P. et al. Diamond-blackfan anemia with mutations in RPS19 gene: a different pattern of in vitro erythroid differentiation?. **Blood**. 94(10) suppl 1, 414a, 1999.

De Franceschi, L.; Corrocher, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**. 89: 348-56, 2004.

Denninger, J.W.; Marletta, M.A. Guanylate ciclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Bioch et Biophysica Acta**. 1411: 334-50, 1999.

Evgenov, O.V.; Pacher, P.; Schmidt, P.M.; Hasko, G.; Schmidt, H.H.H.W.; Stasch, J.P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nature Reviews**. 5: 755-68, 2006.

Fadlon, E.; Vordermeier, S.; Pearson, T.C.; Mire-Sluis, A.R.; Dumonde, D.C.; Phillips, J.; et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. **Blood**. 91(1): 266-74, 1998.

Fibach, E.; Manor, D.; Oppenheim, A.; Rachmilewitz, E.A. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. **Blood**. 73: 100-3, 1989.

Frenette, P.S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. **Curr Opin in Hematol**. 9: 101-6, 2002.

Gambero, S.; Canalli, A.A.; Traina, F.; Albuquerque, D.M.; Saad, S.T.O.; Costa, F.F.; Conran, N. Therapy with hydroxyurea is associated reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. **Eur J Haematol**. 78:144-51, 2007.

Gladwin, M.T.; Schechter, A.N. Nitric oxide therapy in sickle cell disease. **Semin Hematol**. 38: 333-42, 2001.

Gladwin, M.T.; Shelhamer, J.H.; Ognibene, F.P.; Pease-Fye, M.E.; Nichols, J.S.; Link, B., et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol**. 116: 436-44, 2002.

Halsey, C.; Roberts, I.A. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br J Haematol**. 120(2): 177-86, 2003.

Hebbel, R.P. Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. **N Engl J Med**. 342(25): 1910-2, 2000.

Herrick, J.B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch Intern Med**. 6: 517-21, 1910.

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (NY)**. 11(9): 1026-30, 1993.

Humbert, P.; Niroomand, F.; Fischer, G.; Mayer, B.; Koesling, D.; Hinsch, K. et al. Purification of soluble guanylate cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. **Eur J Biochem**. 190: 273-8, 1990.

Ignarro, L.J.; Byrns, R.E.; Buga, G.M.; Wood, K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ Res**. 61: 866-79, 1987.

Ikuta, T.; Ausenda, S.; Cappelini, M.D. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**. 98(4): 1847-52, 2001.

Inoue, A.; Kuroyanagi, Y.; Terui, K.; Moi, P.; Ikuta, T. Negative regulation of γ -globin gene expression by cyclic AMP-dependent pathway in erythroid cells. **Experimental Hematology**. 32: 244-53, 2004.

Ingram, V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. **Nature**. 178: 792-4, 1956.

Jeon, Y.H.; Heo, Y.S.; Kim, C.M.; Hyun, Y.L.; Lee, T.G.; Ro, S. et al. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. **Cell Mol Life Sci**. 62: 1198-220, 2005.

Kasschau, M.R.; Barabino, G.A.; Bridges, K.R.; Golan, D.E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood**. 87: 771-80, 1996.

Keefer, J.R.; Schneidereith, T.A.; Mays, A.; Purvis, S.H.; Dover, G.J. et al. Role of Cyclic Nucleotides in Fetal Hemoglobin Induction in Cultured CD34⁺ Cells. **Experimental Hematology**. 34: 1150-60, 2006.

King, S.B. Nitric oxide production from hydroxyurea. **Free Radical Biology & Medicine**. 37(6): 737-44, 2004.

Kleinbongard, P.; Schulz, R.; Rassaf, T.; Lauer, T.; Dejam, A.; Jax, T.; Kumara, I.; Gharini, P. et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. **Blood**. 107: 2943-51, 2006.

Knorr, N.S.; Stuehr, D.J.; Nathan, C.F. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. **J Exp Med**. 174: 761-7, 1991.

Labie, D.; Elion, J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia. **Pathol Biol**. 47: 7-12, 1999.

Lanaro, C.; Franco-Penteado, C.; Conran, N.; Saad, S.T.O.; Costa, F.F. Anti-inflammatory effect of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. **Blood**. 108(11): suppl 2, 27b, 2006.

