FLÁVIA CHAGAS COSTA

Este exemplar corresponde à versão final da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Flávia Chagas Costa.**
Campinas, 21 de fevereiro de 2005.

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

PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA CARACTERIZAM MECANISMOS DE AÇÃO DA HIDROXIURÉIA NA ANEMIA FALCIFORME

CAMPINAS

2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

FLÁVIA CHAGAS COSTA

PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA CARACTERIZAM MECANISMOS DE AÇÃO DA HIDROXIURÉIA NA 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 Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: *PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA*

CAMPINAS

2005

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C823p
V EX
TOMBO BC/ 65256
PROC 16.1.0080-05
C D
PREÇO 11,00
DATA 11/08/05
Nº CPD
bib-id 360433

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C823p

Costa, Flávia Chagas
Padrões de expressão gênica em células da medula óssea caracterizam mecanismos de ação da hidroxiuréia na anemia falciforme. / Flávia Chagas Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

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

1. Anemia falciforme. 2. Hemoglobina fetal. 3. Expressão gênica. 4. Hemoglobina falciforme. 5. Anemia Hemolítica . 6. Hemoglobinopatias - Diagnóstico. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

Banca examinadora da tese de Doutorado

Fernando Ferreira Costa

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Membros:

1. Maria Stella Figueiredo

2. Sandra Fátima Maria Gualandro

3. Maria de Fátima Sonati

4. Gonçalo Marante Guimarães Pereira

5. Fernando Ferreira Costa

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

Data: 21/02/05

AGRADECIMENTOS

Ao PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA, pela orientação e confiança, e acima de tudo pelo seu exemplo de visão científica, contribuindo muito para a minha formação profissional, toda minha gratidão.

Ao PROF. DR. FERNANDO LOPES ALBERTO, por sua grande contribuição na avaliação e correção dos dados.

Ao ANDRÉ FATTORI, não só pela ajuda com os pacientes, mas também por acreditar no trabalho, pela força nos momentos críticos e pelas "bênçãos".

Ao ANDERSON, pela grande ajuda e incentivo quando tudo ainda estava no começo e pelas intermináveis horas passadas no laboratório, que se transformaram numa boa amizade.

Ao TIAGO e a LUCIANA, pelo exemplo de profissionalismo, pela GRANDE amizade e confiança nos momentos que eu mesma não acreditava mais.

À LENA, minha "mãe" e amiga. Pelo carinho e incentivo sempre presente.

À HÉLVIA, pelo companheirismo, desabafos e pela amizade.

Aos "MENINOS" da bio-informática pelas tabelas, programas e, sobretudo, pelo crescimento e amadurecimento conjunto.

À DULCINÉIA, pela docilidade e ajuda já no final de tudo. E a "FIA" (ÂNGELA), pelas bênçãos, contos. A vocês duas, pelo apoio e confiança!

À CAMILA ORESCO, pelas horas de companheirismo e ajuda com os experimentos de real-time e estatística.

À **TODOS** do laboratório, por toda ajuda e por tornarem a convivência mais saudável a agradável.

As amigas TEREZA e M. EUGÊNIA, pelo apoio constante, risadas, churrascos e viagens.

Ao ANDRÉ CECCHIA, pelo carinho com as figuras, simplesmente por amizade!

Ao WANTUIR, um amigo recente porém AMIGO!

À minha grande amiga SOLANGE, que acompanhou tudo, sempre apoiando e incentivando. Obrigada por estar sempre comigo.

AO PEDRO PAULO, que sempre me incentivou e acreditou em mim, por sua "presença", apesar de toda a distância.

Aos MEUS PAIS LÚCIO FLÁVIO e REGINA, pelo amor puro e incondicional, pelo apoio, orgulho e confiança, mesmo nos momentos que eu pensei não ser capaz de ir adiante... Vocês são a minha força!

Ao MEU IRMÃO LEONARDO, que acompanhou o começo de perto, que me ajudou muito com TUDO, e que a maneira dele, sempre me apoiou e se orgulhou de mim.

Á MINHA AVÓ NOEMI, que mesmo sem compreender o que é fazer pesquisa, sempre teve uma palavra de apoio e carinho. Por me ajudar quando as coisas ficavam inviáveis, demonstrando seu amor e confiança.

À MARIA LÚCIA, mais que minha tia, minha amiga, principalmente quando tudo ficou crítico. Obrigada por ser sempre por mim, e estar comigo!

A TODA minha FAMÍLIA, pelo amor, pelo grande apoio, orgulho e confiança em tudo o que eu sempre fiz. Vocês fazem parte desta conquista

À TODOS VOCÊS que sonharam comigo, dedico com TODO AMOR e CARINHO o resultado deste sonho, e também os frutos colhidos. Sem vocês, eu não seria nada do que sou hoje e não chegaria aonde cheguei.

"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto."

Albert Einstein

"Você não pode ensinar nada a um homem; Você pode apenas ajudá-lo a encontrar a resposta dentro dele mesmo".

Galileu Galilei

"...De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre recomeçando, a certeza de que precisamos continuar, e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminarmos. Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo, da queda, um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte e da procura um encontro."

Fernando Sabino

O presente trabalho foi realizado no *Laboratório de Biologia Molecular e Terapia Gênica* do Centro de Hematologia e Hemoterapia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob a orientação *do Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa*, na vigência do auxílio concedido pela *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (*CAPES*).

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO ..... *xxxiii*

ABSTRACT ..... *xxxvii*

1 - INTRODUÇÃO 41

1.1 - Introdução e Revisão da Literatura 43

1.2 - A Anemia Falciforme 46

1.2.1 - Moduladores de gravidade 49

1.2.2 - Indução do Aumento de Hemoglobina Fetal pela Hidroxiuréia 50

1.3 - Estudos de Expressão Gênica 55

2 - OBJETIVOS 59

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS 63

3.1 - Casuística 65

3.2 - Extração do RNA Total 66

3.3 - *SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)* 67

3.4 - Análise de Bioinformática das Seqüências Geradas e Análise Estatística 73

3.5 - Síntese do cDNA 74

3.6 - PCR Semiquantitativo (RT-PCR) 75

3.7 - PCR Quantitativo em Tempo Real – "Real Time PCR" 77

3.8 - Análise Estatística dos Dados Gerados por Real Time PCR 84

4 - RESULTADOS 85

4.1 - Análise Global da Expressão Gênica do Perfil HbS 87

4.2 - Análise Global da Expressão Gênica do Perfil HbSHU 89

4.3 - Análise Comparativa Entre os Perfis HbS x HbSHU 92

4.4 - Classificação Funcional dos Perfis HbS e HbSHU 99

4.5 - Validação dos Dados de SAGE por RT – PCR 107

4.6 - Análise da Expressão de Genes em Pacientes com AF 113

5 - DISCUSSÃO 117

6 - CONCLUSÕES 125

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 129

8 - ANEXOS 139

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa assinado por todos os pacientes 141

ANEXO 2 - Carta de Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética 145

Hb	Hemoglobina
Nm	Nanômetros
KDa	kilodaltons
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HbA	Hemoglobina A
AF	Anemia Falciforme
HbSS	Indivíduos homozigotos para a mutação no códon 6 do gene da β globina
HU	Hidroxiuréia
VCM	Volume corpuscular médio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Na	Sódio
K	Potássio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementar
BFU-E	*Burst forming unit erythroid*

NO	Óxido Nítrico
sGC	Guanilato ciclase solúvel
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CysNO	S-nitrosocisteína
MEL	*Murine Erythroleukaemia Cells*
SSH	*Supression subtractive hybridization*
SAGE	*Serial analysis of gene expression*
Mg	Miligramas
Kg	Kilogramas
G	Gramas
Dl	Decilitros
Pg	Picogramas
L	Litros
Ml	Mililitros
µM	Micromolar
Ng	Nanogramas
RPM	Rotações por minuto
DEPC	Dietilopirocarbonato
µl	Microlitros

Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
dNTPs	Mix de dinucleotídeos
W	*Watts*
°C	Graus Celsius
CGAP	*Cancer Genome Anatomy Project*
cDNA	DNA complementar
µg	Microgramas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
mM	Milimolar
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
Ct	*Threshold cycle*
ΔCt	Ct do gene alvo menos o Ct do gene endógeno
ΔΔCt	ΔCt da amostra a ser quantificada menos o ΔCt da amostra referência
2 ΔΔCt	Fórmula matemática utilizada para quantificação em PCR em tempo real
TM	*Melting temperature*
Ng	Nanogramas
EST	*Expressed sequence tags*
ORF	*Open reading frame*

Pág.

Tabela 1 - Dados hematológicos do paciente com AF cuja amostra de medula óssea foi coletada para a construção dos perfis..... 66

Tabela 2 - Genes escolhidos para validação por RT-PCR: seqüência de *primers* e tamanho dos fragmentos gerados..... 76

Tabela 3 - Genes escolhidos e seqüência de *primers* utilizados no PCR quantitativo em tempo real..... 78

Tabela 4 - Concentrações dos *primers* e eficiências obtidas com os mesmos..... 79

Tabela 5 - Temperatura de dissociação e tamanho dos *amplicons* gerados pela amplificação dos genes por PCR quantitativo em tempo real..... 83

Tabela 6 - Dados gerais do perfil HbS..... 87

Tabela 7 - 50 transcritos mais expressos no perfil HbS..... 88

Tabela 8 - Dados gerais do perfil HbSHU..... 90

Tabela 9 - 50 transcritos mais expressos no perfil HbS..... 91

Tabela 10 - 50 transcritos com maior repressão da expressão (com $P < 0,05$ e *fold* 5)..... 95

Tabela 11 - 50 transcritos com maior indução da expressão (com $P < 0,05$ e *fold* 5)..... 97

Tabela 12 - Apresentação dos genes presentes nas categorias funcionais com maior indução da expressão (mais relevantes) em nível dois da ontologia *funções moleculares*..... 103

Tabela 13 - Apresentação dos genes presentes nas categorias funcionais com maior repressão da expressão (mais relevantes) em nível dois da ontologia *funções moleculares*..... 104

Tabela 14 - Apresentação dos genes presentes nas categorias funcionais com maior indução ou repressão da expressão em nível três da ontologia *funções moleculares*..... 107

Tabela 15 - Genes selecionados para a validação: n.° *tags* referente a expressão de cada um dos genes nos perfis..... 108

Pág.

Figura 1 - Organização cromossômica dos genes da globina humana..... 43

Figura 2 - *Switich* da hemoglobina e sítios de eritropoese..... 45

Figura 3 - Aspectos Fisiopatológicos da Anemia Falciforme..... 47

Figura 4 - Eletroforese de uma amostra de RNA para verificação da qualidade da amostra a ser utilizada para a construção de um dos perfis..... 67

Figura 5 - Esquema ilustrativo da metodologia de *SAGE*..... 68

Figura 6 - Eletroforeses em gel de agarose para verificação da eficiência de duas etapas do método de *SAGE*..... 70

Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para verificação de outros três passos do *SAGE*..... 72

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose para verificar a eficiência da clonagem dos insertos gerados pelo *SAGE*..... 73

Figura 9 - Gráficos dos testes de eficiência com os *primers* utilizados no PCR quantitativo em tempo real..... 80

Figura 10 - Representação gráfica da curva de amplificação dos genes utilizados no PCR quantitativo em tempo real..... 82

Figura 11 - Morfologia da curva de dissociação dos genes amplificados por PCR quantitativo em tempo real..... 84

Figura 12 - Diagrama de Venn ilustrando os transcritos diferencialmente expressos que apresentaram $P < 0,05$..... 93

Figura 13 - Diagrama de Venn ilustrando os transcritos diferencialmente expressos que apresentaram P < 0,05 e fold..... 94

Figura 14 - Gráfico da análise funcional dos transcritos diferencialmente expressos em nível um da ontologia *processos biológicos*..... 100

Figura 15 - Gráfico da análise funcional dos transcritos diferencialmente expressos em nível dois da ontologia *processos biológicos*..... 101

Figura 16 - Gráfico da análise funcional dos transcritos diferencialmente expressos em nível um da ontologia *funções moleculares*..... 102

Figura 17 A - Gráfico da análise funcional dos transcritos diferencialmente expressos em nível dois da ontologia *funções moleculares*..... 105

Figura 17 B - Gráfico da análise funcional dos transcritos diferencialmente expressos em nível dois da ontologia *funções moleculares*..... 106

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose ilustrando as amplificações dos genes por RT-PCR em células da medula óssea do paciente com AF..... 109

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose ilustrando as amplificações dos genes selecionados por PCR em células K562 tratadas e não tratadas com HU..... 111

Figura 20 - Gráfico dos resultados obtidos com a amplificação de genes em amostras de leucócitos de pacientes com AF pelo método de PCR quantitativo em tempo real..... 115

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma das mais freqüentes hemoglobinopatias ocorrentes no Brasil. Ela é causada por uma mutação de ponto (G<u>A</u>G → G<u>T</u>G) que leva à produção de uma valina ao invés de um ácido glutâmico no códon seis da β globina, originando uma hemoglobina estruturalmente anormal, a hemoglobina S ($\alpha_2\beta_2^S$). A HbS quando desoxigenada torna-se insolúvel e agrega-se em longos polímeros, fenômeno conhecido como polimerização. A polimerização resulta na alteração do eritrócito e redução de sua deformabilidade, e consequentemente levando a obstrução vascular e lesão tecidual.

Pacientes com AF apresentam em geral anemia hemolítica crônica, atraso no crescimento, infecções repetidas, obstrução vascular, e infartos dolorosos em vários tecidos ou isquemia tecidual. Outros pacientes, entretanto, apresentam evolução clínica mais benigna. Este fenômeno pode ser atribuído à presença de níveis elevados de hemoglobina fetal (HbF), uma vez que elevados níveis desta hemoglobina foram associados a melhor evolução clínica dos pacientes.

Vários agentes farmacológicos vêm sendo utilizados com o objetivo de induzir o aumento da HbF e promover uma melhora na evolução clínica dos pacientes com AF. A hidroxiuréia (HU) é o mais estudado, apesar de seu mecanismo de ação não ser completamente esclarecido.

Este trabalho tem como objetivo analisar o perfil global da expressão gênica em células da medula óssea de um paciente com AF antes e após a administração da HU pela metodologia de *SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)*.

Foram gerados 15.737 transcritos únicos para o perfil HbS e 15.901 para o HbSHU, os quais foram classificados como genes identificados, *"no matches"*, *ESTs* e outras seqüências preditas e anotadas. Quando ambos os perfis foram comparados entre si, 518 transcritos foram ditos como diferencialmente expressos ($P < 0,05$).

A análise funcional comparativa dos 518 transcritos diferencialmente expressos foi realizada de acordo com o *Gene Ontology Consortium* afim de obtermos a classificação funcional destes transcritos.

Os dados deste trabalho apresentados neste trabalho sugerem um forte envolvimento de mecanismos transcricionais e de sinalização celular, bem como vias associadas à classe transportadora de canais e poros. De acordo com os dados gerados neste trabalho, concluímos que a HU produz alterações significativas no padrão de expressão gênica em células da medula óssea de paciente com AF. O estudo de genes envolvidos com essas vias e a identificação de genes novos pode representar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para os pacientes com AF e outras hemoglobinopatias

ABSTRACT

Sickling of red blood cells in sickle cell anaemia (SCA) is the consequence of a single amino acid substitution at codon 6 of the adult β globin gene, producing abnormal haemoglobin S (HbS). The polymerization of deoxygenated sickle haemoglobin ($\alpha_2\beta^S{}_2$) leads to vaso-occlusive events, characterized by ischaemia-reperfusion injury and inflammation. SCA patients suffer widespread end-organ damage due to chronic vaso-occlusive episodes, and high levels of fetal haemoglobin (HbF) have long been recognized to ameliorate the clinical symptoms of SCA by decreasing painful events, transfusions and hospitalizations due to its ability to inhibit the polymerization of HbS.

Several pharmacological agents have been shown to augment HbF production. To date, the prototypic agent for increasing HbF expression in SCA patients is hydroxyurea (HU). Recent multicenter studies with HU have shown that administration of this drug to SCA patients significantly increases HbF production and improves clinical symptoms by reducing the frequency of pain and vaso-occlusive crisis, acute chest syndrome transfusion requirement, hospitalizations and also appears to reduce the mortality in SCA patients. Moreover, some patients appear to benefit from HU even when HbF levels do not increase, suggesting that HU may act by additional mechanisms. The complete pathway by which HU acts still remains unclear.

The aim of this study was to evaluate the global gene expression pattern of human bone marrow cells from a SCA patient before and after the administration of HU, using Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) and two SAGE profiles were generated: HbS and HbSHU.

Comparison of the 15 735 and 15 901 distinct tags from the HbS and HbSHU profiles, represented by identified transcripts and novel tags, 518 tags demonstrated with a differential expression at a statistically significant level ($P < 0.05$) and corresponded to known genes, *ESTs* or "no matches".

The functional classification was performed according to the Gene Ontology Consortium and a total of 518 transcripts were submitted to functional classification.

Our data suggest a recruitment of transcriptional machinery and pathways involved in signal transduction during HU treatment and a stimulation of pathways associated with channel or pore class transporters activity, indicating a decrease in the dehydration status of cells, changing the rheological properties of the cell and, consequently, improving the clinical evolution of SCA. The study of genes associated with these pathways and the description of new genes may also represent a potential tool to identify new targets for the therapy of SCA patients.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Introdução e Revisão da Literatura

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular, com diâmetro de aproximadamente 5,5 nm e peso molecular de 64,4 KDa, cuja principal função é transportar o oxigênio. Cada molécula de Hb é composta por quatro subunidades, duas α e duas β, unidas por um grupamento heme. O heme é um complexo formado por um átomo de ferro situado no interior da estrutura porfirínica que o mantém no estado ferroso e lhe confere a coloração vermelha característica dessa proteína (BUNN, 1997).

As cadeias α, ζ e o pseudogene $\Psi\alpha_1$ (grupamento gênico α) são codificadas no braço curto do cromossomo 16. Os quatro genes funcionais desse grupo são genes duplicados, ou seja, existem dois genes ζ (ζ_2 e ζ_1) e dois genes α (α_1 e α_2). As cadeias ε, γ^G, γ^A, δ, β e o pseudogene $\Psi\beta$ (grupamento gênico β) são codificadas no braço curto do cromossomo 11. A figura ilustra a disposição dos genes ao longo dos cromossomos 11 e 16 (PAPAYANNOPOULOU e STAMATOYANNOPOULOS, 1980).

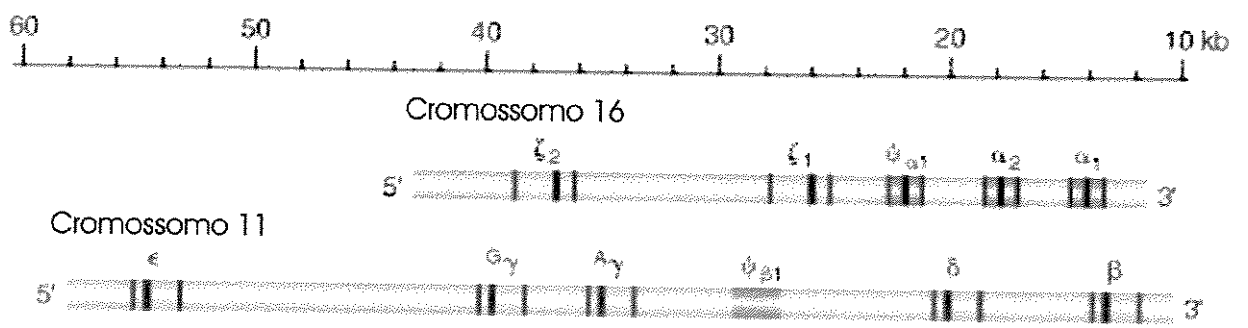


Figura 1 - Organização cromossômica dos genes da globina humana. As cadeias α são dispostas ao longo do cromossomo 16 e cadeias β no cromossomo 11. Os éxons de cada gene estão representados por barras pretas e os íntrons pelas coloridas. Adaptado de *An Introduction to Genetic Analysis* (© 2000 by W. H. Freeman and Company).

Elas são expressas de acordo com o estágio de desenvolvimento durante a ontogênese humana, e possuem uma alta similaridade. A forte similaridade estrutural existente entre essas as cadeias fortalece a hipótese de que esses genes se originaram a partir da duplicação de um único gene em um ponto primitivo da evolução (PAPAYANNOPOULOU e STAMATOYANNOPOULOS, 1980).

As combinações entre as cadeias do grupamento α com as do grupamento β resultam na composição de moléculas distintas de Hb. Essas moléculas são sintetizadas em diferentes fases do desenvolvimento humano: embrionário, fetal e pós-nascimento. O *switch* da síntese da molécula de Hb é definido como a troca na composição destas moléculas durante o desenvolvimento ontogenético e concomitante mudança dos sítios de eritropoese no indivíduo (figura 2) (BARON, 1997).

Durante o período embrionário, desde o seu início, são expressas as hemoglobinas *Gower I* ($\zeta_2\varepsilon_2$), *Gower II* ($\alpha_2\varepsilon_2$) e *Portland* ($\zeta_2\gamma_2$) e o principal sítio de eritropoese é o saco vitelínico. A partir da quinta semana de gestação, começa a síntese da hemoglobina fetal ($\zeta_2\gamma_2$) ou HbF e concomitante mudança do sítio de eritropoese para o fígado e baço. A HbF permanece expressa em níveis elevados até o nascimento do bebê e apresenta uma grande afinidade pelo oxigênio, facilitando desta forma, o transporte de oxigênio através da placenta. Cerca de seis meses após o nascimento, a expressão da HbF decai até cerca de 1%, período em que predominam a expressão das hemoglobinas adultas A ($\alpha_2\beta_2$) e A_2 ($\alpha_2\delta_2$). Em indivíduos adultos normais a HbA compõe cerca de 97% do total da hemoglobina celular, a HbA_2 se mantém em níveis de expressão entre 2 e 3% e a HbF ao redor de 1% e a medula óssea passa a ser o principal sítio de eritropoese (figura 2) (BUNN, FORGET e RANNEY, 1977; BLAU e STAMATOYANNOPOULOS, 1994; BUNN, 1997).

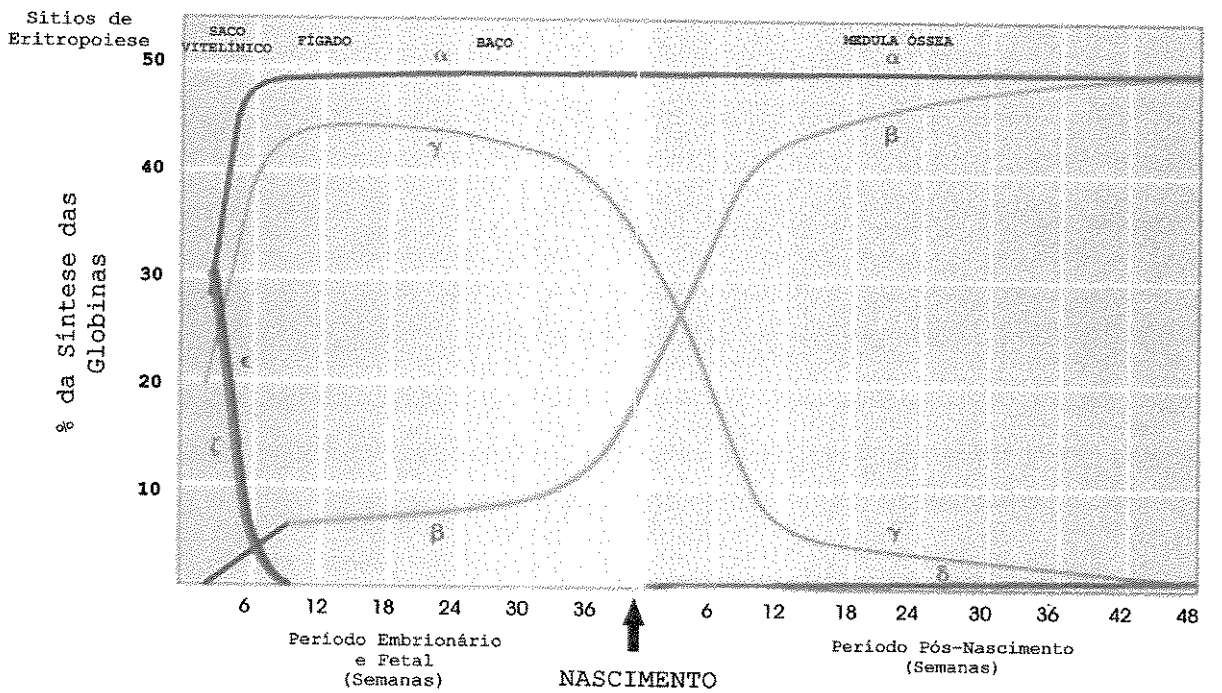


Figura 2 - *Switch* da hemoglobina, ilustrando também os sítios de eritropoese representados acima. Adaptado de *An Introduction to Genetic Analysis* (© 2000 by W. H. Freeman and Company).

O transporte de oxigênio pela molécula de Hb está baseado na capacidade dos seus átomos de ferro combinar reversivelmente com o oxigênio molecular. Estruturalmente, o grupo heme e o aminoácido com o qual o ferro esta ligado é o mesmo em todos os tipos normais de Hb, entretanto suas afinidades ao oxigênio podem variar consideravelmente em decorrência de alterações na estrutura da molécula de hemoglobina (BUNN E FORGET, 1986).

Várias são as alterações moleculares que podem levar a formação de outros tipos de moléculas de Hb com características bioquímicas diferentes das normais e, por isso são denominadas Hb variantes. A maioria das variantes estruturais de moléculas de Hb é originada pela substituição um simples nucleotídeo, resultando na mudança do aminoácido sintetizado. O melhor exemplo de Hb variante estrutural é o da hemoglobina S (HbS), detectada em pacientes portadores da anemia falciforme (AF).