Lassmann, G.; Thelander, L.; Graslund, A. EPR stopped-flow studies of reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. **Biochem Biophys Res Commun**. 188(2): 879-87, 1992.

Lepoivre, M.; Flaman, J.M.; Bobe, P.; Lemaire, G.; Henry, Y. Quenching of tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. **J Biol Chem**. 269: 21891-7, 1994.

Lincoln, T.M.; Cornwell, T.L.; Komalavilas, P.; Macmillan-Crow, L.A.; Boerth, N. in Biochemistry of Smooth Muscle Contraction (Barany, M., ed.), pp.257-68, Academic Press, London, 1996.

Lohse, M.J.; Förstermann, U.; Schmidt, H.H.H.W. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. **Naynyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. 358: 111-2, 1998.

Lopez, B.L.; Barnett, J.; Balles, S.R.; Christopher, T.A.; Davis-Moon, L.; Ma, X.L. Nitric oxide metabolite levels in acute vaso-occlusive crisis. **Acad Emerg Med**. 3: 1098-103, 1996.

Lopez, B.L.; Kreshak, A.A.; Morris, C.R.; Davis-Moon, L.; Ballas, S.K.; Ma, X.L. L-arginine levels are diminished in adult acute vaso-occlusive sickle cell crisis in the emergency department. **Br J Haematol**. 120: 532-4, 2003.

Mack, A.K.; Kato, G.J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **The Int J of Biochemistry & Cell Biology**. 2006, *in press on line*.

Manodori, A.B.; Barabino, G.A.; Lubin, B.H.; Kuypers, F.A. Adherence of phosphatidyl-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. **Blood**. 95: 1293-300, 2000.

Mehats, C.; Andersen, C.B.; Filopanti, M.; Jin, S.L.; Conti, M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. **Trends Endocr Met**. 13: 29-35, 2002.

Meijerink, J.; Mandigers, C.; Loch, L. V.; Tönnissen, E.; Goodsaid, F.; Raemaekers, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. **J Mol Diag**. 3(2): 55-61, 2001.

Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Gryglewski, R.J. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. **Proc Natl Acad Sci USA**. 83: 9164-8, 1986.

Morris, C.R.; Kuypers, F.A.; Larkin, S.; Sweeters, N.; Simon, J.; Vichisky, E.P. et al. Arginine therapy: a novel strategy to induce NO production in sickle cell disease. **Br J Haematol**. 111: 498-500, 2000.

Morris, C.R.; Vichinsky, E.P.; van Warmerdam, J.; Machado, L.; Larkin, S.; Kuypers, F.A. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. **Blood suppl**. 3262, 2001.

Mosseri, M.; Bartlett-Pandite, A.N.; Wenc, K.; Isner, J.M.; Weinstein, R. Inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by sickle erythrocytes. **Am Heart J**. 126(2): 338-46.

Murad, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz J Med Biol Res**. 32: 1317-27, 1999.

Nahavandi, M.; Tavakkoli, F.; Wyche, M.Q.; Perlin, E.; Winter, W.P.; Castro, O. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Br j Haematol**. 119: 855-7, 2002.

Okpala, I.E.; Daniel, I.; Haynes, R.; Odoemene, D.; Goldman, J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. **Eur J Haematol**. 69: 135-44, 2002.

Owens, M. A. & Loken, M. R. flow cytometry principles for clinical laboratory practice. New York – EUA. **Ed. Wiley Liss.** 224p, 1995.

Palmer, R.M.; Ferrige, A.G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** 327: 524-6, 1987.

Palmer, R.M.; Ashton, D.S.; Moncada, S. vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature.** 333: 664-6, 1988.

Pauling, L.; Itano, H.A.; Singer, S.J.; Wells, I.C. Sick cell anemia: A molecular disease. **Science.** 110: 543-8, 1949.

Perry, M.J.; Higgs, G.A. Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors. **Curr Opin in Chem Biol.** 2: 472-81, 1998.

Perutz, M.F.; Rossmann, M.G.; Cullins, A.F.; Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution obtained by X-ray analysis. **Nature.** 185: 416-22, 1960.