1.2 - A Anemia Falciforme

Um dos primeiros relatos que descreviam o quadro clínico e hematológico da anemia falciforme (AF) foi feito por HERICK em 1910, ao observar que as células eritróides de um de seus pacientes apresentavam um formato peculiar de foice. Este paciente, um jovem negro das Antilhas que havia emigrado para Chicago, apresentava um quadro de anemia grave seguida de icterícia. Inicialmente estes sintomas foram associados com o diagnóstico de anemia hemolítica. Em 1949 Pauling e colaboradores identificaram por meio de eletroforese, uma Hb com padrão migratório diferente. Esta Hb estruturalmente anormal, denominada hemoglobina S (HbS), foi associada então com a anemia cujas células eritróides apresentavam formato de foice. Estes pesquisadores também constataram que a HbS estava presente principalmente na população negra (PAULING *et al,* 1949).

A AF é originária da África e foi trazida pelos escravos para as Américas, e atualmente é encontrada também na Europa e Ásia. Estima-se que no Brasil cerca de 5 a 10% de afros-descendentes sejam portadores da forma heterozigótica da AF. Esses valores são ainda menores no Sudeste do Brasil, com cerca de 2% de portadores (ZAGO *et al.*, 1983; GONCALVES *et al.*, 1994).

Embora haja uma maior incidência na raça negra, os brancos, particularmente aqueles provenientes de regiões do Mediterrâneo (Grécia, Itália), Oriente médio e Índia, também apresentam a doença. No Brasil, além deste fato, ainda ocorre intensa miscigenação racial, o que contribui ainda mais para a presença de alelos falciformes em população não negra.

A anemia falciforme (AF) caracteriza-se clinicamente por anemia hemolítica crônica e fenômenos vasoculsivos, que levam as crises de dor e lesão tecidual progressiva. A denominação AF é utilizada para representar o indivíduos que apresentam a mutação para a hemoglobina S em homozigose (HbSS) (SCHECHTER e RODGERS, 2000).

A hemoglobina S é causada pela substituição de uma adenina por timina (GAG → GTG) no códon seis do gene β globina, levando a produção de uma valina ao invés de um ácido glutâmico. Esta mutação de ponto origina a HbS ($\alpha_2\beta_2^S$), que

desoxigenada torna-se insolúvel e agrega-se em longos polímeros, fenômeno conhecido como polimerização. A polimerização resulta na alteração do eritrócito que assumem forma de foice, fenômeno denominado de falcização, e redução de sua deformabilidade, consequentemente levando a obstrução vascular e lesão tecidual. A figura 3 apresenta um esquema reduzido dos aspectos fisiopatológicos da AF (EMBURY, 1986; LABIE e ELION, 1999).

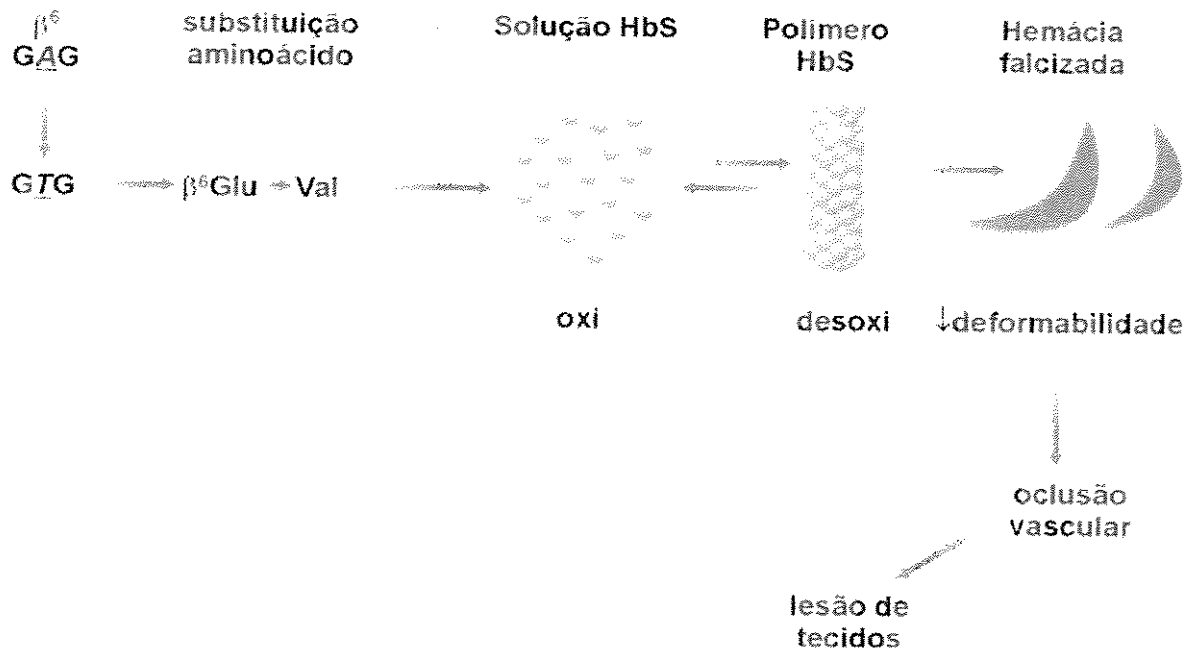


Figura 3 - Aspectos fisiopatológicos da anemia falciforme. Adaptado de "Hematologia: Fundamentos e Prática".

A gravidade clínica dos pacientes com AF é bastante variável. Pacientes com quadro clínico grave apresentam uma anemia hemolítica crônica, atraso no crescimento, infecções repetidas, obstrução vascular, infartos dolorosos em vários tecidos e isquemia tecidual. Outros pacientes, entretanto, apresentam evolução clínica mais benigna (PISSARD e BEUZARD, 1994; RODGERS, 1997).

O grau de polimerização dos eritrócitos sob desoxigenação está intimamente relacionado com a gravidade da doença. Alguns dos fatores que influenciam a polimerização são: concentração de oxigênio, concentração de HbS, grau de desidratação da célula, presença de Hb normais, tempo de circulação dos glóbulos vermelhos na microcirculação, pressão, força iônica e pH (DE FRANCESCHI e CORROCHE, 2004).

As deformações celulares decorrentes do processo da falcização alteram as trocas iônicas, afetam a permeabilidade celular e, como conseqüência, surgem lesões na membrana, o que contribui para encurtar a vida das células. Esse processo pode ser reversível com a oxigenação celular, desde que a membrana da célula não esteja definitivamente alterada. Contudo, depois de repetidos episódios de oxigenação, os eritrócitos tornam-se irreversivelmente falcizados. (NAGEL e STEINBERG, 2001). Além disso, depois de repetidos episódios de falcização e desfalcização, as células falciformes tendem a perder água e potássio (K+), tornando-se desidratadas, o que resulta no aumento da concentração da hemoglobina corpuscular média (HCM) e aumento da polimerização dos eritrócitos (ADRAGNA, FONSECA e LAUF, 1994)

Os eritrócitos irreversivelmente falcizados são seqüestrados e rapidamente retirados da circulação, principalmente por macrófagos do sistema reticulo-endotelial. A destruição aumentada dos eritrócitos é um dos fatores responsáveis pela anemia hemolítica crônica característica da doença. Existe uma forte correlação entre a porcentagem de eritrócitos irreversivelmente falcizados que constituem uma subpopulação de células densas e desidratadas, e a taxa de hemólise (NAGEL e STEINBERG, 2001).

Ainda como conseqüência do processo de falcização, os eritrócitos falcizados aderem-se com maior facilidade ao endotélio vascular, contribuindo para aumentar os episódios de obstrução vascular associados à AF. Há um desequilíbrio entre a vasodilatação e vasoconstrição devido aos numerosos fatores envolvidos neste processo. Esse desequilíbrio acaba favorecendo a vasoconstrição que contribui para um aumento ainda maior da adesão (ADRAGNA, FONSECA e LAUF, 1994; OKPALA *et al.*, 2002).

Os fenômenos vasoclusivos acontecem principalmente em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento, a tensão de oxigênio é baixa e o pH ácido (rim, baço, medula óssea) ou ainda, naqueles órgãos onde há um suprimento

sangüíneo arterial terminal limitado (retina, cabeça do fêmur). A hipóxia decorrente da obstrução vascular gera infartos teciduais e orgânicos, e proporciona crises de dor ou danos teciduais crônicos e provavelmente irreversíveis nos órgãos alvo (LABIE e ELION, 1999).

O aumento da aderência das células falcizadas ao endotélio vascular modulada pela ação de proteínas plasmáticas, pela presença de citocinas, pela ativação das plaquetas e anormalidades no tônus vasomotor são alguns dos fatores que podem conduzir a maior incidência dos fenômenos vasoclusivos característicos na AF (GLOVER *et al.*, 1999). Estudos de fatores liberados por monócitos durante processos inflamatórios, tais como: *Fator de Necrose Tumoral* (*TNF - Tumor Necrosis Factor*) ou *Interleucina 6* (*IL-6 - Interleukin 6*), sugerem que as alterações no endotélio celular aumentam a aderência das células falcizadas, também contribuindo para a vasoclusão presente na AF (GLOVER *et al.*, 1999; DE FRANCESCHI *et al.*, 2003).

Proteínas plasmáticas como a fibronectina, o fibrinogênio, fator de von Willebrand e trombospondina, presentes em níveis elevados no plasma de pacientes AF também estão relacionadas à indução da adesão das células falcizadas ao endotélio vascular (KASSCHAU *et al.*, 1996).

Ainda neste contexto, células endoteliais circulantes de pacientes AF apresentaram expressão elevada de algumas moléculas de adesão como, por exemplo, a *Molécula de Adesão Vascular 1* (*VCAM1 - Vascular Cell Adhesion Molecule*), *Molécula de Adesão Intercelular* (*ICAM - Intercellular Adhesion Molecule*) e *E-selectina* (*E-selectin*). Quando as mesmas moléculas tiveram seus níveis avaliados em camundongos transgênicos com AF, a expressão destas moléculas também se encontrava elevada. Esse estado de ativação do endotélio vascular evidencia o curso inflamatório da AF (SOLOVEY *et al.*, 2001; OKPALA *et al.*, 2002).

1.2.1 - Moduladores de gravidade

Além de fatores que determinam a concentração de HbS intracelular e sua propensão à polimerização, outros fatores também podem atuar como moduladores da gravidade da AF. Dentre eles podemos citar os níveis elevados de HbF, a concomitância

com α-talassemia e a presença de diferentes haplótipos. Estes moduladores talvez sejam fatores determinantes no processo de falcização e expliquem em parte a diversidade fenotípica encontrada em portadores de doenças falciformes (CHIES e NARDI, 2001).

O haplótipo Benin é bastante comum em populações Norte-americanas e do Caribe, enquanto que no Brasil há uma maior prevalência do Banto, que também ocorre na Sicília, Grécia, Turquia e Arábia Saudita. Ambos estão associados com níveis mais baixos de HbF. Por outro lado, os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano estão associados com níveis mais elevados da HbF (PAGNIER *et al.*, 1984; LAPOUMEROULIE *et al.*, 1992; FIGUEIREDO *et al.*, 1994; GONCALVES *et al.*, 1994).

Diversos estudos demonstraram relação direta entre níveis elevados de HbF e evolução clínica menos grave de pacientes com AF. A HbF atua como potente redutor da gravidade da AF por não participar do processo de polimerização, aumentando a solubilidade da HbS. Desta forma, ela não somente reduz a concentração de HbS como também inibe sua polimerização (NAGEL E STEINBERG, 2001).

Com base nos efeitos benéficos relacionados ao aumento dos níveis de HbF em pacientes com AF, novas estratégias terapêuticas vêm sendo propostas. Elas baseiam-se no princípio da reativação farmacológica da expressão do gene γ da globina e conseqüente aumento os níveis da HbF nos indivíduos adultos. Entretanto, é necessário que haja melhor compreensão dos mecanismos básicos acerca da regulação gênica no loco da β globina e outros fatores que possam influenciar direta ou indiretamente no aumento da expressão do gene γ.

1.2.2 - Indução do Aumento de Hemoglobina Fetal pela Hidroxiuréia

Há várias décadas, agentes farmacológicos vêm sendo pesquisados e propostos como potentes ferramentas terapêuticas que atuam na indução da expressão do gene γ globina e aumento de síntese da HbF, e consequentemente levando a melhor evolução clínica para os pacientes AF.

Um dos agentes de maior destaque é a hidroxiuréia (HU), um quimioterápico usado no tratamento de doenças mieloproliferativas e de fácil administração oral. Nos últimos anos a HU têm sido amplamente utilizada em ensaios clínicos em pacientes com AF, com intuito de aumentar a síntese da HbF e conduzir a atenuação do quadro clínico da doença. (KINNEY *et al.*, 1999; WARE *et al.*, 2002).

Pacientes com AF tratados com HU apresentaram menor necessidade de transfusões, hospitalizações, diminuição das crises de dor e fenômenos vasoclusivos e redução da mortalidade (STEINBERG *et al.*, 2003). Inicialmente, o efeito benéfico exercido pela HU era atribuído somente ao aumento dos níveis de HbF promovidos pelo agente. Todavia, alguns pacientes apresentaram uma melhor evolução clínica antes mesmo de se detectar aumento significativo nos níveis de HbF (CHARACHE, 1997; WARE *et al.*, 2002; STEINBERG *et al.*, 2003). Estes dados fortalecem a hipótese de que a HU não exerça seu efeito benéfico apenas sobre a HbF, mas também sobre outras vias ainda desconhecidas.

Foi associado ao mecanismo da ação da HU o aumento da concentração total de Hb, aumento dos valores do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração da hemoglobina corpuscular média (HCM), e também um aumento do número de células F e reticulócitos F. Observou-se ainda maior sobrevida do eritrócito, aumento de solubilização e diminuição de polimerização da HbS e maior deformabilidade das hemácias, que podem estar indiretamente relacionados ao co-transporte de Na K-Cl e conseqüente aumento da hidratação (ADRAGNA, FONSECA e LAUF, 1994; BALLAS *et al.*, 1999).

O efeito mielo-supressivo exercido pela HU é verificado pela diminuição do número de células brancas, plaquetas, granulócitos, reticulócitos (provavelmente associado ao decréscimo da hemólise) e células densas (STEINBERG *et al.*, 1997; BALLAS *et al.*, 1999).

Dentre as hipóteses relacionadas ao mecanismo de ação da HU sobre o aumento da HbF, uma das mais aceitas atualmente é a evidenciada pela rápida regeneração de células jovens comprometidas com a linhagem eritróide após uma fase de cito redução. Esse mecanismo torna-se possível, pois a HU é capaz de interromper a síntese de DNA nas

células precursoras eritróides em estágios mais avançados de diferenciação celular pela inibição da enzima ribonucleotídeo redutase. Esta suspensão temporária na síntese de DNA ocasionaria uma breve suspensão da hematopoese, e o restabelecimento da eritropoese se daria por um estresse hematopoético. Assim, haveria um recrutamento de células jovens comprometidas com a linhagem eritróide, que possuem conservada a capacidade de síntese de HbF. Essas células seriam estimuladas a sofrer uma rápida diferenciação e maturação, fazendo com que os eritroblastos originários destas células possam expressar continuadamente o gene da γ globina, e conseqüentemente aumentando a expressão da HbF (KAUFMAN, 1992; GLADWIN e SCHECHTER, 2001; HALSEY e ROBERTS, 2003; HAYNES *et al.*, 2004).

Em 1997, YANG e colaboradores demonstraram relação entre o número total de *Unidades Formadoras de Explosão Eritróide* (*BFU-E - Burst Forming Unit-Erythroid*) e níveis de HbF em pacientes AF tratados com HU, ou seja, quanto maior o aumento da síntese da HbF menor o número de colônias *BFU-E*. A supressão do crescimento das colônias *BFU-E* acentua o comprometimento de progenitores eritróides jovens, acelera a eritropoese e aumenta a sobrevivência de células vermelhas falcizadas (YANG *et al.*, 1997; POPE *et al.*, 2000). HO e colaboradores em 2003 observaram *in vitro* que o número de colônias *BFU-E* decaiu consideravelmente em pacientes AF tratados com HU de maneira dose dependente quando comparados aos não tratados. Quanto maior a dose de HU adicionada, maior redução no número de colônias *BFU-E* foi observada, atingindo valores abaixo de 10% dos valores normais em presença de 75 μM de HU. Os níveis de HbF também aumentaram de maneira dose dependente (HO *et al.*, 2003).

O efeito dose dependente da HU sobre o crescimento e diferenciação eritróide foi analisado em 2002 por WANG e colaboradores. Utilizando culturas de células mononucleares de indivíduos controles, tratados e não tratados com HU, continuamente ou por pulso (administração não contínua) observaram que a HU aumentou os níveis de HbF de maneira dose e tempo dependente, tanto no tratamento contínuo, quanto por pulso. Ou seja, o número de células F e os níveis de Hb total aumentaram em presença de doses pequenas de HU e diminuíram quando altas doses de HU foram administradas, sugerindo que esse efeito promovido pela HU seja o resultado da interação de várias e diferentes vias de sinalização intracelular (WANG *et al.*, 2002).

Recentemente, estudos associados ao mecanismo do óxido nítrico (NO) sugerem que este gás com meia vida aferida em segundos tenha papel significativo no mecanismo de ação da HU (NAHAVANDI *et al.*, 2000; GLADWIN e SCHECHTER, 2001). O NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) e aumenta os níveis de guanosina monofosfato cíclica (cGMP), que atua como segundo mensageiro para mediar várias respostas fisiológicas, tais como relaxamento muscular, inibição a adesão de plaquetas, neurotransmissão, entre outros (NAHAVANDI *et al.*, 2000). Outra função importante desempenhada pelo NO é a inibição da adesão de monócitos, leucócitos e células vermelhas às células do endotélio e também diminuição da expressão de moléculas de adesão. Todos estes eventos resultariam num aumento do fluxo sanguíneo principalmente na micro-circulação e aumento da disponibilidade de oxigênio para os tecidos (GLADWIN *et al.*, 2002; NAHAVANDI *et al.*, 2002).

Pacientes AF apresentaram níveis baixos de NO durante as crises de dor, desencadeadas pelo processo de vasoclusão. Havendo melhora nas crises, os níveis de NO aumentaram também (LOPEZ *et al.*, 2000). Os resultados obtidos em estudos com ratos demonstraram que a HU levou à produção de NO, por meio de níveis detectáveis de nitrosil-hemoglobina (JIANG *et al.*, 1997). Em pacientes com AF, os níveis de nitrosil-hemoglobina também se encontravam aumentados em resposta a administração de HU (GLADWIN e SCHECHTER, 2001).

Foi demonstrado que a HU e outros doadores de NO aumentam a expressão do gene γ globina em linhagens de células K562 e em progenitores eritróides humanos de maneira dose dependente. Estes compostos não só aumentaram a razão γ / β neste sistema bem como tiveram um pequeno efeito na expressão do gene da β globina (COKIC *et al.*, 2003). Os níveis de HbF se mostraram aumentados em resposta à administração da HU bem como de outros doadores de NO como a *S-nitrosocisteína (CysNO)* em células eritróides humanas. Também estavam aumentados os níveis de cGMP em células progenitoras eritróides. Utilizando inibidores da via sGC, houve bloqueio no aumento da expressão do gene da γ globina. Estes estudos evidenciaram o envolvimento da via sGC na indução da produção da HbF e também revelaram que a indução da expressão do gene da γ globina, mediada pela HU ou doadores de NO, ocorra apenas durante um curto período da vida da diferenciação eritrocitária (JIANG *et al.*, 1997; KING, 2003a).

Outro estudo, realizado em 2003 por KING, também evidenciou como mecanismo de ação da HU, a ativação da sGC através da produção de NO derivado da HU (KING, 2003b). Pacientes tratados com a HU apresentaram, além do aumento na expressão do gene γ, aumento nos níveis de nitrito, nitrato e ferro nitrosil hemoglobina, os quais são marcadores de produção do NO. A ativação da via sGC demonstrou a indução da expressão do gene γ tanto em células K562 quanto em progenitores eritróides. O tratamento com inibidores de sGC foi capaz de bloquear esse aumento (IKUTA, AUSENDA e CAPPELLINI, 2001; COKIC *et al.*, 2003; REITER e GLADWIN, 2003). Níveis aumentados de cGMP também foram detectados em resposta ao aumento dos níveis de expressão do gene γ globina em resposta à administração da HU em progenitores eritróides de pacientes com AF. Esses resultados reforçam ainda mais o comprometimento da HU com a via sGC (NAHAVANDI *et al.*, 2002; CONRAN *et al.*, 2004).

Em uma outra abordagem, PARKS e colaboradores em 2001 demonstraram que após o tratamento com HU em células K652, os níveis de fosforilação do gene da *Quinase 1 Regulada por Sinal Extracelular* (*Erk1- Extracellular Signal-Regulated Kinase 1*) estavam diminuídos, enquanto os de *p38* estavam aumentados. Os genes *Erk1* e *p38* são membros da família das *Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno* (*MAPKS - RAS-mitogen-activated Protein Kinases*), que são proteínas quinases envolvidas na regulação de uma série de processos celulares, tais como a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (PARK *et al.*, 2001; NAGAI *et al.*, 2003).

Porém, quando os níveis de *p38* e *p44/42* foram avaliados em linhagens de células eritroleucêmicas de murino (*MEL- Murine Erythroleukaemia Cells*) tratadas e não tratadas com HU, não foi observada diferença significativa entre os níveis de fosforilação de ambas as *MAPKS*. A adição de inibidores da sinalização da via *MAPK* também não induziu diferença significativa entre os controles não tratados e tratados com HU, sugerindo que a HU induza a diferenciação eritróide das linhagens celulares *MEL* por um mecanismo independente da via de sinalização *RAS-MAPK* (NAGAI *et al.*, 2003).

Apesar do crescente número de estudos evidenciando cada vez mais o comprometimento da HU com a via sGC e com o mecanismo de NO, é provável que não haja apenas um mecanismo envolvido na ação deste fármaco. Assim, a atuação conjunta de

genes que desempenhem papel de fatores de transcrição ou com outras funções celulares relevantes, poderia vir a contribuir ainda mais para a compreensão do complexo mecanismo de ação da HU. O estudo da expressão gênica tem fundamental importância para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na ação da HU promovendo uma melhor evolução clínica e conseqüente aumento da HbF.

1.3 - Estudos de Expressão Gênica

Muitos métodos vêm sendo desenvolvidos visando compreender a expressão gênica em determinados tecidos ou doenças. Dentre eles podemos destacar a técnica de construção de bibliotecas subtrativas (*SSH - Suppression Subtractive Hybridization*) que consiste em analisar os genes diferencialmente expressos em determinado tecido diante de duas condições diferentes *(GUBIN et al., 1999)*. Uma outra técnica que vem sendo muito utilizada é a de microarranjos (*microarray*) de expressão, no que genes conhecidos são arranjados em uma lâmina ou membrana e têm sua expressão quantificada em diversas condições (JISON *et al.*, 2004).

Uma metodologia recente que une as vantagens dos dois outros métodos anteriores (analisar os genes diferencialmente expressos e quantificar os níveis de expressão de genes já conhecidos), mas que também possibilita a identificação de genes novos é a *Análise Seriada da Expressão Gênica* (*SAGE - Serial Analysis of Gene Expression*). Foi descrita em 1995 por VELCULESCU e colaboradores e consiste na construção de bibliotecas, permitindo análises qualitativas e quantitativas da expressão gênica total de determinadas células ou tecidos. Ela é capaz de analisar o conjunto de genes transcritos de um tecido sem a necessidade de haver um conhecimento prévio destes transcritos (VELCULESCU *et al.*, 1995). Esta técnica está baseada em três princípios:

1 - Obtenção de uma pequena seqüência denominada "*tag*" variando de 9-14 bp de uma região definida e específica de cada um do total de genes expressos no tipo celular analisado;

2 - Ligação dos "*tags*" entre si, formando longas moléculas de DNA (concatâmeros) que podem ser clonados e seqüenciados, possibilitando a identificação de cada uma das "*tags*" como pertencente a genes previamente descritos e depositados em bancos de dados (http://cgap.nci.nih.gov/SAGE, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE) ou a caracterização como genes ainda não descritos (*no matchs*);

3 - A quantificação dos níveis de expressão dos genes é obtida pelo número de vezes que uma determinada *tag* é encontrada em um determinado tipo celular. Assim, se uma determinada *tag* é encontrada em maior número na amostra de um paciente em comparação a um controle, é entendido que o gene por ela representado tem sua expressão aumentada na doença. A situação inversa também pode ser encontrada, ou seja, genes com expressão diminuída em relação ao controle.

O emprego destas metodologias pode fornecer dados importantes sobre mecanismos de expressão e regulação gênica, identificar genes novos que possuam função importante, bem como comparar as diferenças nas expressões globais de determinados tecidos ou células expostas a determinados estímulos ou tratamento.

WANG e colaboradores em 2002 avaliaram a expressão gênica em linhagens de células $AC133^+$ não tratadas e tratadas com a administração de doses baixas e altas de HU, utilizando a técnica de *microarray*. Foram analisados os padrões de expressão de genes envolvidos com o controle do ciclo celular, apoptose e várias vias de transdução de sinal. Quando tratadas com altas doses de HU, um aumento significativo na expressão de genes associados com apoptose (*dr5, caspase 3, caspase 10, bax* e *bcl-xL*) e ciclo celular (*p21, skp-1, gadd45* e *mdm2*) foi observado. Por outro lado, a administração de baixas doses de HU aumentou a expressão do gene da *Resposta Precoce de Crescimento 1 (EGR1 - Early Growth Response 1)*, associado a respostas celulares. De acordo com estes dados, a administração da HU em doses baixas e altas regula a expressão de diferentes genes, atuando em vias celulares distintas (WANG *et al.*, 2002).

Em um estudo realizado em 2004, JISON e colaboradores evidenciaram o estresse oxidativo, hemolítico e inflamatório presentes na AF por meio da metodologia de microarranjos. Neste estudo foi comparada a expressão gênica de amostras de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com AF não tratados com HU com indivíduos controles. Foram obtidos inicialmente 112 genes diferencialmente expressos estatisticamente significativos. Uma clusterização foi feita com estes 112 genes, com os indivíduos controles, pacientes com AF não tratados e adicionalmente com os tratados com HU. Os pacientes com AF não tratados e tratados com a HU apresentaram padrões de expressão gênica semelhantes, diferenciando apenas do padrão apresentado pelos indivíduos controles. Quando critérios estatísticos menos estringentes foram aplicados, 385 genes se apresentaram diferencialmente expressos na AF. Ainda neste contexto, nenhum gene diferencialmente expresso estatisticamente significativo foi encontrado entre os pacientes com AF tratados e não tratados com HU. Uma anotação funcional de acordo com o *Gene Ontology Consortium* foi feita utilizando estes 385 genes, e genes associados à regulação do ciclo celular, apoptose, moléculas de adesão, genes induzidos por interferon, quinases e moléculas de sinalização foram encontrados em pacientes com AF. O estudo do padrão de expressão gênica de pacientes com AF demonstrou uma indução de marcadores (genes) pró-inflamatórios que devem contribuir de alguma forma para a patogênese da doença, porém também foi demonstrada indução da expressão de vários mecanismos compensatórios, como por exemplo genes associados a mecanismos anti-oxidantes (JISON *et al.*, 2004).

Com a técnica de *SAGE*, perfis globais de expressão gênica puderam ser construídos e comparados com maior detalhamento e eficácia. Em 2003, HASHIMOTO e colaboradores avaliaram a expressão gênica de leucócitos, incluindo fagócitos, células T e B em vários estágios de diferenciação. Foram construídos 17 bibliotecas e um total de 709.990 *tags* foram seqüenciadas, perfazendo 112.555 transcritos, dos quais 38.961 *tags* representavam *tags* distintas que foram identificadas mais de uma vez em todas as bibliotecas. Dentre estas, um total de 14.557 *tags* correspondiam a genes identificados e 12.766 *tags* foram classificadas como *no matches*. Quando foram avaliados os números de cópias dos transcritos identificados, 0.2% dos transcritos apresentavam mais que 501 cópias, 1.6% dos transcritos apresentava entre 500 e 51 cópias, 16.8% transcritos com

cópias entre 50 e 6, e a grande maioria, 81.4% dos transcritos com números de cópias inferiores a 5 (HASHIMOTO *et al.*, 2003).

Os genes foram então agrupados como pertencentes a células linfóides e pertencentes a células mielóides, possibilitando a comparação entre os dois tipos celulares. Um total de 147 genes apresentou expressão significativa em células mielóides e outros 88 genes apresentaram expressão significativa em células linfóides. Após a anotação funcional, genes associados com metabolismo, sinalização, cito esqueleto, proteólise, canais de membrana e genes relacionados a transporte tiveram maior expressão em células mielóides. Por outro lado, as células linfóides apresentaram maior expressão de proteínas ribossomais, que têm importante papel na regulação das vias de tradução (HASHIMOTO *et al.*, 2003).

De acordo com todos os dados apresentados em estudos anteriores visando compreender o mecanismo de ação da HU para promover a melhora do quadro clínico da AF e o aumento da HbF, e com a utilização de ferramentas eficientes como o *SAGE*, este trabalho tem por objetivo analisar a expressão gênica em células de medula óssea de um paciente com AF antes e após a administração da HU. A identificação de famílias de genes com expressão induzida ou repressa, pode contribuir para melhor compreensão das vias de ação deste agente farmacológico, e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes no tratamento da anemia falciforme.

2 - OBJETIVOS

O melhor conhecimento dos mecanismos moleculares associados a ação da HU em pacientes com AF poderá contribuir para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficientes para o tratamento da AF. Desta forma, foram objetivos deste trabalho:

1) Determinar o perfil global da expressão gênica em células da medula óssea de um paciente homozigoto para a AF antes e 90 dias após a administração inicial da hidroxiuréia;

2) Determinar e identificar genes diferencialmente expressos entre os dois perfis de expressão e agrupar os genes de acordo com suas características funcionais;

3) Avaliar a expressão de alguns genes diferencialmente expressos previamente selecionados em um outro grupo de pacientes homozigotos para AF não tratados e tratados com a hidroxiuréia.

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 - Casuística

Foram estudadas neste trabalho duas amostras de células da medula óssea de um paciente AF, coletada por punção aspirativa na crista ilíaca de um paciente do sexo feminino com 23 anos de idade, acompanhado pelo ambulatório de anemias do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp. Foi recomendando ao paciente tratamento com HU, na dosagem 25 mg/ kg/ dia devido a ocorrência de repetidos episódios de crises vasoclusivas.

Após noventa dias corridos do início do tratamento, nova amostra de células da medula óssea foi coletada.

Adicionalmente, foram coletadas amostras de sangue periférico de 10 pacientes AF, cinco dos quais sob tratamento com HU e 5 não tratados.

Todas as amostras foram coletadas somente após os pacientes concordarem em participar da pesquisa, mediante explicação detalhada dos procedimentos e dados a serem gerados pelo projeto, e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa pelo paciente e pesquisador responsável (anexo 1). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (anexo 2).

Dados hematológicos relevantes e que podem indicar atuação da HU sob o aumento da HbF e conseqüente melhora do quadro clínico estão listados na tabela 1.

Tabela 1 - Dados hematológicos do paciente com AF cuja amostra de medula óssea foi coletada para a construção dos perfis de expressão gênica.

DADOS HEMATOLÓGICOS	ANTES DA HU	APOS A HU
Células vermelhas ($x10^9$/l)	2.41	2.33
Hematócrito (%)	23.9	24.3
Hemoglobina (g/dl)	7.6	8.0
Volume corpuscular médio (fl)	99.2	104.3
Hemoglobina corpuscular media (pg)	31.5	34.3
Leucócitos ($x10^9$/l)	10.85	5.16
Neutrófilos ($x10^9$/l)	6.03	2.08
HbF (%)	3.40%	8.80%

3.2 - Extração do RNA Total

O RNA foi extraído utilizando-se o reagente *TRIzol* (Invitrogen-Life Technologies), que é uma solução monofásica composta por fenol e guanidina isocianato, de acordo com as instruções do fabricante.

O passo inicial da extração de RNA foi a lise celular (lise de hemácias), realizada a partir de cloreto de amônia e bicarbonato de amônia e sucessivas centrifugações até a obtenção de um precipitado esbranquiçado de células. A este precipitado, foi adicionado cerca de 1 ml (1 ml para cada $5x10^6$ células) do reagente *TRIzol*, que rompe as células, dissolvendo os componentes celulares sem comprometer a integridade do RNA. O precipitado contendo o *TRIzol* foi incubado a temperatura ambiente a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após agitação vigorosa desta amostra contendo clorofórmio, foi realizada uma nova incubação. Foi realizada centrifugação em velocidade máxima de 14000 RPM a 4° C com recuperação da fase orgânica da amostra em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com isopropanol gelado. Foi realizada nova incubação à temperatura ambiente seguida de centrifugação em velocidade máxima de 14000 RPM a 4° C. Após esta centrifugação, o

precipitado foi lavado com etanol 70% gelado para que houvesse completa remoção de sal, e então submetida à nova centrifugação, a 11500 RPM a 4° C. Finalmente, o centrifugado foi ressuspendido em água estéril contendo dietilpirocarbonato (*DEPC*) e incubado a 55° C por 10 minutos inicialmente, e 2 horas em gelo para solubilização do RNA.

A quantificação do RNA foi realizada através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A integridade da amostra foi verificada em eletroforese em gel desnaturante 1,2%. As amostras com qualidade adequada do RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18 S e 28 S (figura 4). Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer - 80° C.

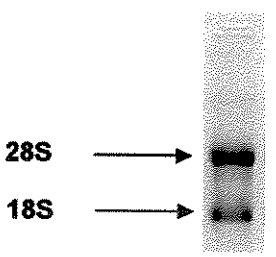


Figura 4 - Verificação da qualidade das amostras de RNA em eletroforese em gel de agarose 1,2%. Amostra do RNA extraída antes da administração da HU, apresentando as subunidades 28 S e 18 S íntegras. Como foram adotadas as mesmas quantidades de amostra, todas as ilustrações serão apresentadas apenas com a amostra antes da administração da HU.

3.3 - SAGE (*Serial Analisys of Gene Expression*)

O método de SAGE foi inicialmente descrito por VELCULESCU e colaboradores em 1995, e foi escolhido por representar uma boa alternativa para fornecer informações gerais sobre o perfil de global da expressão gênica de células da medula óssea de um paciente portador de anemia falciforme antes e após a administração da Hidroxiuréia, permitindo a comparação entre as duas situações bem como a análise e confirmação dos genes diferencialmente expressos (VELCULESCU *et al.*, 1995). A figura 5 ilustra resumidamente a técnica de *SAGE*.

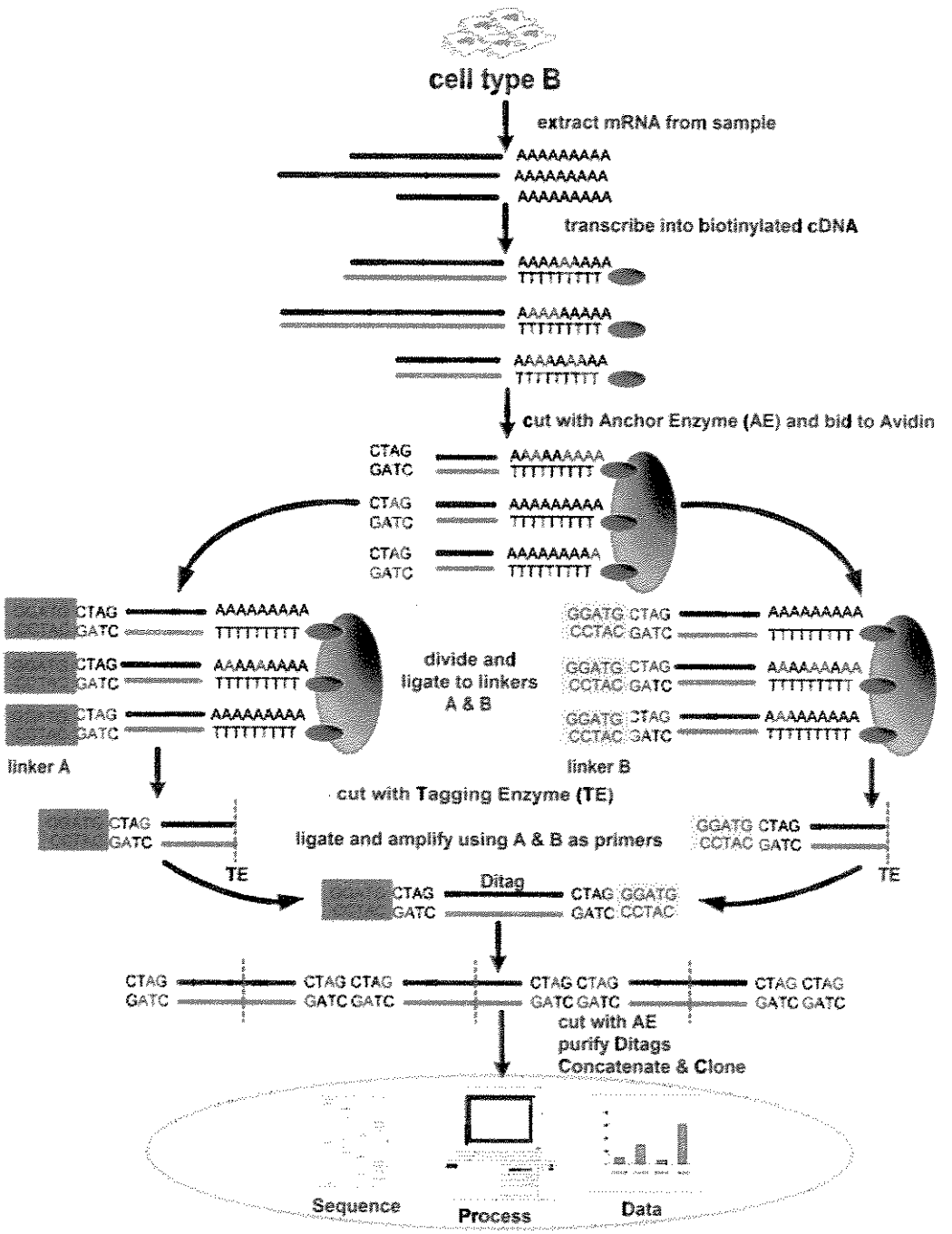


Figura 5 - Esquema ilustrativo da técnica de *SAGE*. Adaptado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/NAWBIS/Modules/Expression/exp82.html.

Para se dar início a técnica, é necessário que as amostras de RNA total sejam de ótima qualidade e desprovidas de contaminação com DNA genômico (figura 4). Foi utilizado para a construção dos perfis de expressão gênica deste trabalho o kit *I-SAGE®* (Invitrogen), seguindo as normas do fabricante com pequenas alterações.

A primeira etapa se dá com o isolamento do RNA mensageiro a partir do RNA total de cada amostra, através da ligação da cauda poli-A a 100 µl de oligonucleotídeos de timina (*oligo dT*) adaptados a esferas magnéticas. As caudas poli-A então ligadas a estas esferas são isoladas com o auxílio de uma estante magnética, que retém na parede do tubo somente o RNA mensageiro ligado às esferas magnéticas. A transcrição é realizada a partir da enzima *Superscript II RTTM*, com a adição de *Rnase H*. O resultado da síntese de cDNA é verificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* para *GAPD-H e EEF1A1*.

O próximo passo acontece com a digestão com enzima-âncora *Nla III*, que reconhece a seqüência *CATG*. Após a digestão, as fitas de cDNA estarão ligadas à esfera magnética pela cauda poli-A e na outra extremidade terão as 4 (quatro) bases do sítio de reconhecimento da *Nla III*. Nesta etapa é realizado um teste para checar a eficiência da digestão com *Nla III* onde há a perda do sítio do *primer* para amplificação do *GAPDH* (figura 6 A). Estas fitas de cDNA são ligadas a adaptadores, que são seqüências de 40 pb que possuem nas suas extremidades coesivas as quatro bases complementares ao sitio da enzima *Nla III*, o que facilita a sua ligação à extremidade das fitas de cDNA.

A amostra é dividida em duas alíquotas, e cada uma delas é ligada a um adaptador diferente, *A* ou *B*, utilizando a enzima *T4 DNA ligase*. Com ambas as alíquotas ligadas aos adaptadores *A* e *B*, procede-se com a digestão com a *Bsm FI*, que é enzima de restrição do tipo IIS (reconhece um sítio e faz o corte em outro ponto da seqüência), que faz as etiquetas (*tags*). Neste passo é feita uma nova verificação da eficiência por PCR (figura 6 B).

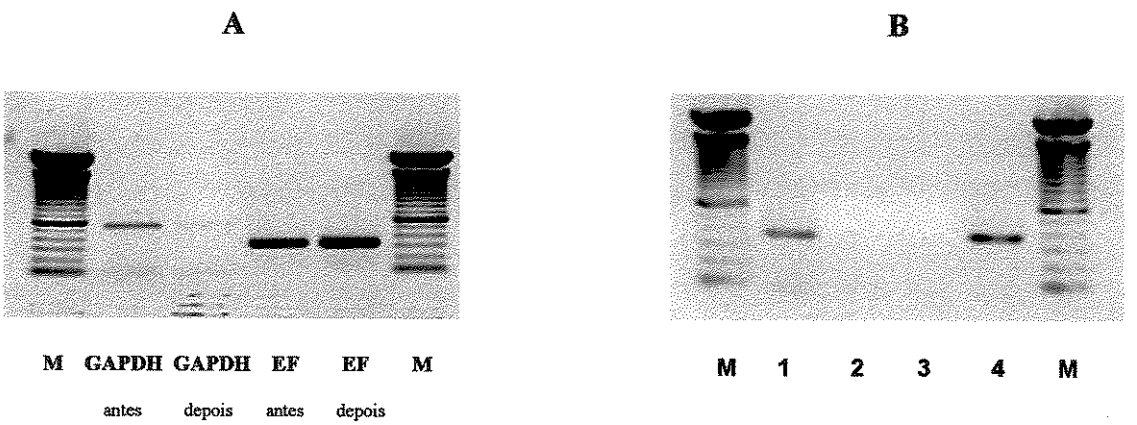


Figura 6 - Gel de agarose ilustrando os passos de confirmação da eficiência das reações. **A** – verificação da eficiência da digestão com *Nla III*, onde há a perda do sitio de ancoragem do primer *GAPDH* após a digestão. **B** - verificação da eficiência de ligação dos adaptadores *A* e *B*, representados pelos números *1* e *4*. **M** – marcador de peso molecular

Como esta enzima reconhece seu sítio e corta a fita de cDNA a 10-14 pb distante do seu sítio de reconhecimento, ela libera a fita de cDNA da esfera magnética, restando uma fita de cerca de 50 pb com uma extremidade 5′ coesiva sobressalente de 4 pares de bases. Portanto, a etiqueta (*tag*) consiste de 40 pb da seqüência do adaptador e 10 -14 pb da etiqueta ou *tag* propriamente dita, com a seqüência única correspondente ao transcrito.

Em seguida, a extremidade 5' coesiva criada com a *Bsm FI* é preenchida através da reação com a polimerase *Klenow*. É feita a reação de ligação dos *tags*, que serão unidos para formar um *ditag* (26 pb), em que cada *tag* correspondente ao transcrito vai conter o adaptador *A* de um lado e o adaptador *B* do outro. Uma amplificação por PCR em larga escala é realizada, utilizando como molde (*template)* o produto da ligação, ou seja, os *ditags* recém-formados. Os produtos gerados possuem 102 pb e são combinados em apenas dois tubos, para extração com fenol-clorofórmio, precipitação com etanol, acetato de amônio e glicogênio e são aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% (figura 7 A). Os

fragmentos de 102 pb são recortados do gel e purificados com colunas para centrifugação e as amostras são eluídas e novamente precipitadas com etanol, acetato de amônio e glicogênio.

Uma segunda digestão com *Nla III* é realizada nos produtos de PCR purificados para eliminar os adaptadores e deixar somente os *ditags* de 26 pb. O produto desta digestão é aplicado em gel de poliacrilamida 12% (figura 7 B), onde são observadas bandas de 26 pb com o sítio da *Nla III,* bandas de 40 pb correspondentes aos adaptadores, e bandas de 60 e 100 pb resultantes de digestão parcial. Deste gel são removidas apenas as bandas de 26 pb, correspondentes aos *ditags*, que são submetidas à purificação em colunas.

É realizada em seguida, uma reação de ligação com os *ditags* purificados para formar os concatâmeros, que são conjuntos de *ditags* ligados uns aos outros de forma contínua, até que atinjam tamanhos variáveis, de cerca de 200 pb até mais de 1000 pb, dependendo do número de *ditags* que estiverem formando cada concatâmero. É feita uma seleção por tamanho destes concatâmeros por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, separando em tubos diferentes os fragmentos com 200 a 500 pb, de 500 a 800 pb e os fragmentos superiores a 800 pb (figura 7 C). Os concatâmeros de tamanhos diferentes são então purificados e clonados em vetor *pZero-1*, e os vetores contendo os concatâmeros são inseridos por eletroporação em bactérias eletrocompetentes da linhagem *DH10B*.

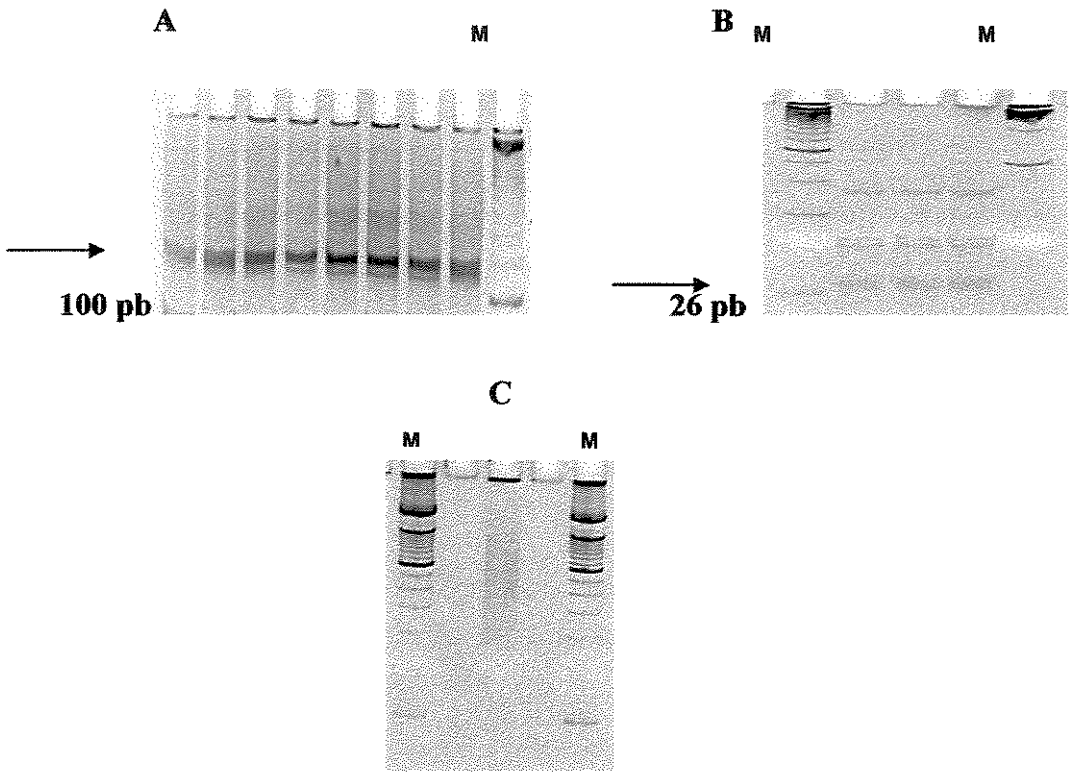


Figura 7 - Gel de poliacrilamida ilustrando: **A** – os ditags de 102 bp; **B** – os ditags de 26 bp e **C** – concatâmeros formados (rastro). **M** – marcadores de peso molecular

Foram utilizadas cubetas para eletroporação de 0,1 cm e o eletroporador, *Gene Pulser II* (Bio-Rad Laboratories) ajustado para seguintes condições: 1,8 kV, 25 mF, 200 W. As células eletroporadas são repicadas em meio ágar *LB Low Salt* (meio sólido) contendo o antibiótico *zeocina* e as colônias são semeadas em placas de cultura com 96 poços, contendo meio líquido *2YT* também com *zeocina*. Uma alíquota desta cultura é utilizada para reação de PCR, com *primers* universais *M13*, nos dois sentidos. Os insertos amplificados são analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (figura 8) e então utilizados para a reação de seqüenciamento, realizada em seqüenciador automático de DNA *MegaBace 1000* (Amersham Biosciences) utilizando *DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit* (Amersham Biosciences).

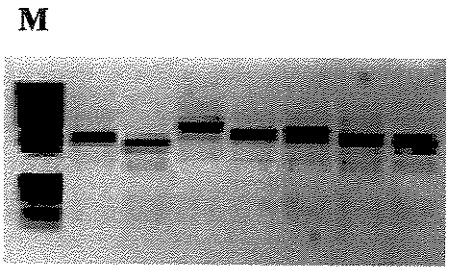


Figura 8 - Gel de agarose 1% ilustrando a amplificação de produtos de PCR de tamanhos superiores a 600 pb. **M** – marcador de peso molecular ΦX *Hae*

3.4 - Análise de Bionformática das Sequências Geradas e Análise Estatística

As seqüências geradas pelo MegaBace são analisadas por dois programas (*softwares*) *Phred e Cross-Match.*

O *Phred* é responsável pela atribuição de uma base a um determinado traçado *(base call)* e por fazer cortes em regiões de baixa qualidade das seqüências (trimagem). As bases são trimadas do começo ao final de cada seqüência, baseado na qualidade do traçado. Especificamente, para cada base, a probabilidade de erro (de um *base call*) associada pelo *Phred* é subtraída de um valor limítrofe (*cut-off*). O valor de *cut-off* adotado neste trabalho foi de 0.04, para asseguramos uma alta qualidade para as seqüências. Isso equivale a dizer que definimos um *Phred* escore mínimo de 20 para esse trabalho.

O *Cross-Match* foi utilizado para a remoção do vetor (*pZero-1*), e possíveis contaminações nas seqüências, como por exemplo, seqüências contaminantes que apresentem homologia com seqüências de bactérias e outros vetores.

O produto final são seqüências de alta qualidade, que consistem no agrupamento de vários *tags* através dos sítios *CATGs* (concatâmero). Em seguida, o programa *eSAGE* (*versão 1.2*) faz a extração digital e contagem das *tags*, excluindo as *tags* duplicadas, separando o total seqüenciado do número de *tags* únicas (*unique tags*) (MARGULIES e INNIS, 2000). Após esse processo, o programa realiza uma análise comparativa entre as duas bibliotecas, calculando um valor de P, que indica a significância

estatística entre a diferença de expressão referente a cada *tag* (teste de hipótese nula) e também um *fold*, que é a diferença de expressão entre os perfis gerados (AUDIC e CLAVERIE, 1997).