Platt, O.S.; Brambilla, D.J.; Rosse, W.F.; Milner, P.F.; Castro, O.; Steinberg, M.H.; et al. Mortality in sickle cell disease: Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med.** 330: 1639-44, 1994.

Ramalho, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. v1, 160p., 1986.

Reiter, C.D.; Wang, X.; Tanus-Santos, J.E.; Hogg, N.; Cannon, R.O.; Schechter, A.N. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. **Nature Medicine.** 8(12): 1383-9, 2002.

Rodrigues, G.I.; Kuhn, J.G.; Weiss, G.R.; Hilsenbeck, S.G.; Eckardt, J.R.; Thurman, A., et al. A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. **Blood.** 91(5): 1533-41, 1998.

Rosse, W.F.; Mohandas, N.; Petz, L.D.; Steinberg, M.H. New views of sickle cell disease, pathophysiology and treatment. **Hematology** (Am Soc Hematol Educ Program): 2-17, 2000.

Rotella, D.P. Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. **Nat Rev Drug Discov.** 1: 674-82, 2002.

Rubanyi, G.M.; Vanhoute, P.M. Superoxide anions and hyperoxis in active endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol.** 290: H-822-H827, 1986.

Schmidt, H.H.H.W.; Lohmann, S.M.; Walter, U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. **Biochem Biophys Acta.** 1178(2): 153-75, 1993.

Schmittgen, T. D.; Zakrajsek, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **J Biochem Biophys Met.** 46: 69-81, 2000.

Serjeant, G.R.; Serjeant, B.E. Sick cell disease. **Oxford University Press**, New York. 3rd edition, 2001.

Shiu, Y.; Udden, M.M.; McIntire, L.V. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. **Blood.** 95(10): 3232-41, 2000.

Soderling, S.H.; Beavo, J.A. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. **Curr Opin Cell Biol.** 12: 174-9, 2000.

Space, S.L.; Lane, P.A.; Pickett, C.K.; Weil, J.V. Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. **Am J Hematol.** 63(4): 200-4, 2000.

Steinberg, M.H.; Forget, B.G.; Higgs, D.R.; Nagel, R.L. Disorders of Hemoglobin. **Cambridge University Press.** 2001.

Stone, J.; Marletta, M. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. **Biochemistry.** 33: 5636-40, 1994.

Stuart, M.J.; Nagel, R.L. Sick cell disease. **Lancet.** 364(9442):1343-60, 2004.

Sun, J. Z.; Kaur, H.; Halliwell, B.; Li, X.Y.; Bolli, R. Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia *in vivo*. **Circ Res.** 75: 534-49, 1993.

- Torphy, T.J. Phosphodiesterase isozymes. **Am J Respir Crit Care Med.** 157: 351-70, 1998.
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 3(7): 1-12, 2002.
- Yarbro, J.W. Mechanism of action of hydroxyurea. **Seminars on Oncology.** 19: 1-10, 1992.
- Yue, T.L.; McKenna, P.J.; Gu, J.L.; Cheng, H.Y, Ruffolo, R.R.; Feuerstein, G.Z. Carvedilol, a new antihypertensive agent, prevents lipid peroxidation and oxidative injury to endothelial cells. **Hypertension.** 22:922-8, 1993.
- Yuen, P.; Doolittle, L.; Garbers, D. Dominant negative mutants of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **J Biol Chem.** 269: 791-3, 1994.
- Watson, J.; Stahman A.W.; Billclo, F.P. The significance of the paucity of sickle cells in newborn negro infants. **Am J Med Sci.** 215: 419-23, 1948.
- Zago, M.A.; Falcão, R.P.; Pasquini, R. Hematologia – Fundamentos e Prática. São Paulo: Ed. Atheneu; 2004. p.279-287.

8- ANEXOS

ANEXO 1

Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido (pacientes)

Carta de consentimento livre e esclarecido para participação no estudo

“Expressão de GCs e produção de GMPc durante a diferenciação eritrocitária de pacientes com anemia falciforme”

Nome do paciente:.....

Idade:anos

RG:

HC:.....

Endereço:

.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade ou incapacitado):

.....