Os dados gerados pelo programa *eSAGE* foram então submetidos a programas de criação de bancos de dados e tabelas, como o *Access* e o *Excel* (Microsoft Corporation) para fins de análise. Para a identificação de cada *tag*, foi realizada (com o auxilio do *Access)* uma associação entre a *tag* e sua respectiva identificação, utilizando como base um banco de dados oferecido pelo *Cancer Genome Anatomy Project (CGAP)* (http://cgap.nci.nih.gov/SAGE). Neste banco de dados, estão contidas as *tags* e respectivas identificações com cada transcrito, número do Unigene (Hs), e localização cromossômica (LAL *et al.*, 1999).

Os critérios de seleção para a obtenção dos genes diferencialmente expressos adotados neste trabalho foram: 1) valor de P menor que 0,05 e 2) uma diferença (*fold*) de expressão de pelo menos 5 (cinco) vezes (AUDIC e CLAVERIE, 1997). Os totais respectivos a cada biblioteca analisada separadamente, bem como as análises comparativas, serão apresentados adiante nos resultados.

Para a classificação funcional dos transcritos diferencialmente expressos foi utilizado um programa computacional específico desenvolvido pela equipe de bioinformática do Hemocentro, denominado *Gene Ontology Library Analyser for SAGE (GOLIAS)*. Este programa usa como base o banco de dados do *Gene Ontology Consortium* (www.geneontology.org) e desta forma classifica cada transcrito de acordo com a ontologia funcional e levando em consideração a contagem real da expressão (n.°de *tags*) do transcrito, determinada pelo *SAGE* no respectivo perfil. A anotação funcional será apresentada adiante, nos resultados.

3.5 - Síntese do cDNA

Foram utilizadas para a transcrição reversa em cDNA (híbrido RNA-cDNA), alíquotas das amostras de RNA utilizados para as construções das bibliotecas e também alíquotas das amostras de RNA total dos 10 (dez) pacientes homozigotos para a AF não tratados e tratados com HU.

Para a remoção de todo e qualquer DNA contaminante contido nas amostras, um total de 5 µg de RNA total de cada amostra foi inicialmente tratado com *DNAse I* por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de *EDTA*, que é um composto quelante de Mg^{++} (cofator necessário para a atividade da *DNAse I*) e aquecimento das amostras a 65° C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado *primer oligo dT* numa concentração de 0,5 µl/ µg de RNA molde, e a ligação deste à região poli-A do RNA mensageiro serve como ancorador para que a enzima *transcriptase reversa AMV* (Promega) sintetize a fita complementar, juntamente com os *dNTP's* (10mM), tampão da enzima 5x e um inibidor de *RNAse* (*RNAse OUT* - Invitrogen) que também são necessários para a formação da fita a ser sintetizada. A reação foi incubada por 50 minutos a 42° C, e depois por 15 minutos a 70° C, para que ocorra a inativação da mesma.

Para a verificação do resultado da síntese do cDNA, uma alíquota das amostras então sintetizadas foram submetidas à reação de PCR com *primers* de *β-actina* e visualizados em gel de agarose 1% corado brometo de etídeo.

3.6 - PCR Semiquantitativo (RT-PCR)

O PCR semiquantitativo foi utilizado para realizar a validação de genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas HbS e HbSHU, previamente escolhidos. Os critérios de escolha adotados foram:

1) que fossem genes identificados;

2) que a *tag* que identifica o gene estivesse localizada mais distalmente à 3';

3) que apresentasse valor de $P < 0,05$;

4) e que apresentasse uma diferença de expressão (*fold*) de pelo menos 5 vezes.

Os *primers* foram desenhados com base na seqüência depositada do mRNA de cada gene escolhido, com o auxilio do programa *Gene Runner* utilizando condições ideais. Os *primers* desenhados e tamanhos de fragmentos estão listados na tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* utilizados na reação de PCR semiquantitativo e tamanhos dos produtos gerados pelas amplificações.

GENE	SEQUENCIA DOS *PRIMERS*	AMPLIFICAÇÃO bp
B-actina	F – 5′ AAGAGATGGCCACGGCTGCT 3′ R – 5′TCGCTCCAACCGACTGCTGT 3′	600 bp
Early Growth Response 1 (EGR1)	F - 5' CCAGTCCCAGCTCATCAAAC 3' R - 5' ATCTTGGTATGCCTCTTGCG 3'	317 pb
Endothelial Differentiation Factor 1 (EDF1)	F – 5′ CCAAGAAATGGGCTGCTGG 3′ R – 5′ GGGCTTTCCAATGTCCTTTCC 3′	278 pb
Enhancer Rudimentary Homolog Drosophila (ERH)	F – 5′ GATGATCTGGCAGACCTCAGC 3′ R – 5′ TCCGATTGAACAAGATCCTCAC 3′	273 pb
Ferritin Heavy Chain 1 (FTH1)	F – 5′ AGAGGGAACATGCTGAGAAAC 3′ R – 5′ GTCTCCCAGGTGTGCTTGTC 3′	345 pb
Gamma Globin (HBG)	F – 5′ CCATAAAGCACCTGGATGATC 3′ R – 5′ ATCTGGAGGACAGGGCACTG 3′	183 pb
Heat Shock Protein 1 (HSPE1)	F – 5′ CGAGTATTGGTTGAAAGGAGTG 3‘ R – 5′ TTTCAGAACTTCAGTGGAATGG 3’	326 pb
Peroxiredoxin (PRDX6)	F - 5' ACTGTCCTATCACGTCCTCTCC 3' R - 5' ATTGCTCACACCTGCTACACC 3′	363 pb
Signal Transducer and Activator of Transcription 5A (STAT5A)	F – 5′ GCTGTGGGACAATGCCTTTG 3′ R – 5′ TTCTTCAACACCTCCATCACCC 3′	280 pb
Transferrin (TF)	F – 5′ CTATTCAGCTCTCCTCATGGG 3′ R – 5′ TAGACAAACCCTCCATCCAAG 3′	340 pb
Transmembrane 7 Superfamily 1 (TM7SF1)	F – 5′ GTGCTGTGCTGGTAAAGACG 3′ R – 5′ TCTGCCTGGTCTGATACATTG 3′	295 pb

Inicialmente os genes foram amplificados utilizando como molde as amostras de cDNA de células de medula óssea utilizadas para a construção dos perfis HbS e HbSHU. Posteriormente, os genes foram analisados em células K562 cultivadas com e sem tratamento com HU. O primeiro passo foi a quantificação das amostras de cDNA por espectrofotômetro, e a partir disso foram feitas as diluições seriadas das mesmas, partindo de uma concentração inicial de 1 µg do cDNA molde: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128

e 1:256. Alíquotas destas diluições (1 µl) foram amplificadas por PCR em reação de um volume final de 25 µl contendo 1x do tampão da enzima, 2,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM do mix de dNTP´s, 0,6 pmol de cada primer e 1 U da enzima *Taq DNA polimerase* (invitrogen). As amostras foram desnaturadas inicialmente por 3 minutos a 94° C, e em seguidas submetidas a 40 ciclos de amplificação com desnaturação de 30 segundos a 94° C, anelamento de 45 segundos a 50° C (ou 52° C dependendo do *primer* utilizado) e extensão de 45 segundos a 72° C. Todos os produtos de PCR foram amplificados seguindo as mesmas condições de reação, variando apenas a temperatura de anelamento para alguns *primers*. Para todas as reações foram feitos controles negativos, onde a amostra não foi acrescentada nas reações para assegurar a ausência de contaminação.

O gene da *β-actina* foi utilizado como um controle endógeno de expressão constitutiva, cujo resultado de quantificação foi utilizado para normalizar os resultados obtidos do gene de interesse, corrigindo assim, quaisquer possíveis diferenças entre as concentrações de cDNA usadas nas reações. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,8% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo.

3.7 - PCR Quantitativo em Tempo Real – "Real-Time PCR"

A técnica de *real-time PCR* é baseada no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação (HIGUCHI *et al.*, 1993), pela ligação de uma sonda específica (*Taqman, Molecular Beacon*, etc) ou um corante (*SYBRGreen*), na fita recém sintetizada (BUSTIN, 2000).

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *ABI 5700 Sequence Detector System* ® (Applied Biosystems) utilizando o reagente *"SYBRGreen PCR Master Mix"* ® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (*dNTPs, $MgCl_2$, Tampão, Taq Ampli-Gold*) contém também o corante *SYBRGreen*, componente intercalante de DNA dupla-fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo pelo equipamento acima citado.

O método de quantificação da expressão gênica utilizado foi a denominada "análise relativa dos dados", onde a expressão dos genes escolhidos (tabela 3) foi quantificada em relação a uma situação considerada como referência, em nosso caso, os pacientes não tratados com HU, que constituíram a amostra calibradora. Todos os dados obtidos foram normalizados a partir da expressão de dois genes constitutivos utilizados como controles endógenos, a *β-actina* e *BCR*.

A análise relativa dos dados é expressa pela derivação da fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta CT}$ (a descrição da análise se dará mais adiante), na qual o nível de expressão gênica das amostras é obtido sempre em relação à amostra calibradora, como descreve o manual do equipamento (User Bulletim 2, Applied BioSystems, 2001).

Para a realização desta técnica foram desenhados *primers* específicos para os genes *EGR1*, *HSPE1*, *PRDX6* e *TM7SF1*, alvos deste estudo. Os primers foram desenhados com o uso do software "Primer Express" (Applied Biosystems) e estão listados na tabela 3.

Tabela 3 - *Primers* dos genes a serem analisados pela amplificação pela técnica de PCR quantitativo em tempo real.

GENE	SEQUÊNCIA DO *PRIMER*
BAC	F – 5′ AGGCCAACCGCGAGAAG 3′
	R – 5′ ACAGCCTGGATAGCAACGTACA 3′
BCR	F – 5′ CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT 3′
	R – 5′ CCTGCGATGGCGTTCAC 3′
EGR1	F – 5′ GAGCATGTGTCAGAGTGTTGTT 3′
	R – 5′ CATGTGAGAGTACGGTCAAGC 3′
HSPE1	F – 5′ CTGAAGTTCTGAAATCTTTCGTC 3′
	R – 5′ TTTGGAGACACTGGATGTCATT 3′
PRDX6	F – 5′ ATTAGTGCCATGTGCCTTTC – 3′
	R – 5′ TCTCTTCTCTTCACATGGTGTAC – 3′
TM7SF1	F – 5′ CCCATAGGAATAAGCAATAATGTA 3′
	R – 5′ AGCAAGGCTCCCTCTTTAGTAC 3′

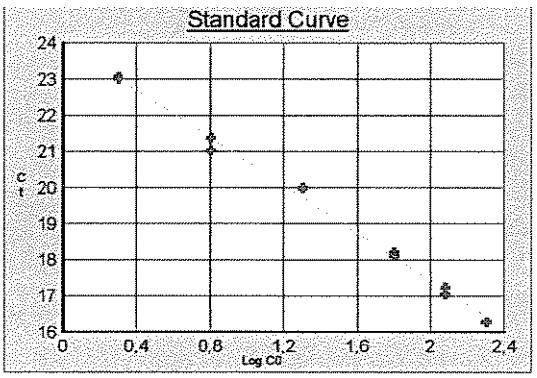
Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutiva, são necessárias condições ótimas de reação, ou seja, que as amplificações apresentem 100% de eficiência de amplificação a cada ciclo, ocorrendo duplicação do conteúdo de DNA do ciclo anterior. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10^{(-1/slope)}$, onde *slope* significa o coeficiente de inclinação da curva (MEIJERINK *et al.*, 2001; PFAFFL, 2001). A figura 9 ilustra as eficiências de amplificação referente a cada gene analisado.

As otimizações das reações aconteceram pela análise das amplificações obtidas a partir de várias concentrações de *primers* e de cDNA de células leucêmica K652 não tratadas e tratadas com HU. Para os cDNAs foram feitas sete diluições seriadas (logarítmicas): 500ng, 200ng, 120 ng, 63,26ng, 20ng, 6,32ng e 2ng. As concentrações de *primers* e as eficiências de amplificação seguem abaixo na tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações de *primers* utilizadas nas amplificações dos genes estudados. As concentrações foram determinadas pelo teste de eficiência de amplificação em condições testadas. Também estão apresentadas as eficiências de amplificação respectiva a cada *primer*.

PRIMERS	**CONCENTRAÇÃO (nM)**	**EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO**
BAC	150 nM	100%
BCR	150 nM	99,85%
EGR1	600 nM	99,76%
HSPE1	600 nM	98,9%
PRDX6	600 nM	99%
TM7SF1	600 nM	100%

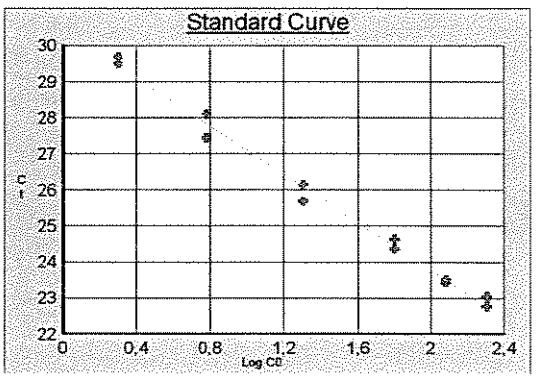
A



Slope = - 3,28677

Correlação = 0,997120

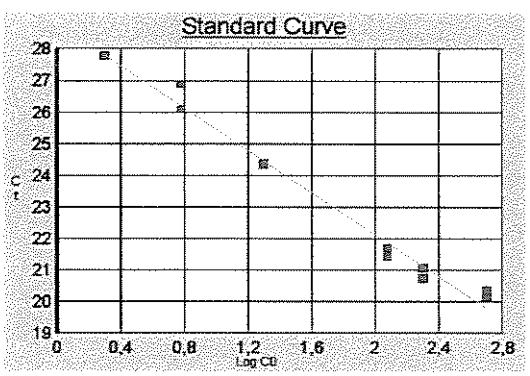
B



Slope = - 3,328728

Correlação = 0,995570

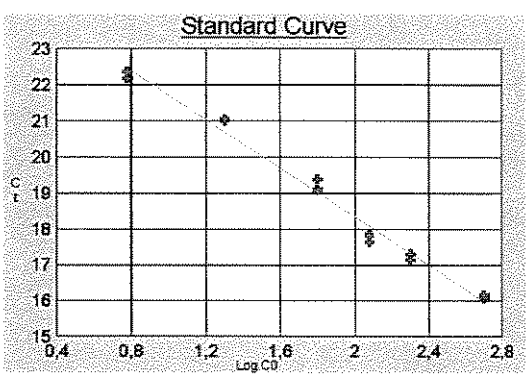
C



Slope = - 3,333277

Correlação = 0,993505

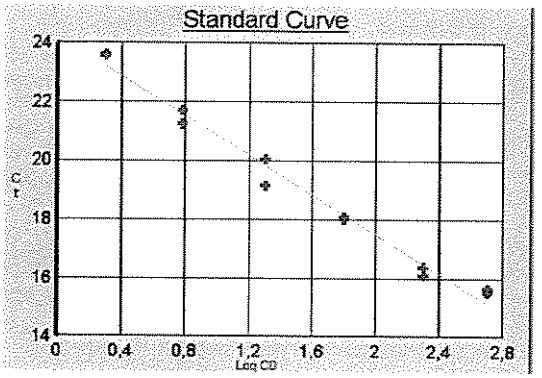
D



Slope = - 3,372366

Correlação = 0,992972

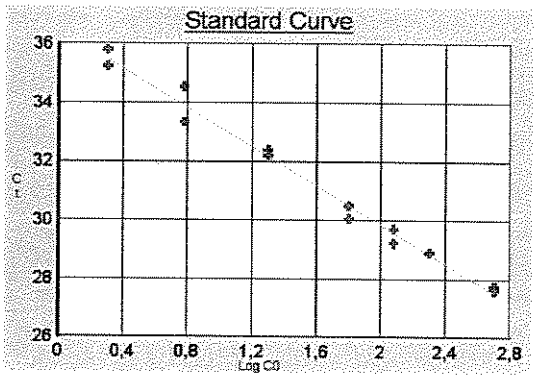
E



Slope = - 3,367203

Corelação = 0,991911

F



Slope = - 3,324553

Correlação = 0,993168

Figura 9 - Análise das eficiências de amplificação dos *primers* utilizados. Para analisar os dados gerados pelo PCR quantitativo em tempo-real, as reações foram otimizadas para que tivessem 100% de eficiência de amplificação. De acordo com os dados demonstrados na **tabela 3**, a figura mostra os gráficos da análise de eficiência dos primers **(A)** *B-actina* 150nM ; **(B)** *BCR* 150nM; **(C)** *EGR1* 600nM **(D)** *HSPE1* 600nM; **(E)** *PRDX6* 600nM e **(F)** *TM7SF1* 600nm. Dados de *Slope* e correlação abaixo de cada gráfico.

Todas as amostras foram quantificadas sempre em duplicata em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. As reações foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 10 ng de cDNA dos pacientes, 12,5 µl de *SYBRGreen Master Mix PCR* (Applied Biosystems).

Os dados são coletados na forma de emissão de fluorescência durante os ciclos da reação e analisados em forma de curva. A determinação dos valores para quantificação da expressão acontece com a determinação do *threshold*, que representa o momento em que o sistema detecta luz de maneira "inequívoca" nas amostras, diferenciando o sinal real do ruído de fundo. O ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação é denominado *threshold cycle*, ou *Ct* (figura 10). Quanto maior a expressão do gene, mais precocemente ele será amplificado e, conseqüentemente, menor será o Ct. Os dados de *Ct* de cada gene foram exportados para uma planilha de Excell (Microsoft Corporation) e

foram extraídas as médias destes dados, uma vez que as amostras eram feitas sempre em duplicatas. A partir das médias, as amostras foram normalizadas com o controle de expressão endógena, consistindo no primeiro passo da derivação aritmética denominado ΔCt (Ct da amostra com gene alvo menos Ct da amostra com gene de controle endógeno). Após a normalização dos dados, foi realizada a calibração dos mesmos utilizando a situação referência (amostras calibradora - amostras sem HU), levando ao segundo passo da derivação aritmética denominada $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt da amostra a ser quantificada menos ΔCt da amostra calibradora). Os dados então normalizados e calibrados são convertidos em níveis de expressão pela fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$, em que se atribui que a situação calibradora tenha valor "um" (1) de expressão.

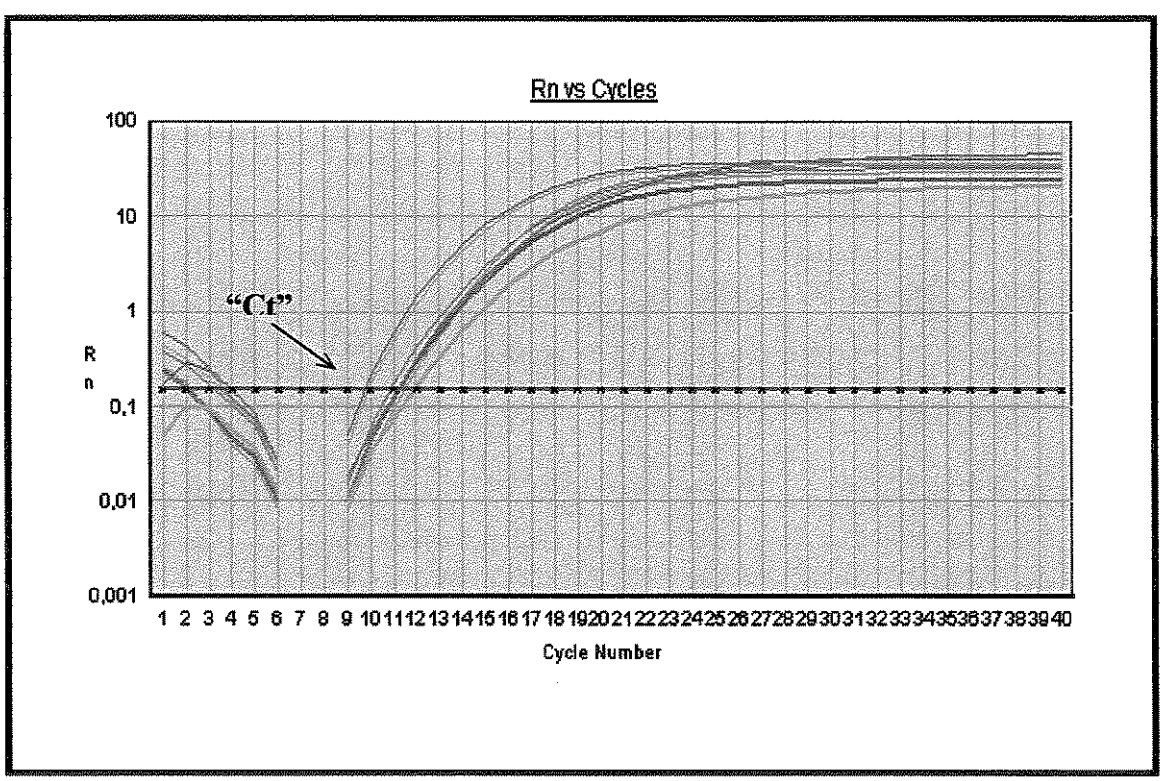


Figura 10 - Curva de amplificação de PCR quantitativo em tempo real. A análise da morfologia das curvas é um forte indicativo de que a reação ocorreu sem problemas. A curva deve ter uma morfologia sigmóide, mostrando as fases *lag* ou inicial, *log* ou exponencial e fase de platô, onde não ocorrem mais amplificações. Após esta análise é traçado o *threshold* e a partir dele coletados os dados em forma de Ct.

Para certificação de que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por amplificações inespecíficas, foi feita a análise da curva de dissociação, que se baseia no *Tm* (*Melting Temperature*) específica de cada produto, que é determinada pela sua composição de nucleotídeos. A cada variação da temperatura, que acontece entre 60°C à 95°C logo após o término do PCR, são coletados dados de fluorescência. A curva de dissociação ocorre quando em determinada temperatura o produto de PCR separa suas fitas e ocorre queda de fluorescência gerada pelo *SYBRGreen*, já que este se intercala somente dupla fita (figura 11). Na tabela 5 estão ilustradas as temperaturas de dissociação e tamanho dos amplicons gerados para cada gene.

Tabela 5 - Temperatura de dissociação e tamanhos dos produtos de PCR gerados pelos genes estudados.

GENE	TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO (TM)	AMPLICON (bp)
BAC	82°	79 pb
BCR	81°	67 pb
EGR1	83°	84 pb
HSPE1	70°	93 pb
PRDX6	78°	95 pb
TM7SF1	73°	67 pb

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

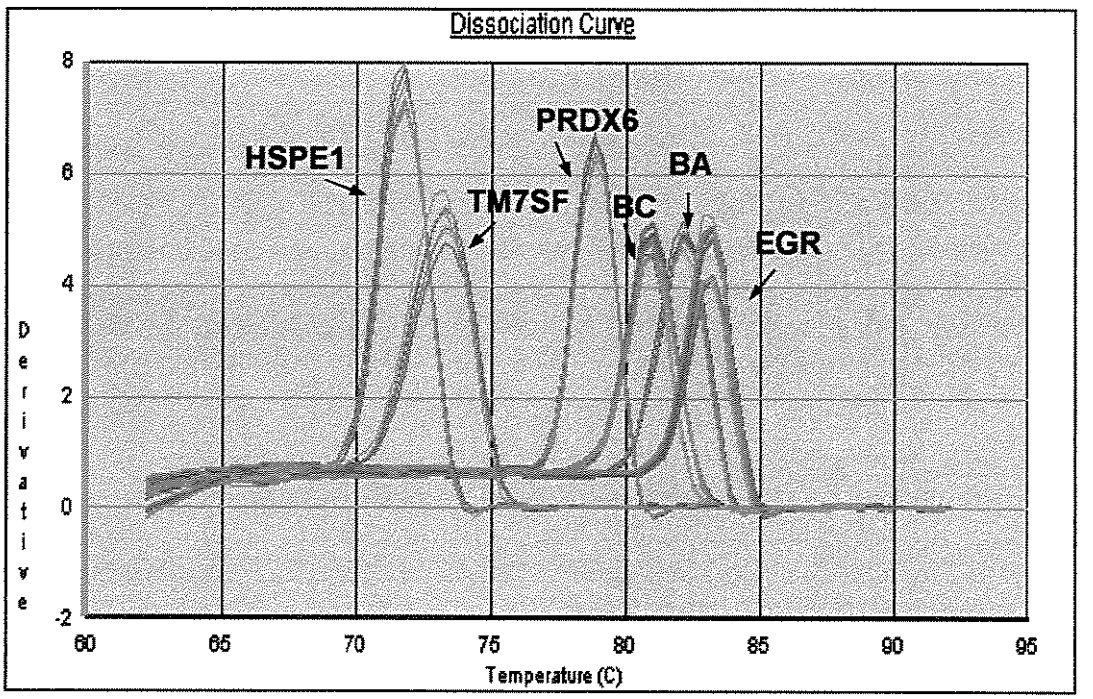


Figura 11 – Curva de Dissociação – A curva de dissociação é utilizada para analisar a ausência de contaminantes ou geração de produtos inespecíficos. De acordo com a **tabela 5**, podemos conferir que cada gene analisado tem um *amplicon* e uma temperatura de dissociação específica. A dissociação do produto da PCR leva ao desligamento da ligação *SYBRGreen* - DNA, levando à perda de fluorescência que, na figura acima é demonstrada como um pico.

3.8 - Análise Estatistíca dos Dados Gerados Por Real Time PCR

Para analisar a expressão gênica entre os diferentes grupos de pacientes, optou-se pelo teste não-paramétrico de Wilconxon-Mann-Whitney, uma vez que as variáveis do estudo rejeitaram a hipótese de normalidade. Os dados foram considerados significativos quando apresentaram valor de P igual ou menor que 0,05. A análise estatística foi realizada pelo programa *GraphPad Instat Tm Software, versão 2.02.*

4 - RESULTADOS

4.1 - Análise Global da Expressão Gênica do Perfil HbS

O perfil HbS foi construído a partir de uma amostra de células da medula óssea de um paciente com AF, coletada antes da administração da HU. Foram seqüenciadas 47.192 *tags* e após a exclusão das *tags* redundantes, totalizaram-se 15.735 *tags* únicas, que podem ser associadas ao número de transcritos expressos neste tecido.

A identificação das *tags* distintas foi realizada utilizando como base o banco de dados oferecido pelo *The Cancer Genome Anatomy Project* (*CGAP*). Os transcritos foram separados em genes identificados (que apresentavam alguma descrição), *no matchs*, ou seja, transcritos que não apresentavam nenhuma associação e que possivelmente representam genes ainda desconhecidos, e outras classificações associadas a seqüências preditas (*ESTs, ORFs* e outros). Os dados gerais desta classificação estão detalhados na tabela 6.

Tabela 6 - Dados gerais do perfil HbS.

CLASSIFICAÇÃO	N.º *TAGS*
Total seqüenciado	47.192
Tags distintas (únicas)	15.735
Genes identificados	7.649
ESTs e *ORFs*	2.064
cDNA/ RNA	748
Proteínas hipotéticas	1.123
No Matchs	4.151

Os 50 transcritos mais expressos no perfil HbS estão demonstrados na tabela 7.

Tabela 7 - 50 transcritos mais expressos no perfil HbS.

TAG	FREQUENCIA	HS	DESCRIÇÃO
CTTCTTGCCC	3148	Hs.449630	hemoglobin, alpha 2
GCAAGAAAGT	2319	Hs.155376	hemoglobin, beta
TACCTGCAGA	1157	Hs.416073	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
CCCAACGCGC	844	Hs.398636	hemoglobin, alpha 2
GTGGCCACGG	430	Hs.112405	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
TACCTTCTGC	391	Hs.372009	CDNA FLJ42951 fis, clone BRSTN2007765
GTTGTGGTTA	368	Hs.48516	beta-2-microglobulin
TCCCCGTACA	334		No match
GCCTGCTATT	317	Hs.511887	defensin, alpha 1, myeloid-related sequence
TCCCTATTAA	313		No match
TAGGTTGTCT	277	Hs.374596	tumor protein, translationally-controlled 1
GACTGCTATT	241	Hs.294176	defensin, alpha 3, neutrophil-specific
GTGACCACGG	196	Hs.449065	hypothetical protein FLJ38374
GTGCACCTGA	186	Hs.155376	hemoglobin, beta
ATAATTCTTT	152	Hs.539	ribosomal protein S29
TTGGTGAAGG	151	Hs.75968	thymosin, beta 4, X-linked
ATGTAAAAAA	137	Hs.234734	lysozyme (renal amyloidosis)
CACCTAATTG	126	Hs.461412	Transcribed sequence with moderate similarity to protein prf:810024E (H.sapiens) 810024E cytochrome oxidase III [Homo sapiens]
TGTGTTGAGA	126	Hs.439552	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
CCTGTAATCC	126	Hs.415988	5'-nucleotidase, cytosolic II
TTGGTCCTCT	125	Hs.381172	ribosomal protein L41
CTGACCTGTG	124	Hs.77961	major histocompatibility complex, class I, B
GAAATAAAGC	120	Hs.413826	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)
CCACTGCACT	119	Hs.107003	cyclin B1 interacting protein 1
CCCATCGTCC	119	Hs.417764	Transcribed sequence with strong similarity to protein prf:0512543A (H.sapiens) 0512543A oxidase II,cytochrome [Homo sapiens]
GTGAAACCCC	116	Hs.477083	platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kDa
GCATAATAGG	115	Hs.381123	ribosomal protein L21
CACAAACGGT	113	Hs.504524	ribosomal protein S27 (metallopanstimulin 1)
TCAGATCTTT	111	Hs.446628	ribosomal protein S4, X-linked
CTGGGTTAAT	108	Hs.381184	ribosomal protein S19

TTCATACACC	106	Hs.438891	F-box only protein 22
TTCAATAAAA	104	Hs.356502	ribosomal protein, large, P1
CTAAGACTTC	104	Hs.528891	Transcribed sequences
GTTCACATTA	103	Hs.446471	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)
AGAGGTGTAG	103		No match
GTAAAAAAAA	102	Hs.356190	ubiquitin B
TTGGGGTTTC	99	Hs.448738	ferritin, heavy polypeptide 1
CAATAAATGT	98	Hs.80545	ribosomal protein L37
TGCACGTTTT	97	Hs.265174	ribosomal protein L32
GAGGGAGTTT	91	Hs.356342	ribosomal protein L27a
GGGCTGGGGT	89	Hs.430207	ribosomal protein L29
GGATTTGGCC	89	Hs.437594	ribosomal protein, large P2
CAAGCATCCC	89	Hs.470205	Transcribed sequences
ACACAGCAAG	87	Hs.27115	EMI domain containing 2
TACCATCAAT	86	Hs.169476	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
TGTACCTGTA	85	Hs.446608	tubulin, alpha, ubiquitous
TAAGGAGCTG	84	Hs.355957	ribosomal protein S26
GGTCAGTCGG	82	Hs.155499	golgi-specific brefeldin A resistance factor 1
ACTTTTTCAA	81	Hs.133430	Transcribed sequences
TTGTAATCGT	79	Hs.446427	ornithine decarboxylase antizyme 1

Quando o perfil HbS foi analisado quanto ao número de cópias dos transcritos únicos, observou-se que 85,37% dos transcritos apresentavam entre uma e duas cópias, 11,57 % apresentava entre três a nove cópias, 2,81% entre 10 a 100 cópias e apenas 0,25% dos transcritos com mais de 100 cópias.

4.2 - Análise Global da Expressão Gênica do Perfil HbSHU

O segundo perfil foi construído a partir de uma segunda amostra de células da medula óssea do paciente com AF, coletada 90 dias após a administração inicial da HU. Este período foi determinado a fim de certificarmos que a droga tivesse começado a exercer algum efeito benéfico no paciente AF e este efeito pudesse ser detectado através de exames hematológicos (como por exemplo, aumento da HbF).

Foram seqüenciadas 46.697 *tags*, perfazendo 15.901 *tags* distintas, as quais foram submetidas à mesma classificação utilizada no perfil anterior e os dados gerais da classificação estão dispostos na tabela 8.

Tabela 8 – Dados gerais do perfil HbSHU.

CLASSIFICAÇÃO	**N.° *TAGS***
Total seqüenciado	46.697
Tags distintas (únicas)	15.901
Genes identificados	8.061
ESTs e *ORFs*	2.029
cDNA/ RNA	730
Proteínas hipotéticas	1.264
No Matches	3.817

Os 50 transcritos que apresentaram maior expressão do perfil HbSHU estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - 50 transcritos mais expressos no perfil HbSHU.

TAG	FREQUENCIA	HS	DESCRIÇÃO
CTTCTTGCCC	1499	Hs.449630	hemoglobin, alpha 2
GCAAGAAAGT	1450	Hs.155376	hemoglobin, beta
TACCTGCAGA	676	Hs.416073	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
CCCAACGCGC	463	Hs.398636	hemoglobin, alpha 2
GTGGCCACGG	461	Hs.112405	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
GTTGTGGTTA	393	Hs.48516	beta-2-microglobulin
TAGGTTGTCT	311	Hs.374596	tumor protein, translationally-controlled 1
GGATTTGGCC	305	Hs.437594	ribosomal protein, large P2
GCTTTCTCAC	279		No Match
CACCTAATTG	245	Hs.461412	Transcribed sequence with moderate similarity to protein prf:810024E (H.sapiens) 810024E cytochrome oxidase III [Homo sapiens]
GCCTGCTATT	233	Hs.511887	defensin, alpha 1, myeloid-related sequence
CCCATCGTCC	224	Hs.417764	Transcribed sequence with strong similarity to protein prf:0512543A (H.sapiens) 0512543A oxidase II,cytochrome [Homo sapiens]
ATAATTCTTT	221	Hs.539	ribosomal protein S29
GAGGGAGTTT	221	Hs.356342	ribosomal protein L27a
GCATAATAGG	208	Hs.381123	ribosomal protein L21
GTTCACATTA	202	Hs.446471	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)
TACCTTCTGC	201	Hs.372009	CDNA FLJ42951 fis, clone BRSTN2007765
ATGTAAAAAA	199	Hs.234734	lysozyme (renal amyloidosis)
GACTGCTATT	180	Hs.294176	defensin, alpha 3, neutrophil-specific
CACAAACGGT	180	Hs.504524	ribosomal protein S27 (metallopanstimulin 1)
TTCATACACC	165	Hs.438891	F-box only protein 22
TTGGTGAAGG	161	Hs.75968	thymosin, beta 4, X-linked
GAAATAAAGC	158	Hs.413826	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)
ATTCAGAGCT	157	Hs.449631	hemoglobin, gamma A
CTAAGACTTC	154	Hs.528891	Transcribed sequences
CTGGGTTAAT	154	Hs.381184	ribosomal protein S19
GGGCTGGGGT	151	Hs.430207	ribosomal protein L29
ATGCAGAGCT	151	Hs.302145	hemoglobin, gamma G

TTGGTCCTCT	143	Hs.381172	ribosomal protein L41
CTGACCTGTG	143	Hs.77961	major histocompatibility complex, class I, B
ACTTTTTCAA	141	Hs.133430	Transcribed sequences
GAAAAATGGT	138	Hs.374553	laminin receptor 1 (ribosomal protein SA, 67kDa)
TTCAATAAAA	133	Hs.356502	ribosomal protein, large, P1
GTAAGTGTAC	130		No Match
TCAGATCTTT	127	Hs.446628	ribosomal protein S4, X-linked
GTGAAACCCC	125	Hs.477083	platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kDa
TGCACGTTTT	124	Hs.265174	ribosomal protein L32
GTGAAGGCAG	124	Hs.356572	ribosomal protein S3A
TAATAAAGGT	113	Hs.512675	ribosomal protein S8
AGGCTACGGA	111	Hs.449070	ribosomal protein L13a
GCTTTATTTG	110	Hs.426930	actin, beta
TAAGGAGCTG	109	Hs.355957	ribosomal protein S26
GGACCACTGA	109	Hs.119598	ribosomal protein L3
AAAACATTCT	105	Hs.472321	Transcribed sequences
GGGAAGCAGA	105	Hs.506845	F11 receptor
CAATAAATGT	105	Hs.80545	ribosomal protein L37
TGTGTTGAGA	103	Hs.439552	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
GCAGCCATCC	100	Hs.356371	ribosomal protein L28
TTGGGGTTTC	100	Hs.448738	ferritin, heavy polypeptide 1
TACCATCAAT	92	Hs.169476	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Os transcritos que apresentaram entre uma e duas cópias neste perfil totalizaram 83,73% das *tags* únicas, enquanto aqueles que estavam entre três e nove cópias perfaziam 13,27%, enquanto 2,66% dos transcritos entre 10 e 100 cópias e somente 0,34% dos transcritos apresentaram-se com mais de 100 cópias.

4.3 - Análise Comparativa Entre os Perfis HbS x HbSHU

A comparação dos perfis HbS e HbSHU foi realizada com o objetivo de identificarmos os transcritos que apresentavam expressão igual em ambos os perfis, bem como transcritos que se encontravam diferencialmente expressos. O critério inicial para a seleção dos genes diferencialmente expressos adotado neste trabalho foi o valor de P menor

que 0,05 (AUDIC e CLAVERIE, 1997). Ou seja, foram considerados diferencialmente expressos somente os transcritos que apresentavam $P < 0,05$, dentre os quais estavam inclusos transcritos associados a genes já identificados, *ESTs*, *cDNA*s, *no matchs* e outros.

De acordo com este critério, foram inicialmente selecionados 518 transcritos (*tags* únicas) com $P < 0,05$. Os transcritos que apresentaram sua expressão reduzida no perfil HbSHU em relação ao HbS foram denominados repressos, e os transcritos que apresentaram maior expressão no perfil HbSHU em relação ao HbS, foram ditos induzidos. Desta forma, dentre os 518 transcritos, 241 transcritos se apresentaram repressos, enquanto 277 transcritos se apresentaram induzidos.

Alguns destes transcritos apresentaram expressão em apenas um dos perfis e neste caso eles foram denominados de transcritos exclusivos ao perfil encontrado. Entretanto, outros transcritos apresentaram expressão em ambos os perfis e foram denominados de comuns, variando apenas a diferença de expressão entre ambos os perfis (indução ou repressão da expressão).

No diagrama de Venn abaixo estão ilustrados os 518 transcritos previamente selecionados por apresentarem $P < 0,05$ e sua distribuição nos perfis (figura 12).

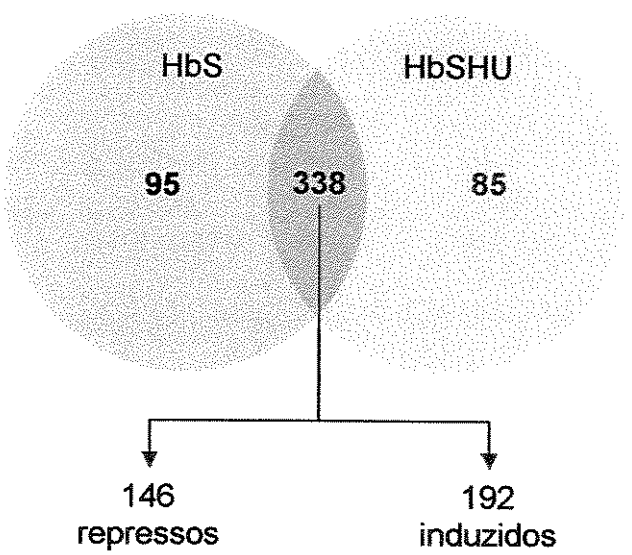


Figura 12 - Diagrama de Venn ilustrando os 518 transcritos com $P < 0,05$ e sua distribuição entre os perfis HbS e HbSHU.

Um segundo critério estatístico foi aplicado nos 518 transcritos (*tags* distintas) que apresentaram P < 0,05, a fim de assegurarmos que a diferença de expressão fosse realmente significativa. Este critério foi a diferença de expressão (*fold*), onde se estabeleceu que os transcritos diferencialmente expressos deveriam apresentar uma razão entre a diferença de expressão maior que 5 para os transcritos repressos, e maior que -5 para os transcritos induzidos (AUDIC e CLAVERIE, 1997).

Um total de 308 transcritos apresentou P < 0,05 e *fold* maior que 5 ou -5. Dentre estes, 128 transcritos eram comuns a ambos os perfis, variando apenas a diferença de expressão em determinado perfil, 95 transcritos exclusivos ao perfil HbS (repressos) e, 85 transcritos exclusivos do perfil HbSHU (induzidos). No diagrama de Venn abaixo estão demonstrados os dados relativos a estes 308 transcritos (figura 13).

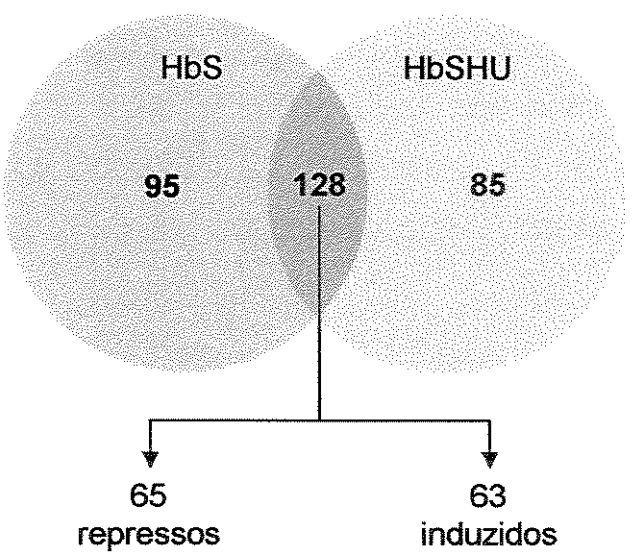


Figura 13 – Diagrama de Venn ilustrando os 308 transcritos com P < 0,05 e fold 5 ou -5, e sua distribuição entre os perfis HbS e HbSHU.

Nas tabelas 10 e 11 estão ilustrados os 50 transcritos repressos e induzidos respectivamente, que apresentaram maior diferença de expressão (*fold*) dentre os 308 transcritos selecionados. Estas tabelas apresentam não só genes identificados, como *no matchs*, *ESTs* e outros, que podem representar possíveis novos genes, ainda não identificados e associados com a AF e ação da HU.

Tabela 10 - 50 transcritos repressos que apresentaram maior diferença de expressão (*fold*) e P < 0,05 dentre os 308 transcritos selecionados.

TAG	HbS	HbSHU	P	FOLD	HS	DESCRIÇÃO
TCCCCGTACA	334	4	1,03160325341923E-92	83,5		No match
GTGCACCTGA	186	3	5,40191679622011E-51	62	Hs.155376	hemoglobin, beta
CCGACGGGCG	59	0	2,65936565191756E-18	59	Hs.300463	aconitase 2, mitochondrial
AGAGGTGTAG	103	2	2,89129640751578E-28	51,5		No match
TCCCGTACAT	49	0	2,53602411293808E-15	49		No match
AATGGATGAA	48	1	1,27537827297208E-13	48	Hs.491953	Transcribed sequences
GTGACCACGG	196	5	3,33992484207605E-51	39,2	Hs.449065	hypothetical protein FLJ38374
GAAGTCGGAA	38	0	4,80248740255242E-12	38	Hs.151738	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
CTAACTAGTT	37	0	9,53682397313417E-12	37	Hs.450216	Transcribed sequence with moderate similarity to protein ref:NP_060734.1 (H.sapiens) hypothetical protein FLJ10900 [Homo sapiens]
ACCCGCCGGG	34	0	7,46820728719783E-11	34		No match
CCCCGTACAT	26	0	1,80599532779167E-08	26		No match
TTTTTCCTTG	24	0	7,12183138377075E-08	24	Hs.356869	hepatocellular carcinoma-associated protein HCA3
TCCTATTAAG	23	0	1,41425987369095E-07	23		No match
GCAAGTATCA	23	0	1,41425987369095E-07	23		No match
TTGGAACAAT	23	0	1,41425987369095E-07	23	Hs.416801	ribosomal protein L7a
ATTAAGAGGG	21	0	5,5770467388614 5E-07	21	Hs.71968	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
AACGAGGAAT	20	0	1,10749510785167E-06	20		No match
GCCGTTCTTA	20	0	1,10749510785167E-06	20	Hs.234489	lactate dehydrogenase B
CCTGTGACAG	18	0	4,36733877164253E-06	18	Hs.120	peroxiredoxin 6
TCCCTATTAA	313	18	4,68025592450126E-70	17,39		No match
TAACAGCCTT	17	1	8,61692361349091E-05	17	Hs.180946	Similar to RIKEN cDNA 2900024C23 (LOC388650), mRNA
TGGTTCTATA	17	0	8,6727017907551E-06	17	Hs.26213	deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 1

GGTCAGTCGG	82	5	4,69021021635409E-19	16,4	Hs.155499	golgi-specific brefeldin A resistance factor 1
CAAATCCAAA	16	0	1,72223315580066E-05	16		No match
GCAGAAAGTG	32	2	4,5835089180463E-08	16	Hs.491274	Transcribed sequences
GCTAATGCCC	15	0	3,42002655516284E-05	15	Hs.355330	Transcribed sequences
AAACTATGCA	14	1	5,73639283220017E-04	14	Hs.76930	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
CCCGCCTCTT	13	0	1,3486664156361E-04	13	Hs.462451	Transcribed sequences
TACTGCAGAA	13	1	1,0721867652734E-03	13		No match
TCCCCTACAT	12	0	2,67819426190715E-04	12		No match
CAAGGGAAAC	12	1	1,99620562634518E-03	12	Hs.270845	kinesin family member 23
TGTAGAAAAA	11	1	3,70006475383079E-03	11	Hs.512712	tubulin, beta polypeptide
TTGTAGTTTG	11	0	5,3183829754738E-04	11	Hs.15791	transmembrane 7 superfamily member 1 (upregulated in kidney)
GCTGCTATTG	11	0	5,3183829754738E-04	11	Hs.461516	Transcribed sequences
GGTTCGCTTG	11	0	5,3183829754738E-04	11		No match
TCTAAGTACG	11	0	5,3183829754738E-04	11	Hs.300463	aconitase 2, mitochondrial
GCATAGAAAC	11	0	5,3183829754738E-04	11		No match
ACAGCAAAGT	11	1	3,70006475383079E-03	11	Hs.278994	Rhesus blood group, CcEe antigens
CTCTAAGAAG	11	0	5,3183829754738E-04	11	Hs.9641	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide
GCAAGAACGT	11	0	5,3183829754738E-04	11		No match
CCTGGGTTCT	10	0	1,05612941809784E-03	10		No match
AATATGTGGG	10	1	6,82333174415829E-03	10	Hs.351875	cytochrome c oxidase subunit VIc
CCTGGCCCTA	10	1	6,82333174415829E-03	10	Hs.82407	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
CCTGCTATTG	10	1	6,82333174415829E-03	10	Hs.465410	Transcribed sequences
GCAAGACAGT	10	1	6,82333174415829E-03	10		No match
GTATGTTATT	9	0	2,09727158219989E-03	9		No match
CCTTGTATTT	9	0	2,09727158219989E-03	9	Hs.502564	similar to NOTCH2 protein
CGCGTCACTA	9	0	2,09727158219989E-03	9		No match
GACCCAGAGG	9	0	2,09727158219989E-03	9	Hs.124747	hypothetical protein FLJ35258
CAGTAGGCAT	9	0	2,09727158219989E-03	9		No match

Tabela 11 - 50 transcritos induzidos que apresentaram maior diferença de expressão (*fold*) e P < 0,05 dentre os 308 transcritos selecionados.

TAG	HbS	HbSHU	P VAL	FOLD	HS	DESCRIÇÃO
GGATATGTGG	1	23	1,31328024813067E-06	-23	Hs.326035	early growth response 1
GGGGCAGGGC	1	14	4,68823254728015E-04	-14	Hs.406397	glial fibrillary acidic protein
AGGAGGTATC	1	14	4,68823254728015E-04	-14	Hs.105806	granulysin
TGTAGGTCAT	1	14	4,68823254728015E-04	-14	Hs.111554	ADP-ribosylation factor-like 7
AATATTGAGA	1	13	8,88796154231358E-04	-13	Hs.405590	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa
GTTTGGGTTG	1	13	8,88796154231358E-04	-13	Hs.459927	prothymosin, alpha (gene sequence 28)
TAAATAATTT	1	12	1,67838804725552E-03	-12	Hs.1197	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)
AGACTAACCT	0	11	4,48016848802337E-04	-11	Hs.348264	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)
GTGGTGGGTG	1	11	3,15532730591178E-03	-11	Hs.433668	chromosome 21 open reading frame 4
TGAAAACTAC	1	10	5,90160952966592E-03	-10	Hs.914	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
AGACCCACAA	0	10	9,0248290554059E-04	-10		No match
GTTTTCTCAC	1	10	5,90160952966592E-03	-10		No match
TCCTCTTTCC	1	10	5,90160952966592E-03	-10	Hs.943	natural killer cell transcript 4
ACCTCCACAC	1	10	5,90160952966592E-03	-10	Hs.337242	centaurin, beta 1
AGTTAGCAGT	1	10	5,90160952966592E-03	-10	Hs.19312	Transcribed sequences
GCAAAGATTG	1	10	5,90160952966592E-03	-10	Hs.212761	PI-3-kinase-related kinase SMG-1
GAATCAGAGC	1	10	5,90160952966592E-03	-10	Hs.420322	Kell blood group
GAAGGTCCTG	0	10	9,0248290554059E-04	-10	Hs.161357	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
AAAGAAAGTG	1	10	5,90160952966592E-03	-10	Hs.120870	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
GCGGTGACGG	0	10	9,0248290554059E-04	-10	Hs.411433	Fanconi anemia, complementation group L
CCTAAGTGAC	3	29	1,15270764428102E-06	-9,67	Hs.512077	Human T-cell receptor active beta-chain J/C-segment mRNA from thymus cells, clone pT-beta-2.
AAGCCAGGAC	1	9	1,09726986417693E-02	-9	Hs.10326	coatomer protein complex, subunit epsilon

ACGCTGCGGC	1	9	1,09726986417693E-02	-9		No match
GAAGATTGAG	1	9	1,09726986417693E-02	-9	Hs.437058	signal transducer and activator of transcription 5A
AGGATGACCC	1	9	1,09726986417693E-02	-9	Hs.333418	FXYD domain containing ion transport regulator 5
GGGGTCAGGG	0	9	1,81795706337893E-03	-9	Hs.145820	phosphorylase, glycogen; brain
AGCCCTCCCT	1	9	1,09726986417693E-02	-9	Hs.389101	RNA binding protein (autoantigenic, hnRNP-associated with lethal yellow)
GAAATTTGAA	1	9	1,09726986417693E-02	-9	Hs.435461	hypothetical protein FLJ20519
GTGGCCACTG	1	8	2,02592228354668E-02	-8	Hs.310454	Transcribed sequences
GGGAGGGAAG	1	8	2,02592228354668E-02	-8	Hs.75243	bromodomain containing 2
GCTAGGTTTA	1	8	2,02592228354668E-02	-8		No match
CTGACCGGTG	1	8	2,02592228354668E-02	-8	Hs.505806	pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1
CAGGGAGCGC	0	8	3,66208364058673E-03	-8	Hs.410347	PC2 (positive cofactor 2, multiprotein complex) glutamine/Q-rich-associated protein
AAAATATTTT	0	8	3,66208364058673E-03	-8	Hs.119000	actinin, alpha 1
GAAGTTATGA	1	8	2,02592228354668E-02	-8	Hs.4112	t-complex 1
GGCCAGCCCT	1	8	2,02592228354668E-02	-8	Hs.368741	phosphofructokinase, liver
TCCTCAAGAT	1	8	2,02592228354668E-02	-8	Hs.433413	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)
ACAGGGTGAC	1	8	2,02592228354668E-02	-8	Hs.174050	endothelial differentiation-related factor 1
AATACTTCTC	2	16	6,5320844273409E-04	-8		No match
AAGAGGTTTG	1	8	2,02592228354668E-02	-8	Hs.74368	cytoskeleton-associated protein 4
TACCCCTCTC	0	7	7,3768830192982E-03	-7	Hs.355888	phospholipase C, beta 2
GCATAATAAG	1	7	3,70952780490026E-02	-7	Hs.11594	CDNA FLJ27273 fis, clone TMS00761
GCAGCTCCAT	0	7	7,3768830192982E-03	-7	Hs.302766	chromosome 9 open reading frame 19
CATTTGCACT	0	7	7,3768830192982E-03	-7	Hs.82401	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)
TTCTGTAGCC	1	7	3,70952780490026E-02	-7	Hs.5541	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous
GACTCTGTGT	0	7	7,3768830192982E-03	-7	Hs.3109	Rho GTPase activating protein 4
TCAGTGACCA	0	7	7,3768830192982E-03	-7	Hs.315366	protein kinase C, eta
GGCCAGGTGG	1	7	3,70952780490026E-02	-7	Hs.183138	procollagen (type III) N-endopeptidase
TTATGGGGAG	1	7	3,70952780490026E-02	-7	Hs.257827	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)
TTACGAGGAA	1	7	3,70952780490026E-02	-7	Hs.227949	SEC13-like 1 (S. cerevisiae)

4.4 - Classificação Funcional dos Perfis HbS E HbSHU

A análise funcional comparativa dos perfis HbS e HbSHU foi realizada por um programa computacional específico, desenvolvido pela equipe do Hemocentro da Unicamp e que utiliza o banco de dados do *Gene Ontology Consortium* (www.geneontology.org). O *Gene Ontology* se divide em três ontologias principais, relacionadas às *funções moleculares*, aos *processos biológicos* e aos *componentes celulares*. Estas ontologias apresentam categorias e subcategorias, que são divididas em níveis. No nível um, estão descritas as categorias mais superficiais, enquanto no nível dois se encontram as subcategorias referentes às categorias anteriores e assim por diante. Neste trabalho foram analisadas as ontologias *processos biológicos* e *funções moleculares*, ambas analisadas nos níveis um e dois de cada ontologia, e adicionalmente, a ontologia relacionada à *função molecular* foi analisada até o nível três, ou seja, em um nível mais detalhado da classificação funcional.