RG: Grau de parentesco:

Endereço:

.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (volume 50 ml) a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente de que este sangue será utilizado para um projeto de estudo das vias metabólicas de pacientes com hemoglobinopatias que tem como objetivo comparar o perfil das expressões GCs e gama globina e a produção de GMPc durante as diferentes etapas de diferenciação das células eritróides de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais em cultura de células de duas fases. No Brasil a AF afeta grande número de indivíduos (1500 nascimentos por ano), e resultados anteriores indicaram que os níveis basais de GMPc são aumentados nas hemácias de pacientes com anemia falciforme, indicando um aumento no metabolismo de NO nestas células. Considerando esse aumento na produção de GMPc em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme e a dúvida das recentes descobertas que a produção de GMPc possa estar envolvida no aumento da produção de HbF nas células da linhagem

eritrocitária, viemos então a realizar esse projeto, uma vez que ele pode contribuir para o melhor entendimento do mecanismo fisiopatológico e de forma indireta para a melhoria da terapia da anemia falciforme. A participação de indivíduos sadios na pesquisa não implica em nenhum benefício para os mesmos, uma vez que servirão apenas como controles normais de GMPc e expressão de GCs e gama globina. Estou ciente que os riscos do procedimento são os mesmos que terei com a coleta das amostras venosas de rotina (hematoma (“roxidão”) no local da punção venosa, processo infeccioso local). Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar pela Carolina Lanaro (F: 3521-8734, pesquisadora responsável pelo estudo) ou o Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (F:3521-8734, orientador responsável pelo estudo), Hemocentro, UNICAMP. Qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da FCM, UNICAMP, Fone: 3521-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....

Assinatura do paciente

.....

Assinatura do responsável legal

.....

Assinatura do pesquisador legal

Campinas,/...../.....

ANEXO 2

Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido

(voluntários)

Carta de consentimento livre e esclarecido para participação no estudo “**Expressão de GCs e produção de GMPc durante a diferenciação da linhagem eritrocitária de pacientes com anemia falciforme**”

Nome do voluntário:

.....

Idade:anos RG:

Endereço:.....

.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (volume 50 ml) a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente de que este sangue será utilizado como controle para comparação num projeto de pesquisa de estudos de via metabólicas de pacientes com hemoglobinopatias, que tem como objetivo comparar o perfil das expressões GCs e gama globina e a produção de GMPc durante as diferentes etapas de diferenciação das células eritróides de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais em cultura de células de duas fases. No Brasil a AF afeta grande número de indivíduos (1500 nascimentos por ano), e resultados anteriores indicaram que os níveis basais de GMPc são aumentados nas hemácias de pacientes com anemia falciforme, indicando um aumento no metabolismo de NO nestas células. Considerando esse aumento na produção de GMPc em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme e a dúvida das recentes descobertas que a produção de GMPc possa estar envolvida no aumento da produção de HbF nas células da linhagem eritrocitária, viemos então a realizar esse projeto, uma vez que ele pode contribuir para o melhor entendimento do mecanismo fisiopatológico e de forma indireta para a melhoria da terapia da anemia falciforme. A participação de indivíduos sadios na pesquisa não implica em nenhum benefício para os mesmos, uma vez

que servirão apenas como controles normais de GMPc e expressão de GCs e gama globina. Estou ciente que os riscos do procedimento são hematoma (“roxidão”) no local da punção venosa e processo infeccioso local. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento. Sei ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar pela Carolina Lanaro (F: 3521-8734 pesquisadora responsável pelo estudo) ou o Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (F: 3521-8734, orientador responsável pelo estudo), Hemocentro, UNICAMP.

Qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da FCM, F: 3521-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimento sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....

Assinatura do voluntário

.....

Assinatura do pesquisador legal

Campinas,/...../.....

Soluções utilizadas

Solução de PBS

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g
H ₂ O q.s.p.	1000ml

Ajustar o pH para 7,2 com HCl e filtrar em filtro estéril antes do uso.

Solução de PBS + ACD+ BSA

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g
BSA	0,5%
ACD	0,6%
H ₂ O q.s.p.	1000ml

Ajustar o pH para 7,2 com HCl e filtrar em filtro estéril antes do uso.

Tampão de lise

NH ₄ Cl	8,3g
KHCO ₃	1,0g
H ₂ O q.s.p.	1000ml

Filtrar a solução em filtro estéril antes do uso.