Inicialmente foram submetidos à análise funcional todos os transcritos únicos referentes a cada perfil, porém foram abordados neste trabalho apenas os 518 transcritos diferencialmente expressos que apresentaram $P < 0,05$. Os dados referentes à classificação funcional completa de ambos os perfis podem ser conferidos no endereço www.hemocentro.unicamp.br/submition.

Quando os 518 transcritos diferencialmente expressos foram analisados quanto aos *processos biológicos* no nível mais superficial desta ontologia (nível um), observou-se que os transcritos distribuíram-se entre sete categorias distintas, uma das categorias referente aos transcritos que não possuíam função biológica conhecida. A categoria que apresentou maior expressão, sem apresentar diferença entre os perfis foi a categoria dos *processos fisiológicos* (*physiological process*). Na figura 14 está demonstrado o gráfico da classificação funcional dos 518 transcritos na ontologia processos biológicos, nível um.

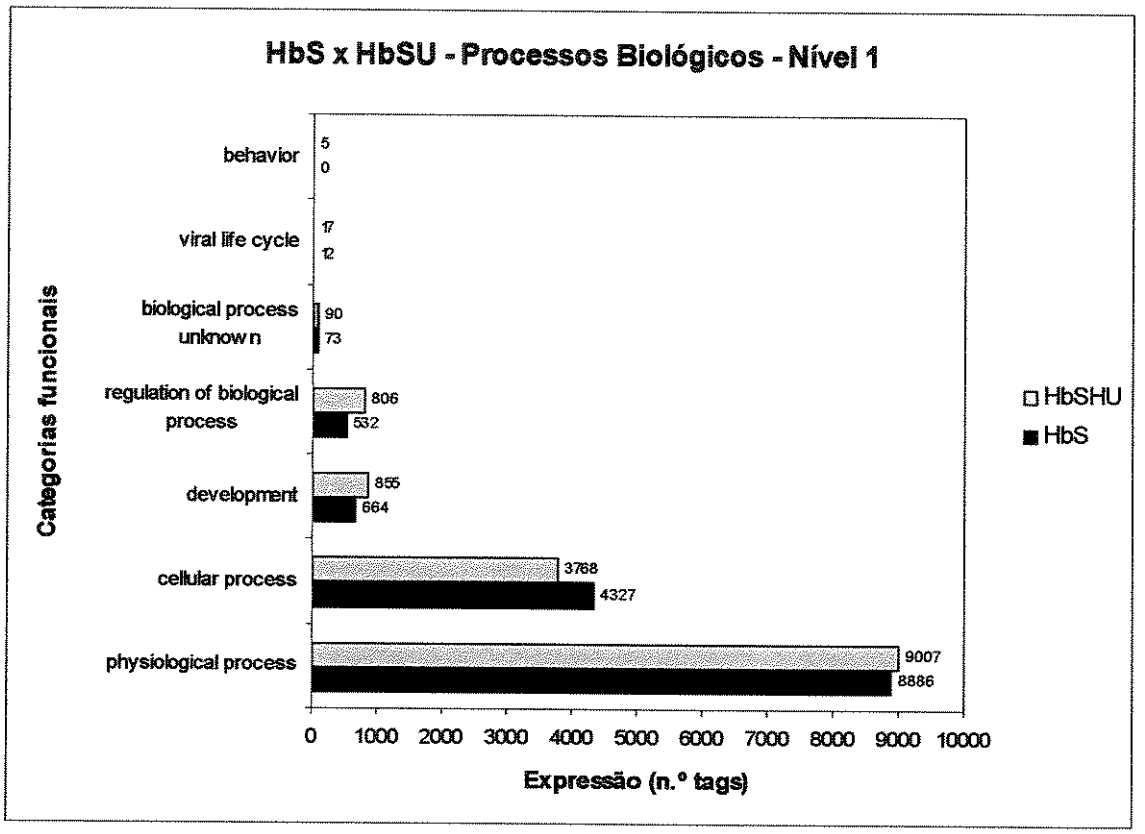


Figura 14 - Gráfico da análise funcional comparativa entre os perfis HbS e HbSHU dentro da ontologia processos biológicos, nível 1. Os números ao lado de cada barra são referentes ao número de *tags* de cada perfil associadas a categoria funcional.

A análise funcional dos 518 transcritos utilizando o nível dois da ontologia *processos biológicos* demonstrou que as *tags* selecionadas distribuíram-se entre 23 subcategorias. A categoria *ligação de DNA fita simples* (*single - stranded DNA binding*) foi a categoria com maior indução de expressão após o tratamento com HU (aproximadamente 6 x), onde foram encontrados genes como o *HMGB1 (high-mobility group box 1)*. Outras categorias apresentaram menor diferença em suas expressões após o tratamento com a HU. Os dados completos da anotação funcional dos 518 transcritos diferencialmente expressos em nível dois da ontologia *processos biológicos* podem ser observados na figura 15.

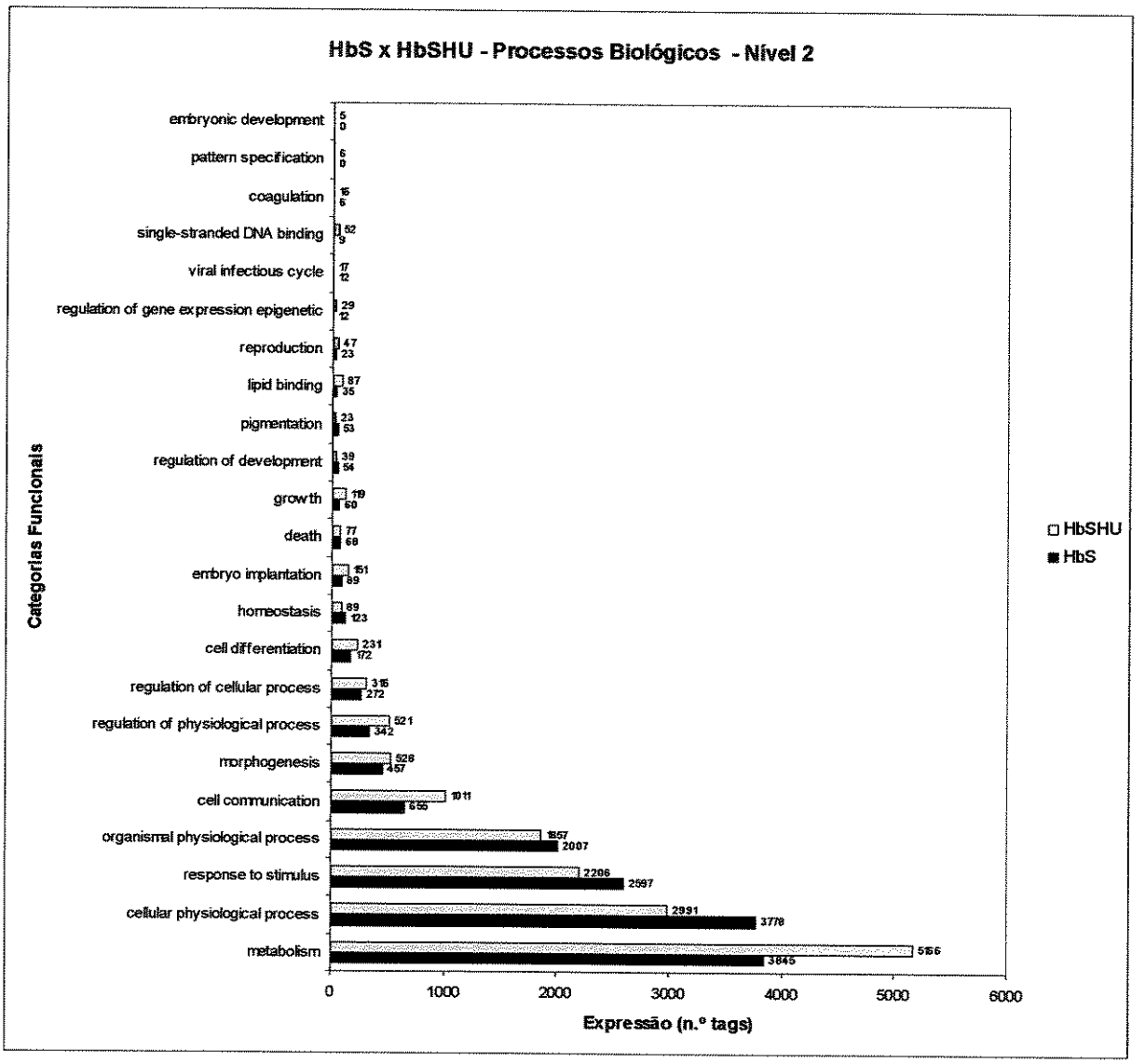


Figura 15 - Gráfico da análise funcional comparativa entre os perfis HbS e HbSHU dentro da ontologia processos biológicos, nível 2. Os números ao lado de cada barra são referentes ao número de *tags* de cada perfil associadas a categoria funcional.

Quando os transcritos diferencialmente expressos foram analisados quanto a suas *funções moleculares* utilizando o nível um desta ontologia, observou-se que as *tags* distribuíram-se entre 11 categorias funcionais, sendo uma categoria referente aos transcritos cuja função molecular ainda não foi estabelecida. Categorias como *ligação* (*binding*) e

atividade estrutural da molécula (*structural molecule activity*) foram algumas das que apresentaram indução do padrão de sua expressão no perfil HbSHU, enquanto as categorias, *atividade transportadora* (*transporter activity*) e *atividade antioxidante* (*antioxidant activity*), apresentaram repressão do padrão de expressão após a administração da HU (figura 16).

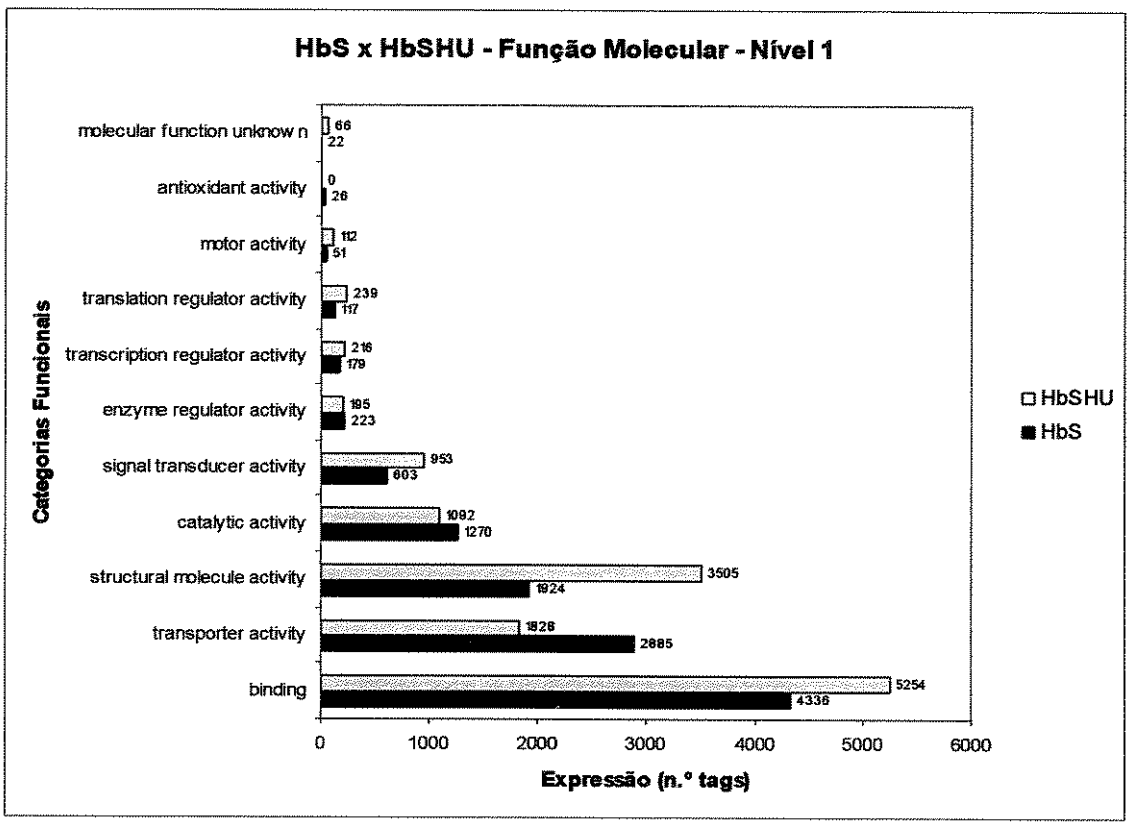


Figura 16 - Gráfico da análise funcional comparativa entre os perfis HbS e HbSHU dentro da ontologia função molecular, nível 1. Os números ao lado de cada barra são referentes ao número de *tags* de cada perfil associadas a categoria funcional.

A análise funcional dos 518 transcritos diferencialmente expressos quanto as suas *funções moleculares* em nível dois desta ontologia revelou uma distribuição das *tags* entre 54 subcategorias distintas. Neste nível, observou-se um maior número de categorias apresentando alguma diferença de expressão após o tratamento com a HU.

A categoria funcional que apresentou maior indução da expressão gênica (aproximadamente 14 x) após o tratamento com a HU foi a categoria *atividade transportadora da classe de canais ou poros* (*channel or pore class transporter activity*). Outras categorias funcionais apresentaram menor indução em suas expressões após o tratamento com a HU. Apesar das diferenças nas expressões não serem significativas, pode-se observar uma tendência à indução de categorias associadas à atividade transcricional. Na tabela 12 estão demonstrados algumas das categorias induzidas (mais relevantes) e os genes encontrados em cada uma das categorias.

Tabela 12 – Apresentação dos genes presentes nas categorias (mais relevantes) com indução da expressão em nível dois da ontologia *funções moleculares*.

CATEGORIA FUNCIONAL	GENES
Atividade transportadora da classe de canais ou poro	*- Voltage-dependent anion channel 1 (HVDAC)*
	- FXYD domain containing ion transport regulator 5 (FXYD5)
Atividade reguladora da elongação da transcrição	*- High-mobility group nucleosome binding domain 1 (HMGN1)*
Atividade RNA polimerase II fator de transcrição	*- V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog - HMGN1*
	- Basic transcription factor 3 (BTF3)
	- Lipopolysaccharide-induced TNF factor (LITAF)
	- TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 28kDa (TAF11)
	- Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4)
	- Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1)
	- Prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy) (PSAP)
Atividade ativadora de enzima	*- Centaurin, beta 1 (CENTB1)*
	- Rho GTPase activating protein 4 (ARGHAP4)
	- Ras and Rab interactor 3 (RIN3)
	- Prefoldin 5 (PFDN5)
Atividade de cofactor de transcrição	*- Pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1 (PBXIP1)*
	- Nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4)

Por outro lado, duas categorias apresentaram redução significativa na expressão após a administração da HU: *atividade peroxidase* (*peroxidase activity*) (26 x) e *atividade motora de microtubulo* (*microtubule motor activity*) (30 x). As categorias (mais relevantes) que apresentaram expressão reduzida após a administração da HU, bem como os genes pertencentes a estas categorias estão descritos na tabela 13.

Tabela 13 – Apresentação dos genes presentes nas categorias (mais relevantes) com expressão repressa após a administração da HU, em nível dois da ontologia *funções moleculares*.

CATEGORIA FUNCIONA	GENES
Atividade motora de microtubulo	- *kinesin family member 23* (*KIF23*)
Atividade repressora da transcrição	- *Twist homolog 2 (Drosophila) (TTYH2)*
Atividade de proteína auxiliar de transporte	- *Defensin, alpha 4, corticostatin (DEFA4)*
Atividade liase	- *Aconitase 2, mitochondrial (ACO2)*
	- *Carbonic anhydrase I (CA1)*
	- *Ferrochelatase (protoporphyria) (FECH)*
Ligação de peptideo	- *Peptidyl prolyl isomerase H (cyclophilin H) (PPIH)*
Atividade peroxidase	- *Eosinophil peroxidase* (*EPX*),
	- *Peroxiredoxin 6* (*PRDX6*)

Para fins ilustrativos, o gráfico desta ontologia em nível dois, com as 54 subcategorias foi dividido em 2 gráficos, cada um contendo 27 subcategorias (figura 17). No gráfico 17 A estão apresentadas as 27 subcategorias que apresentaram maior expressão, enquanto no gráfico 17 B estão ilustradas as 27 subcategorias restantes.

A

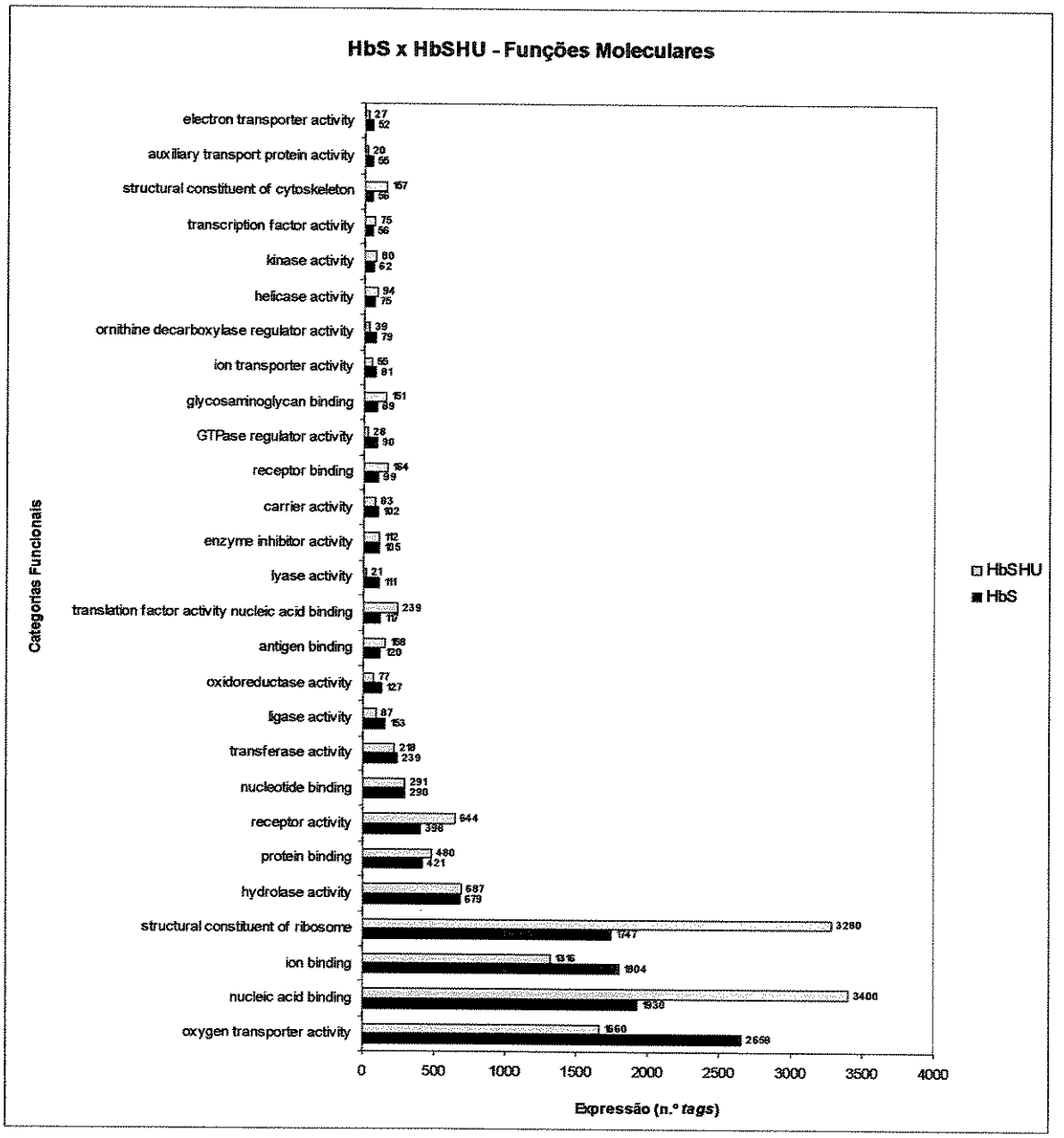


Figura 17 A - Gráfico da análise funcional comparativa dos perfis HbS e HbSHU dentro da ontologia funções moleculares, nível 2, contendo 27 das subcategorias associadas a este perfil. Os números ao lado de cada barra são referentes ao número de *tags* de cada perfil associadas à categoria funcional.

B

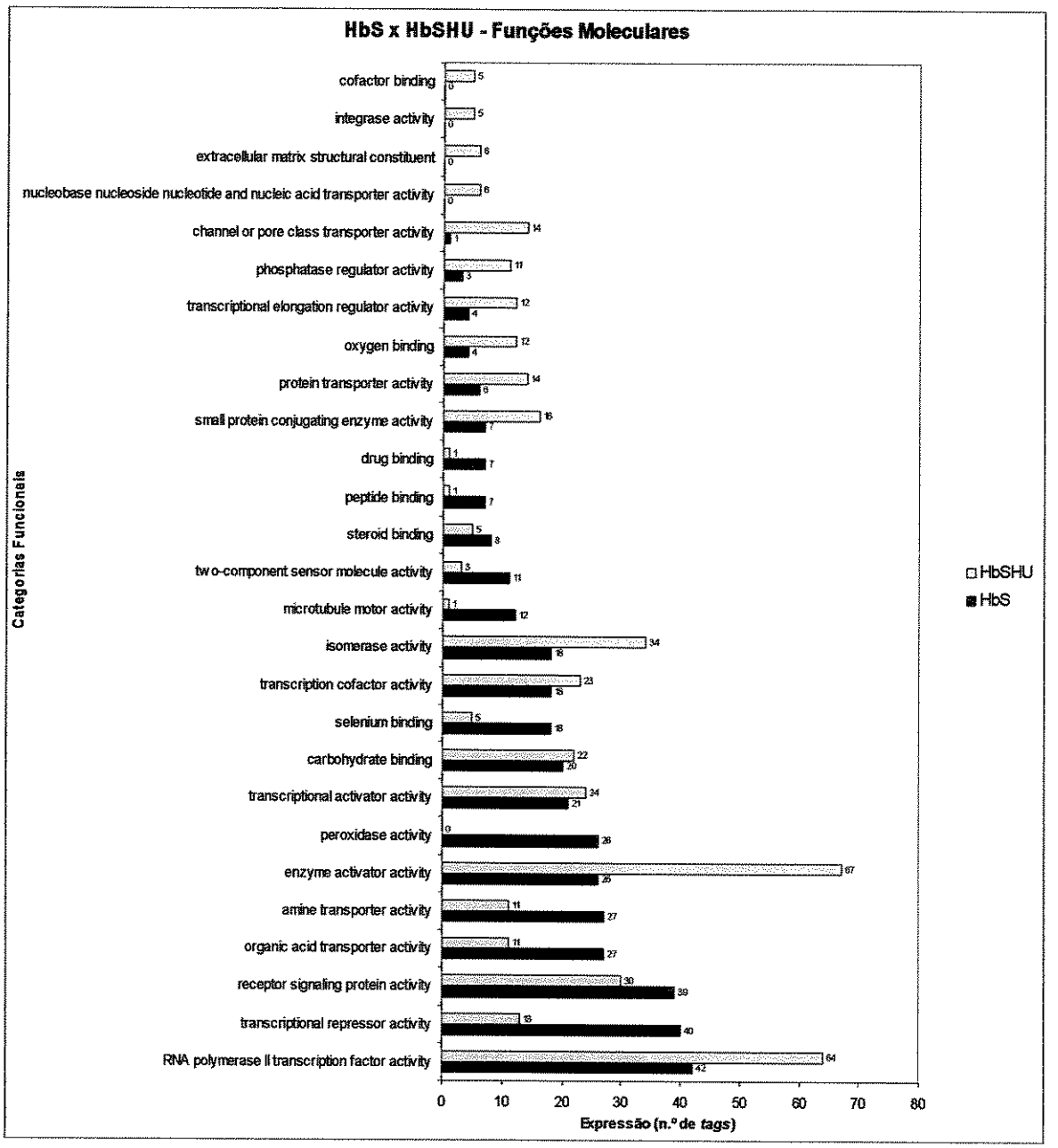


Figura 17 B - Gráfico da análise funcional comparativa entre os perfis HbS e HbSHU dentro da ontologia função moleculares (nível dois), contendo as subcategorias que apresentaram menor expressão. Os números ao lado de cada barra referem-se ao número de *tags* associadas à categoria funcional em cada perfil.

A fim de obtermos dados mais detalhados quanto à distribuição dos genes diferencialmente expressos entre as categorias funcionais e também visando encontrar vias ainda não associadas ao mecanismo da HU, a ontologia relacionada às *funções moleculares* foi analisada em nível três. Dentre as categorias que apresentação indução e repressão mais significativa da expressão após a administração da HU, a categoria *atividade ativadora de GTPase* (*GTPase activator activity*) apresentou indução de aproximadamente 23 x em sua expressão. Categorias como *ligação de citocinas* (*cytokine binding*) (aproximadamente 21 x) e *ligação de fator de crescimento* (*growth factor binding*) (aproximadamente 15 x) foram duas das quais apresentaram diminuição mais significativa da expressão após o tratamento com HU. As categorias funcionais (mais significativas) e os genes pertencentes a estas categorias estão descritos na tabela 14.

Tabela 14 – Apresentação dos genes presentes nas categorias que apresentaram maior indução ou repressão no padrão de expressão em nível três.

CATEGORIAS	GENES
Atividade ativadora de GTPase	- *Centaurin, beta 1 (CENTB1)*
(induzida)	- *Rho GTPase activating protein 4 (ARGHAP4)*
	- *Ras and Rab interactor 3 (RIN3)*
Ligação de citocinas	- *Interleukin 6 (IL-6)*
(repressa)	
Ligação de fator de crescimento	- *Interleukin 6 (IL-6)*
(repressa)	- *Insulin-like growth factor binding protein 7(IGFBP7)*

4.5 - Validação dos Dados de *SAGE* por RT-PCR

Para garantirmos a confiabilidade dos dados gerados pela técnica de *SAGE* relativos à diferença de expressão obtidos na comparação dos perfis HbS e HbSHU, foram analisadas as expressões de 10, utilizando a metodologia de PCR semiquantitativo. Foram selecionados genes com expressão induzida, expressão repressa e também um gene com expressão igual em ambos os perfis. O gene constitutivo da *β-actina* foi escolhido como calibrador das reações (tabela 2). A tabela 15 demonstra os genes selecionados e a expressão obtida em cada um dos perfis gerados.

Tabela 15 - Genes selecionados para a validação por RT-PCR. Está demonstradas o n.° de *tags* relativo a expressão de cada gene obtida Pela técnica de *SAGE*.

GENES	EXPRESSÃO HbS (n.° *tags*)	EXPRESSÃO HbSHU (n.° *tags*)
FTH1	99	100
HBG	120	308
EDF1	1	8
ERH	1	8
EGR1	1	23
HSPE1	1	12
STAT5A	1	9
PRDX6	18	0
TF	8	1
TM7SF1	11	0

Na primeira etapa de validação, foram utilizadas amostras de cDNA transcritas reversamente a partir de células da medula óssea do paciente AF antes e após o tratamento com a HU. Foram analisadas as expressões de sete genes, escolhidos (critérios estatísticos já descritos): um gene com expressão igual em ambos os perfis (*FTH1*), um gene com expressão repressa (*PRDX6*) e 5 genes com expressão induzida após o tratamento com a HU (figura 18).

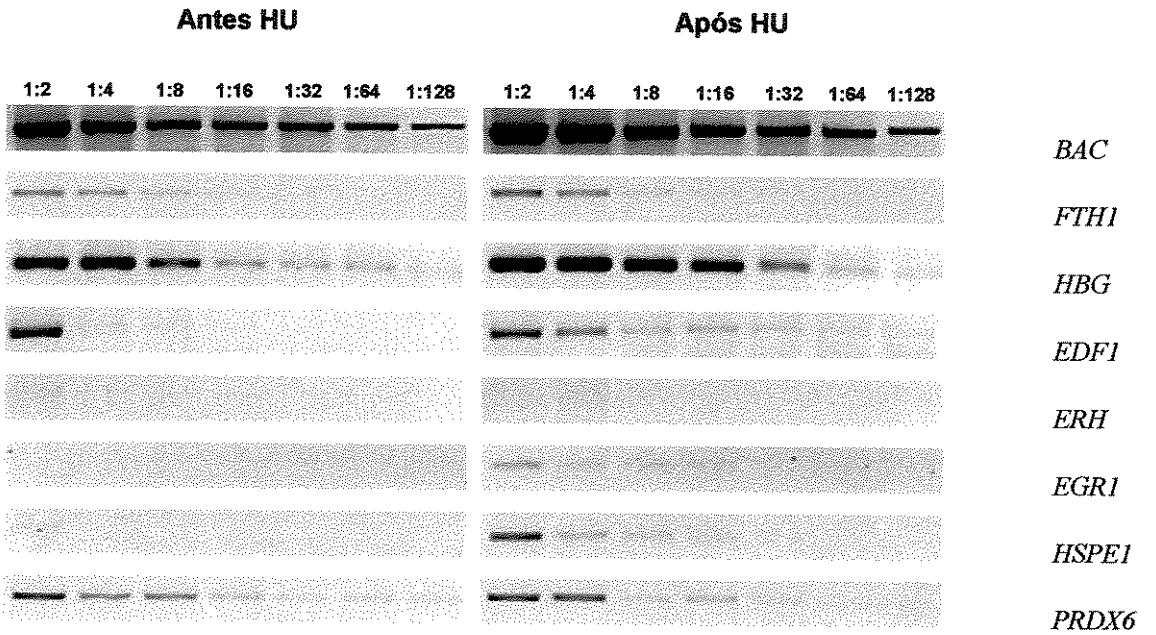


Figura 18 – Eletroforese em gel agarose 1,8% da amplificação dos genes por RT-PCR utilizando amostras de cDNA de células de medula óssea não tratada e tratada com HU, que foram utilizadas na construção dos perfis. Os genes estão descritos ao lado de cada fotografia, e as diluições (acima) variaram de 1:2 a 1:128.

Os resultados gerados pela técnica de *SAGE* para os sete genes estudados, quanto à indução ou repressão da expressão destes genes foram confirmados através da validação por meio de PCR semiquantitativo.

O gene da *Ferritina, cadeia pesada 1* (*FTH1 - Ferritin Heavy Chain 1*) apresentou amplificação até a diluição 1:16 em ambas as amostras, indicando expressão equivalente em ambas as amostras.

O gene γ globina (*HBG*), que apresentou amplificação intensa até a diluição 1:32 nas amostras tratadas com a HU enquanto nas amostras antes do tratamento com a HU, as amplificações começaram a diminuir de intensidade na diluição 1:16. Este dado confirma o aumento da HbF, promovido pela HU, já verificado anteriormente através da quantificação dos níveis de HbF.

Amplificações até a diluição 1:64 foram obtidas nas amostras tratadas com HU para o gene *Fator 1 Relacionado à Diferenciação Endotelial* (*EDF1 - Endothelial Differentiation Related Factor 1*), ao passo que apenas as diluições 1:2 e 1:4 das amostras não tratadas com HU apresentaram amplificações para o mesmo. Este gene está associado à modulação da transcrição de genes envolvidos com a diferenciação de células endoteliais.

Um gene cuja função ainda não está totalmente esclarecida é o gene *Homólogo ao Acentuador de Rudimentar* (*ERH - Enhancer of Rudimentary Homolog*). Porém, evidências apontam para função associada à regulação do ciclo celular. O gene *ERH* apresentou amplificações muito fracas em ambas as amostras, o que fez com que o resultado fosse inconclusivo.

A maior indução da expressão observada dentre os genes selecionados nos perfis gerados por *SAGE* foi apresentada pelo gene *EGR1*, um fator de transcrição. Apenas as amostras tratadas com a HU apresentaram amplificação deste gene, embora com fraca intensidade (foram obtidas amplificações até a diluição 1:16). Este resultado não significa que o paciente não possua expressão deste gene antes da administração da HU, mas sugere expressão muito baixa do mesmo, não detectável por meio da técnica de PCR semiquantitativo.

O gene da *Proteína 1 de choque térmico* (*HSPE1 - Heat Shock Protein 1*), uma chaperonina, também apresentou uma indução da expressão nas amostras com HU, onde são verificadas amplificações até a diluição 1:32 nas amostras tratadas com HU e apenas uma amplificação na diluição 1:2 na amostra não tratada.

O único gene utilizado para a validação com expressão repressa após o tratamento com a HU foi o gene *Peroxirredoxina 6* (*PRDX6 - Peroxirredoxin 6*), membro da família das peroxirredoxinas com papel importante na regulação do estresse oxidativo. As amostras não tratadas com HU apresentaram amplificações deste gene até a última diluição, e nas amostras sob tratamento com a HU houve um decréscimo da amplificação na diluição 1:64, indicando uma redução da expressão do gene.

Após a validação ter sido concluída nas mesmas amostras de células da medula óssea utilizadas para a construção dos perfis HbS e HbSHU, procedeu-se com a análise da expressão em amostras de células K562 não tratadas e tratadas com HU, que apresentam características de células comprometidas com a linhagem eritrocitária. Foram avaliadas as expressões dos sete genes analisados anteriormente nas amostras de medula óssea, e foram adicionados para a análise três outros genes: *STAT5A*, *TF* e *TM7SF1*. Os resultados obtidos por meio da amplificação dos genes por PCR estão demonstrados na figura 19.

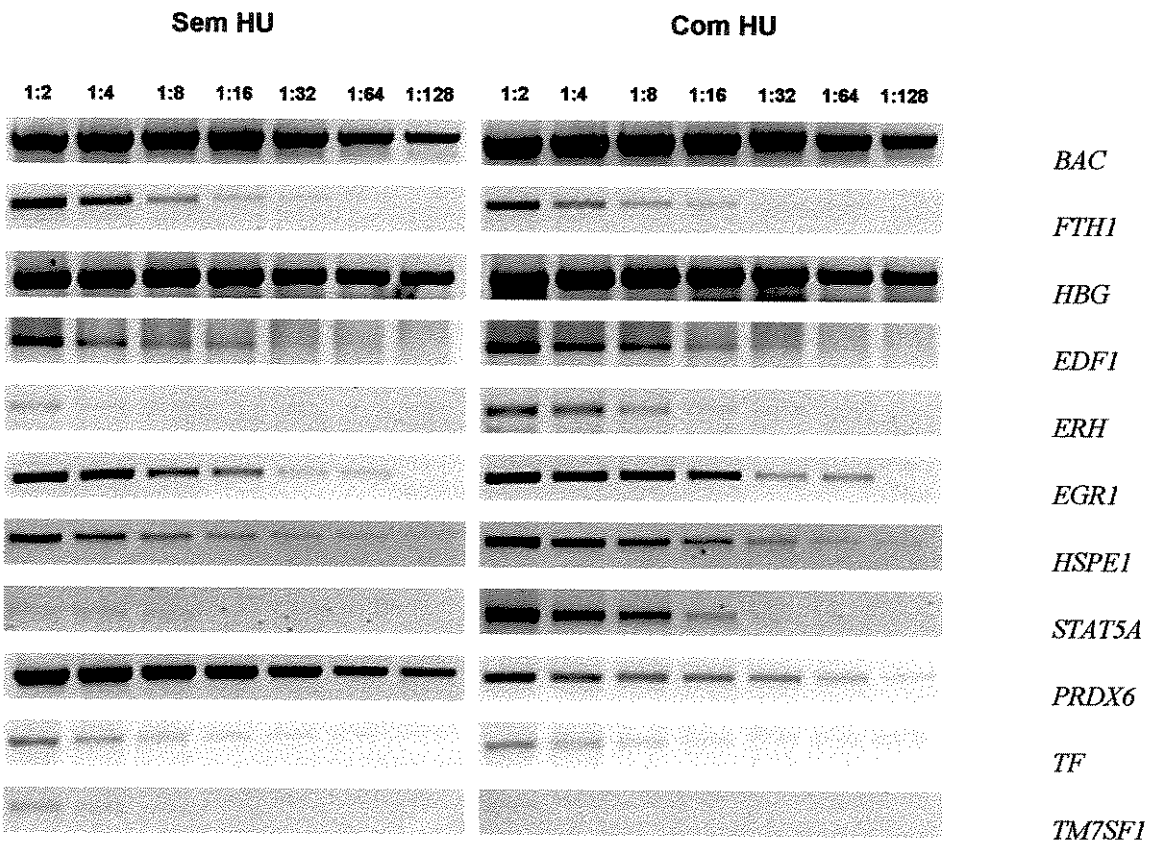


Figura 19 - eletroforese em gel de agarose 1,8% da amplificação dos genes em células K562 não tratadas e tratadas com HU por RT-PCR. Os genes estão descritos ao lado de cada ilustração, e as diluições (acima) variaram de 1:2 a 1:128.

Os resultados obtidos em células K562 também estão de acordo com os dados gerados a partir do *SAGE* de ambos os perfis para todos os genes selecionados.

O gene *FTH1* apresentou padrão de expressão equivalente tanto no perfil HbS quanto no HbSHU, e quando avaliada sua expressão em amostras de células K562 não tratadas e tratadas com HU, observou-se amplificações até a diluição 1:64 em ambas as amostras, confirmado os dados gerados pelo *SAGE*.

Para o gene da γ globina, as amplificações começam a sair da fase de platô na diluição 1:128 da amostra de cDNA de células K562 sem HU, enquanto na amostra com HU ainda foi possível observar forte amplificação, ainda dentro da fase de platô da reação.

O gene *EDF1*, também apresentou indução de sua expressão no perfil HbSHU. Os mesmos resultados foram obtidos com o PCR semiquantitativo em cDNA de células K562. As amostras tratadas com HU apresentaram amplificação até a diluição 1:32 e as amostras não tratadas apenas amplificações fracas até a diluição 1:4.

Um gene que também apresentou indução da expressão após a administração de HU nas amostras de cDNA de células K562 foi o gene *ERH*, onde foram obtidas amplificações até a diluição 1:16. Nas amostras onde não houve o tratamento com a HU, apenas amplificações fracas até a diluição 1:4 foram obtidas.

Para o gene *EGR1*, obtiveram-se amplificações intensas até a diluição 1:64 nas amostras de cDNA de células K562 tratadas com HU. Por outro lado, nas amostras de células K562 sem tratamento com HU foi possível observar amplificações intensas até a diluição 1:16, evidenciando a indução da expressão após o tratamento com HU.

O gene *HSPE1* apresentou amplificações fortes até a diluição 1:128 nas amostras tratadas com HU e, nas amostras não tratadas, houve decréscimo da amplificação já observada a partir da diluição 1:16.

Quando analisada a expressão do gene *PRDX6* em cDNA de células K562 sem tratamento com HU, observou-se amplificação intensa até a maior diluição (1:128), e decréscimo da amplificação a partir da diluição 1:64 nas amostras tratadas com HU.

Dentre os três genes adicionalmente analisados por meio de RT-PCR em amostras de células K562 tratadas e não tratadas com HU, o gene *Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 5A* (*STAT5A – Signal Transducer and Transcription Activator 5A)*, membro da família de fatores de transcrição e transdução de sinal *STAT* também apresentou expressão induzida após a administração da HU. Em amostras de células K562 não tratadas com HU, obteve-se amplificação fraca até a diluição 1:4 ao passo que, nas amostras tratadas com HU, até a diluição 1:16 pode-se verificar amplificação intensa.

Outros dois genes também tiveram suas expressões repressas pelo tratamento com a HU: *TF* e *Superfamília 1 de Gene Transmembrana 7* (*TM7SF1 – Transmembrane 7 Superfamilly 1)*. O gene *TF*, que está associado com o mecanismo de transporte de ferro, apresentou amplificação até a diluição 1:8 nas amostras de células K562 não tratadas com HU, e amplificação até a diluição 1:4 nas amostras sem tratamento com a HU. O gene *TM7SF1*, que ainda não possui função determinada, apresentou amplificações muito fracas em ambas as amostras de cDNA de células K562, sendo nas amostras não tratadas observa-se amplificação até a diluição 1:4 e nas tratadas quase não se observa amplificação em nenhuma diluição.

Assim, os resultados apresentados com os genes selecionados nas amostras onde foram construídos os perfis, confirmam a indução e repressão de alguns genes após a administração da HU detectada pela metodologia de *SAGE*. Desta forma, a identificação e quantificação dos níveis de expressão de genes específicos após o tratamento nos fornecem dados importantes sobre vias que podem estar associadas à ação da HU levando ao aumento da expressão do gene da γ globina e melhora da evolução do quadro clínico dos pacientes AF.

4.6 - Análise da Expressão de Genes em Pacientes com AF

A expressão de alguns genes, dentre aqueles selecionados para a validação, foi analisada com o emprego da metodologia de PCR quantitativo em tempo real (*Real Time PCR*) a fim de avaliarmos suas expressões em um outro grupo de pacientes HbSS não

tratados e tratados com a HU. Foram utilizadas amostras de cDNA extraídas a partir de sangue periférico de cinco pacientes HbSS não tratados e amostras de outros cinco pacientes HbSS tratados com a HU.

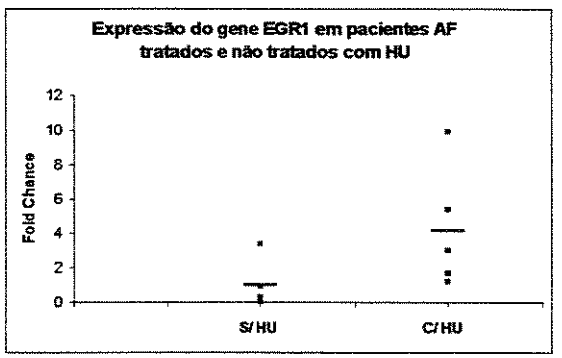
Foram escolhidos quatro genes para a realização deste estudo: dois genes com indução da expressão após o tratamento com a HU (*EGR1* e *HSPE1*), e dois genes com expressão repressa após a administração da HU, o gene *PRDX6* e *TM7SF1* (tabela 3). Os *primers* utilizados e condições de reação, bem como eficiência de amplificação e outros dados relativos ao PCR quantitativo em tempo real foram descritos previamente.

A análise da expressão do gene *EGR1* por PCR em tempo real demonstrou que o gene apresentou uma indução significativa em sua expressão após o tratamento com a HU, com P = 0,0556, confirmando um padrão semelhante de expressão como descrito pela metodologia de *SAGE*.

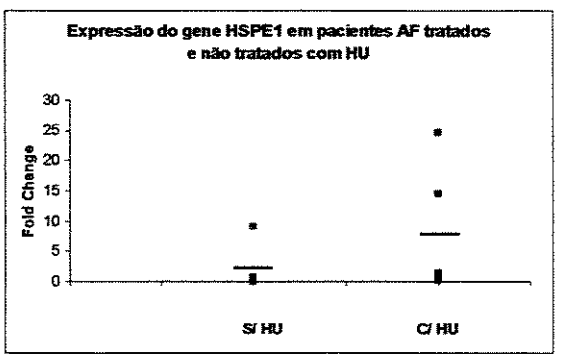
Por outro lado, a análise da expressão dos genes *HSPE1*, *PRDX6* e *TM7SF1* não apresentaram um valor de P significativo e, portanto não foram considerados estatisticamente significativos.

Na figura 20 estão representados os gráficos das análises dos quatro genes avaliados pela metodologia de PCR quantitativo em tempo real em pacientes com AF tratados e não tratados com HU.

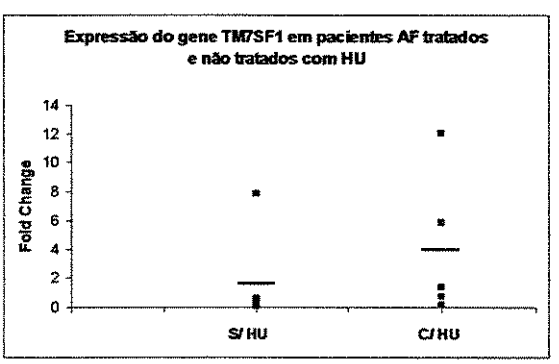
A



B



C



D

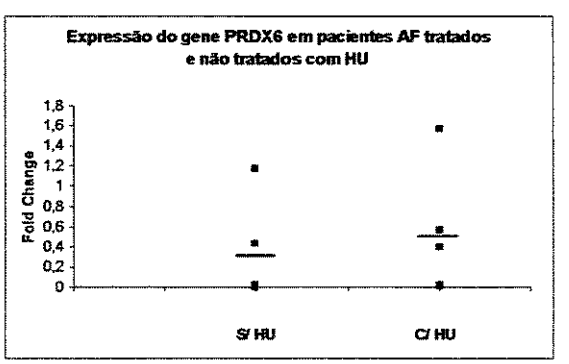


Figura 20 – Gráficos das análises de expressão dos genes *EGR1, HSPE1, PRDX6* e *TM7SF1* pela metodologia de PCR quantitativo em tempo real. **A** - Análise do gene *EGR1* em pacientes com AF tratados e não tratados com HU, onde se observa indução da expressão (P = 0,05); **B** – Análise do gene *HSPE1* em pacientes com AF, tratados e não tratados com HU (P = 0,3905); **C** - Análise do gene *TM7SF1* em pacientes com AF, tratados e não tratados com HU (P = 0,3095); **D** - Análise do gene *PRDX6* de um grupo de pacientes com AF, tratados e não tratados com HU (P = 0,4206).

5 - DISCUSSÃO

A anemia falciforme (AF) é uma das mais freqüentes hemoglobinopatias ocorrentes no Brasil. Ela é causada por uma mutação de ponto no códon 6 do gene da β globina, que leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina, originando uma hemoglobina estruturalmente anormal denominada hemoglobina S (HbS). Em baixas tensões de oxigênio a HbS se polimeriza, causando rigidez e deformação dos eritrócitos. Os pacientes com AF, isto é, homozigotos para a hemoglobinopatia S apresentam alto grau de hemólise, sofrem repetidas crises de dor e fenômenos vasoclusivos, injuria tecidual e ocasional necessidade de transfusões (EMBURY, 1986; LABIE e ELION, 1999).

Apesar de a 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 modulando a gravidade do quadro clínico da AF, dentre os quais se destaca a presença de elevados níveis de hemoglobina fetal (HbF) (EMBURY, 1996; CHIES e NARDI, 2001).

Diversos estudos demonstraram a relação entre elevados níveis de HbF e a evolução do quadro clínico dos pacientes AF. A HbF, que possui uma grande afinidade pelo oxigênio, exerce seu efeito benéfico por não participar do processo de polimerização, aumentando a solubilidade HbS, inibindo o processo de polimerização, que é responsável pelas crises vasoclusivas freqüentes nos pacientes AF (BALLAS *et al.*, 1999).

Agentes farmacológicos que possam induzir o aumento da expressão do gene γ globina (HbF) têm sido amplamente pesquisados. Atualmente, a hidroxiuréia (HU) é o agente farmacológico mais utilizado para promover o aumento da expressão do gene da γ globina (e conseqüente aumento nos níveis de HbF) devido a sua fácil administração e baixa toxicidade (CHARACHE, 1997; RODGERS, 1998).

Pacientes AF tratados com HU apresentaram menor ocorrência de fenômenos vasoclusivos, menor necessidade de transfusões sanguíneas e hospitalizações (RODGERS, 1997; STEINBERG *et al.*, 1997; KINNEY *et al.*, 1999). Entretanto, alguns pacientes com AF apresentam melhor evolução clínica antes de se detectar o aumento dos níveis de HbF, sugerindo que a HU não exerça seu efeito benéfico não apenas aumentando os níveis de HbF mas também por outras vias ainda desconhecidas (CHARACHE, 1997).

Foram utilizadas para a construção dos perfis HbS e HbSHU células da medula óssea, onde predominam células progenitoras comprometidas com a linhagem eritrocitária. A coleta da medula óssea do paciente com AF foi realizada em duas etapas: antes e após a administração da HU e os perfis foram gerados a partir da metodologia de *SAGE*.

Após a identificação dos 15.735 transcritos únicos encontrados no perfil HbS e 15.901 transcritos únicos do perfil HbSHU de acordo com o banco de dados do *The Cancer Genome Anatomy Projetcs* (*CGAP*), os perfis foram comparados entre si a fim de se obter os transcritos diferencialmente expressos. O critério inicial para a seleção dos transcritos diferencialmente expressos foi o valor de $P < 0,05$ (AUDIC e CLAVERIE, 1997). De acordo com este critério, 518 transcritos foram classificados como diferencialmente expressos com $P < 0,05$, dentre os quais foram encontrados genes identificados, *ESTs, "no matches"* e outros tipos de seqüências preditas e/ ou anotadas.

Os transcritos diferencialmente expressos distribuíram-se em duas situações distintas: transcritos que apresentaram maior expressão no perfil HbS (denominados de repressos) e transcritos que apresentaram maior expressão após a administração da HU (denominados induzidos). Desta forma, 241 transcritos apresentaram expressão induzida, enquanto 277 apresentaram expressão repressa após a administração da HU.

A análise funcional dos transcritos diferencialmente expressos pode fornecer dados importantes sobre mecanismos moleculares e funções biológicas desempenhadas por genes ou famílias de genes nos perfis gerados. Para esta análise foi utilizado um programa computacional (*GOLIAS*) desenvolvido especificamente para a análise de dados gerados a partir da metodologia de *SAGE* e que utiliza como base o banco de dados oferecido pelo *Gene Ontology Consortium*. Este programa tem como diferencial o fato de considerar expressão do gene determinada pelo *SAGE* (nº *tags*) e não apenas a presença ou não de determinado gene no perfil. Desta forma, foi possível considerarmos a expressão real de determinado transcrito no perfil em relação ao outro perfil, bem como analisar sua contribuição para o padrão de expressão de determinada categoria funcional. Foram submetidos à análise funcional os 518 transcritos diferencialmente expressos que apresentaram $P < 0,05$, e foram analisados em duas das três principais ontologias: *1) processos biológicos* e *2) funções moleculares*.

Quando os 518 transcritos diferencialmente expressos foram analisados em nível um (mais superficial) da ontologia *processos biológicos*, pouca diferença entre as categorias funcionais foi observada, sugerindo a necessidade de uma análise mais detalhada desta ontologia (figura 14). Assim, quando os transcritos foram analisados dentro do nível dois desta ontologia, foi observada uma distribuição dos transcritos entre 23 subcategorias funcionais, com a categoria *metabolismo* apresentando maior expressão de genes em ambos os perfis, e a categoria *ligação de DNA fita simples* apresentando-se como uma das categorias funcionais com maior indução no padrão de expressão após o tratamento com HU (aproximadamente 6 x – figura 15).

A análise funcional dos 518 transcritos diferencialmente expressos na ontologia *funções moleculares* em seu nível mais superficial apresentou uma distribuição dos transcritos entre 11 categorias funcionais, dentre as quais já se pode observar alguma diferença de expressão, como por exemplo, a indução da expressão da categoria associada à *atividade estrutural de molécula* e a repressão da expressão da categoria *atividade antioxidante* após o tratamento com a HU. Ainda neste mesmo nível, foi encontrada uma categoria funcional referente aos transcritos cujas funções moleculares ainda permanecem desconhecidas.

A fim de se obter dados mais detalhados a respeito da distribuição dos 518 transcritos diferencialmente expressos na ontologia relacionada às *funções moleculares*, uma segunda análise funcional foi feita utilizando o nível dois desta ontologia. Neste nível, os transcritos diferencialmente expressos distribuíram-se entre 54 subcategorias funcionais distintas, três das quais apresentaram diferença de expressão significativa entre os perfis. A categoria *atividade transportadora de canais e poros* (*channel or pore class transporter activity*) foi a categoria que apresentou maior indução da expressão (aproximadamente 14 x) após o tratamento com HU. Nesta categoria foram os genes *VDAC* e *FXYD5*. O gene VDAC foi inicialmente descrito como constituinte da membrana externa da mitocôndria, e posteriormente identificado como presente em outros compartimentos celulares, tais como membrana plasmática (MESSINA *et al*, 1999). O gene *FXYD5* pertence à família de genes *FXYD*, que são reguladores tecido específico da *Na, K-ATPase* e que produz efeitos distintos na afinidade dos íons K(+) e Na (+) (LI *et al.*, 2004). ADRAGNA e colaboradores

em 1994 sugeriram que a HU promova uma alteração na composição de íons *Na* e *K* em células endoteliais vasculares (VECs) em cultura quando adicionada após a fase de adesão das células e não durante a fase de sedimentação. As VECs estão envolvidas diretamente com os fenômenos vasoclusivos associados a AF (ADRAGNA, FONSECA e LAUF, 1994). Uma hipótese que pode ser sugerida é que a indução na expressão destes genes associados à *atividade transportadora da classe de canais e poros* após a administração da HU possa induzir a alteração da concentração dos íons sódio (*Na*) e potássio (*K*) e possivelmente levando a re-hidratação das células e alterando a densidade das células vermelhas, conseqüentemente diminuindo a polimerização e ocorrência de fenômenos vasoclusivos nos pacientes com AF.

Categorias associadas às atividades transcricionais e de síntese de proteínas apresentaram moderado aumento em seu padrão de expressão após o tratamento com a HU, tais como as categorias *atividade reguladora da enlongação da transcrição, atividade de cofator de transcrição* e outras previamente descritas na tabela 12. Uma exceção foi a categoria *atividade repressora da transcrição* (*transcriptional repressor activity*), cuja expressão estava repressa (aproximadamente 2 x) após a administração da HU. Ainda neste contexto, muitos genes com expressão induzida após o tratamento com HU encontrados no perfil HbSHU, eram grupos de proteínas ribossomais, que apresentam papel fundamental no controle da diferenciação, transformação celular, crescimento tumoral e metástase. A transcrição de grupos de proteínas ribossomais pode estar associada ao aumento da atividade transcricional de genes específicos (HASHIMOTO *et al*, 2003).

Neste trabalho, o fator de transcrição *EGR1* foi um dos genes identificados que apresentou maior indução da expressão após a administração da HU. WANG e colaboradores em 2002, usando cultura de células progenitoras ($AC133^+$) de medula óssea humana, caracterizaram o perfil de expressão gênica em resposta a administração da HU pela técnica de *microarray*. O tratamento das células $AC133^+$ com doses baixas de HU levou a indução de 2 x da expressão do *EGR1*. O gene *EGR1*, também denominado de *TIS28, Krox-24* e *NGFI-A*, é um fator de transcrição da família das proteínas dedos-de-zinco (*zinc finger protein*) que se apresentou induzido em vários tipos celulares em resposta a diversos estímulos. O aumento na expressão do gene *EGR1* sugere que a HU, em doses

baixas, deva funcionar como um fator de crescimento que induza a expressão de *EGR1* e desta forma promova a maturação dos progenitores eritróides pelo aumento dos níveis de hemoglobina total (WANG *et al.*, 2002).

Outros genes distribuídos em categorias funcionais associadas a mecanismos transcricionais e vias de sinalização celular apresentaram indução em suas expressões, tais como genes *CENTB1, ARGHAP4 E RIN3* (tabela 11), todos os três membros da família das ligantes de GTP, envolvida no processo de sinalização celular e que participam em uma variedade de processos biológicos, dentre os quais se incluem mecanismos transcricionais. (FOLLETA, BROWN E YOUNG, 2002). O gene *ARGHAP4* foi descrito como fortemente expresso em células de origem hematopoéticas, incluindo células da linhagem K562. Estes dados sugerem que este gene possa ser uma proteína rhoGAP específica da linhagem hematopoética (TRIBIOLI, 1996)

As categorias que apresentaram maior repressão em suas expressões após o tratamento com HU foram: *atividade peroxidase* (*peroxidase activity*) (aproximadamente 26 x) e *atividade motora de microtubulo* (*microtubule motor activity*) (aproximadamente 30 x). Na categoria *atividade motora de microtubulo* foi encontrado o gene *KIF23*, que apresenta papel importante em mecanismos celulares tais como transporte de organelas e mitose (MIKI *et al.*, 2001).

Interessantemente, o gene da *interleucina 6* (*Interleukin 6 – IL-6*), associado às categorias *ligação de fatores de crescimento* e *ligação de citocinas* apresentadas como repressas quando analisadas em nível três da ontologia *funções moleculares* (tabela 11) apresentou uma grande repressão (21:0) em sua expressão após a administração da HU, estando classificada inclusive entre os transcritos exclusivos do perfil HbS. A *IL-6* é uma citocina com papel importante em uma variedade de processos biológicos, dentre eles no mecanismo de defesa do organismo. TAYLOR e colaboradores em 1995 descreveram níveis elevados de *IL-6* circulante em pacientes com AF quando comparados aos níveis dos controles (TAYLOR *et al.*, 1995; KASSCHAU *et al.*, 1996). A *IL-6* mostrou ser capaz de reduzir os níveis de HbF em progenitores eritróides fetais e também de inibir a expressão do gene da γ globina por meio da interação com a proteína STAT3β (FERRY *et al*, 1997; FOLEY *et al*, 2002).

De acordo com os dados gerados neste trabalho, concluímos que a HU produz alterações significativas no padrão de expressão gênica em células da medula óssea de pacientes com AF. JISON e colaboradores em 2004, por meio da análise por *microarray* avaliou o padrão de expressão de células mononucleares de um grupo de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. Interessantemente, o padrão de expressão gênica em pacientes AF tratados e não tratados se apresentou semelhante diferenciando-se apenas do padrão de expressão gênica apresentado pelos controles. Os dados descritos por JISON e colaboradores indicam que a HU não tenha um efeito direto sobre o padrão de expressão de leucócitos de pacientes com AF. Estes resultados diferem dos dados gerados por este trabalho, no qual foram encontradas alterações significativas no padrão de expressão gênica em células da medula óssea de pacientes com AF após o tratamento com HU. Este fato pode ser um reflexo direto da diferença na amostra utilizada para a análise da expressão gênica, e poderia indicar que a HU tenha efeito direto na população de progenitores eritróides mais primitiva, encontradas na medula óssea. Os dados da validação obtidos com as células K562 sugerem que grande parte dos genes identificados tenha sido originada de células precursoras eritropoéticas. Esta talvez seja a explicação porque alguns genes que foram testados em pacientes sob terapêutica com HU não mostraram regulação semelhante à observada nos dados de *SAGE*, pois o material obtido no caso dos pacientes analisados foi de leucócitos de sangue periférico.

Os dados gerados neste trabalho sugerem que a HU promova um recrutamento dos mecanismos transcricionais e vias associadas à sinalização celular. Estas vias parecem ter um efeito direto sob a indução da expressão do gene da γ globina a nível transcricional. Por outro lado, o estímulo da via associada à *atividade transportadora da classe de canais e poro* pode indicar uma redução na desidratação das células, alterando as propriedades reológicas das células e conseqüentemente levando a uma melhor evolução do quadro clínico dos pacientes com AF. Estudos futuros dos genes diferencialmente expressos associados com estas vias, a inativação ou super expressão de alguns destes genes poderia fornecer informação importante sobre o mecanismo de ação da HU. Adicionalmente, a descrição de novos genes pode representar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para os pacientes com AF e outras hemoglobinopatias.

6 - CONCLUSÕES

1) Este é o primeiro trabalho da análise do padrão de expressão gênica em células da medula óssea de pacientes com anemia falciforme tratados com hidrixuréia;

2) A hidroxiuréia produziu alterações significativas no padrão de expressão gênica nas células da medula óssea de pacientes com anemia falciforme;

3) A indução da expressão dos genes *HVDAC* e *FXYD5* após o tratamento com a hidroxiuréia, associados à categoria funcional da "atividade transportadora da classe da canais e poros", sugere que a hidroxiuréia possa induzir a alteração da concentração dos íons sódio (*Na*) e potássio (*K*), possivelmente levando a re-hidratação das células e alterando a densidade das células vermelhas, conseqüentemente diminuindo a polimerização e ocorrência de fenômenos vasoclusivos nos pacientes com anemia falciforme;

4) O tratamento com hidroxiuréia também induziu a expressão de grupos de genes associados a categorias relacionadas a mecanismos transcricionais, síntese de proteínas e vias de sinalização celular, tais como as categorias "atividade reguladora da enlongação da transcrição", "atividade de cofator de transcrição" e "atividade RNA polimerase II fator de transcrição", entre outras.

5) Os dados obtidos pelo *SAGE* e pela validação do gene *EGR1* confirmaram os dados previamente demonstrados por WANG e colaboradores em 2002, onde a hidroxiuréia foi capaz de induzir a expressão deste gene em células $AC133^{+}$ de medula óssea, sugerindo que a hidroxiuréia possa funcionar como um fator de crescimento que induza a expressão de *EGR1* e desta forma promova a maturação dos progenitores eritróides pelo aumento dos níveis de hemoglobina total (WANG *et al.*, 2002);

6) Os dados da validação dos genes diferencialmente expressos indicam que a hidroxiuréia atue diretamente na população de células progenitoras eritróides encontradas na medula óssea de pacientes com anemia falciforme.

Adicionalmente, os dados da validação dos genes diferencialmente expressos em linhagem de células K562 tratadas e não tratadas com hidroxiuréia evidencia que a expressão de grande parte destes genes esteja comprometida com a linhagem eritrocitária;

7) A análise do padrão de expressão de alguns genes diferencialmente expressos em leucócitos totais de um grupo de pacientes com anemia falciforme tratados e não tratados com hidroxiuréia revelou que apenas os genes *EGR1* e *HSPE1* se apresentavam induzidos, confirmando o dado gerado pelo *SAGE*. A diferença apresentada pelos outros genes pode ser um reflexo do tamanho da amostra ou ainda do tipo de célula analisado ser diferente daquele utilizado na construção dos perfis;

8) Este é o primeiro estudo sugerindo a participação das vias aqui descritas como induzidas ou repressas no mecanismo de ação da hidroxiuréia em células da medula óssea de pacientes com anemia falciforme, promovendo a melhora da evolução clínica dos pacientes com anemia falciforme.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRAGNA, N. C.; FONSECA P.; LAUF P. K. Hydroxyurea affects cell morphology, cation transport, and red blood cell adhesion in cultured vascular endothelial cells. **Blood,** 83: 553-60, 1994.

AUDIC, S.; CLAVERIE J. M. The significance of digital gene expression profiles. **Genome Res,** 7: 986-95, 1997.

BALLAS, S. K.; MARCOLINA, J. M.; DOVER, G. J.; BARTON, F. B. Erythropoietic activity in patients with sickle cell anaemia before and after treatment with hydroxyurea. **Br J Haematol,** 105: 491-6, 1999.

BARON, M. H. Transcriptional control of globin gene switching during vertebrate development. **Biochim Biophys Acta,** 1351: 51-72, 1997.

BLAU, C. A.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Hemoglobin switching and its clinical implications. **Curr Opin Hematol,** 1: 136-42, 1994.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med,** 337: 762-9, 1997.

BUNN, H. F.; FORGET, B. G.; RANNEY, H. M. Hemoglobinopathies. **Major Probl Intern Med,** 12: 1-291, 1977.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol,** 25: 169-93, 2000.

CHARACHE, S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. **Semin Hematol,** 34: 15-21, 1997.

CHIES, J. A.; NARDI N. B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **Med Hypotheses,** 57: 46-50, 2001.

COKIC, V. P.; SMITH R. D.; BELESLIN-COKIC, B. B.; NJOROJE, J. M.; MILLER, J. L.;

GLADWIN, M. T. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest,** 111: 231-9, 2003.

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: 547-54, 2004.

DE FRANCESCHI, L.; BARON, A.; SCARPA, A.; ADRIE, C.; JANIN, A.; BARBI, S. et al. Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. **Blood,** 102: 1087-96, 2003.

DE FRANCESCHI, L.; CORROCHE, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica,** 89: 348-56, 2004.

EMBURY, S.H. The clinical pathophysiology of sickle cell disease. **Annu Rev Med,** 37: 361-76, 1986.

EMBURY, S.H. New treatments of sickle cell disease. **West J Med,** 164: 444, 1986.

FOLLETA, V. C.; BROWN, F. D.; YOUN, W. C. Cloning of rat ARGHAP4/ C1., RhoGAP family member expressed in the nervous system that colocalizeswith the Golgi complex and microtubules. **Mol Brain Research,** 107: 65-79, 2002.

FIGUEIREDO, M. S.; SILVA, M. C; GUERREIRO, J. F.; SOUZA, G. P.; PIRES, A. C.; ZAGO, M. A. The heterogeneity of the beta s cluster haplotypes in Brazil. **Gene Geogr,** 1: 7-12, 1994.

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.

GLOVER, R. E.; IVY, D. E.; ORRINGER, G. P.; MAEDA, H.; MASON, R. P.; Detection of nitrosyl hemoglobin in venous blood in the treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea. **Mol Pharmacol,** 55: 1006-10, 1999.

GONCALVES, M. S.; NECHTMAN, J. F.; FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V. R.; SONATTI, M. F.; SAAD, S. T. O. et al. Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. **Hum Hered,** 44: 322-7, 1994.

GUBIN, A. N.; NJOROGE, J. M.; BOUFFARD, G. G.; MILLER, J. L. Gene expression in proliferating human erythroid cells. **Genomics,** 59: 168-77, 1999.

FERRY, A. E.; BALIGA, S. B.; MONTEIRO, C.; PACE, B. S. Globin gene silence in primary erythroid cultures. An inhibitory role for interleukin-6. **J Biol Chem,** 272: 20030-7, 1997.

FOLEY, H. A.; OFORI-ACQUAH, S. F.;YOSHIMURA, S.; CRITZ, S.; BALIGA, S. B.;

PACE, B. S. Stat3 beta inhibits gamma-globin gene expression in erythroid cells. **J Biol Chem,** 277: 16211-9, 2002.

HALSEY, C.; ROBERTS, I. A. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br J Haematol,** 120: 177-86, 2003.

HASHIMOTO, S.; NAGAI, S.; SESE, J.; SUZUKI, T.; OBATA, A.; SATO, T. et al. Gene expression profile in human leukocytes. **Blood,** 101: 3509-13, 2003.

HAYNES, J. JR.; BALIGA, B. S.; OBIAKO, B.; OFORI-ACQUAH, S.; PACE, B. Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. **Blood**, 103: 3945-50, 2004.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON. R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N Y)**, 11: 1026-30, 1993.

HO, J. A.; PICKENS, C. V.; GAMCSIK, M. P.; COLVIN, O. M.; WARE, R. E.; GAMCSIK, M. P. In vitro induction of fetal hemoglobin in human erythroid progenitor cells. **Exp Hematol**, 31: 586-91, 2003.

IKUTA, T.; AUSENDA, S.; CAPPELLINI, M. D. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98: 1847-52, 2001.

JIANG, J.; JORDAN, S. J.; BARR, D. P.; GUNTHER, M. R.; MAEDA, H.; MASON, R. P. In vivo production of nitric oxide in rats after administration of hydroxyurea. **Mol Pharmacol**, 52: 1081-6, 1997.

JISON, M. L.; MUNSON, P. J.; BARB, J. J.; SUFFREDINI, A. F.; TALWAR, S.; LOGUN, C. et al. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. **Blood**, 104: 270-80, 2004.

KASSCHAU, M. R.; BARABINO, G. A.; BRIDGES, K. R.; GOLNA, D. E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood,** 87: 771-80, 1996.

KAUFMAN, R. E. Hydroxyurea: specific therapy for sickle cell anemia? **Blood**, 79: 2503-6, 1992.

KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B.; SHIELDS, H.; KOBILASCH, C. P.; GRAVATT, W. L.; BALLAS, S. K. The reaction of deoxy-sickle cell hemoglobin with hydroxyurea. **Biochim Biophys Acta**, 1428: 381-7, 1999.

KINNEY, T. R.; HELMS, R. W.; O'BRASNKY, E. E.; OHENE-FREMPONG, K.; WANG, W.; DAESCHNER, C. et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. Pediatric Hydroxyurea Group. **Blood**, 94: 1550-4, 1999.

KING, S. B. The nitric oxide producing reactions of hydroxyurea. **Curr Med Chem**, 10: 437-52, 2003a.

KING, S. B. A role for nitric oxide in hydroxyurea-mediated fetal hemoglobin induction. **J Clin Invest**, 111: 171-2, 2003b.

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

LAL, A.; LASH, A. E.; ALTSCHUL, S. F.; VELCULESCU, V.; ZANG, L.; MACLENDON, R. E. et al. A public database for gene expression in human cancers. **Cancer Res**, 59: 5403-7, 1999.

LI, C.; GROSDIDIER, A.; CRAMBERT, G.; HORISBERGER, J. D.; MICHIELIN, O.; GEERING, K. Structural and functional interaction sites between Na,K-ATPase and FXYD proteins. **J Biol Chem**, 279: 38895-902, 2004.

LAPOUMEROULIE, C.; DUNDA, O.; DUCROCQ, R.; TRABUCHET, G.; MONY-LOBE, M.; BODO, J. M. et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Hum Genet,** 89: 333-7, 1992.

LOPEZ, B. L.; DAVIS-MOON, L.; BALLAS, S. K.; MA, X. L. Sequential nitric oxide measurements during the emergency department treatment of acute vasoocclusive sickle cell crisis. **Am J Hematol**, 64: 15-9, 2000.

MARGULIES, E. H.; INNIS J. W. eSAGE: managing and analysing data generated with serial analysis of gene expression (SAGE). **Bioinformatics**, 16: 650-1, 2000.

MEIJERINK, J.; MANDIGERS, C.; VAN DE LOCHT, L.; TONNISSEN, 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 Diagn**, 3: 55-61, 2001.

MESSINA, A.; OLIVA, M.; ROSATO, C.; HUIZING, M.; RUITENBEEK, W.; VAN DEN HEUVEL, L. P. et al. Mapping of The Human Voltage-dependent anion channel isoforms1 and 2 reconsidered. Biochem **Biophys Res Commun,** 255:707-10, 1999.

MIKI, H.; SETOU, M.; KANSESHIRO, K.; HIROKAWA, N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. **Proc Natl Acad Sci U S A,** 98: 7004-11, 2001.

NAGAI, T.; TARUMOTO, T.; MIYOSHI, T.; OHMINE, K.; MUROI, K.; KOMATSU, N. et al. Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation. **Br J Haematol,** 121: 657-61, 2003.

NAGEL, R.L.; FABRY, M.E.; PAGNIER, J.; ZOHOUN, I.; WAJCMAN, H.; BAUDIN, V. et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. **N Engl J Med**, 312: 880-4, 1985.

NAHAVANDI, M.; TAVAKKOLI, F.; WYCHE, M. Q.; MILLIS, R. M. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Br J Haematol**, 119: 855-7, 2002.

NAHAVANDI, M.; WYCHE, M. Q; PERLIN, E.; TAVAKKOLI, F.; CASTRO, O. Nitric Oxide Metabolites in Sickle Cell Anemia Patients after Oral Administration of Hydroxyurea; Hemoglobinopathy. **Hematol**, 5: 335-339, 2000.

OKPALA, I.; DANIEL, Y.; 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.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res,** 29: e45, 2001.

PAGNIER, J.; MEARS, J. G.; DUNDA-BELKHODJA, O.; SCHAEFER-REGO, K. E.; BELDJORD, C.; NAGEL, R. L. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 81: 1771-3, 1984.

PAPAYANNOPOULOU, T.; STAMATOYANNOPOULOS G. Cellular regulation of fetal hemoglobin production. **Ann N Y Acad Sci**, 344: 206-18, 1980.

PARK, J. I.; CHOI, H. S.; JEONG, J. S.; HAN, J. Y.; KIN, I. H. Involvement of p38 kinase in hydroxyurea-induced differentiation of K562 cells. **Cell Growth Differ,** 12: 481-6, 2001.

PAULING, I.; ITANO, H. A.; SINGER, S. I.; WELLS, I. C. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science,** 110:543-548,1949.

PISSARD, S.; BEUZARD Y. A potential regulatory region for the expression of fetal hemoglobin in sickle cell disease. **Blood**, 84: 331-8, 1994.

POPE, S. H.; FIBACH, E.; SUN, J.; CHIN, K.; RODGERS, G. P. Two-phase liquid culture system models normal human adult erythropoiesis at the molecular level. **Eur J Haematol**, 64: 292-303, 2000.

REITER, C. D.; GLADWIN M. T. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. **Curr Opin Hematol**, 10: 99-107, 2003.

RODGERS, G. P. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. **Semin Hematol**, 34: 2-7, 1997.

RODGERS, G. P. Pharmacological therapy. **Baillieres Clin Haematol**, 11: 239-55, 1998.

SCHECHTER, A. N.; RODGERS G. P. Sickle cell anemia therapy: progress since Pauling. **Science,** 287: 592-3, 2000.

SOLOVEY, A. A.; SOLOVEY, A. N.; HARKNESS, J.; HEBBEL, R. P. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. **Blood,** 97: 1937-41, 2001.

STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. L. Disorders of Hemoglobin. Cambridge University Press, 2001.

STEINBERG, M. H.; LU, Z. H.; BARTON, F. B.; TERRIN, M. L. CHARACHE, S.; DOVER, G. J. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. **Blood,** 89: 1078-88, 1997.

STEINBERG, M. H.; BARTON, F.; CASTRO, O.; PEGELOW, C. H.; BALLAS, S. K.; KUTLAR, A. et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **Jama,** 13: 1645-51, 2003.

TAYLOR, S. C.; SHACKS, S. J.; MITCHELL, R. A.; BANKS, A. Serum interleukin-6 levels in the steady state of sickle cell disease. **J Interferon Cytokine Res**, 15: 1061-4, 1995.

TRIBIOLI, C.; DROETTO, S.; BIONE, S.; CESARENI, G.; TORRISI, M. R.; LOTTI, L. V. et al. An X chromosome-linked gene encoding a protein with characteristics of a RhoGAP predominantly expressed in hematopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A,** 93: 695-699, 1996.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, 270: 484-7, 1995.

WANG, M.; TANG, D. C.; LIU, W.; CHIN, K.; ZHU, J. G.; FIBACH, E. et al. Hydroxyurea exerts bi-modal dose-dependent effects on erythropoiesis in human cultured erythroid cells via distinct pathways. **Br J Haematol**, 119: 1098-105, 2002.

WARE, R. E.; EGGLESTON, B.; REDDING-LALLINGER, R.; WANG, W. C., SMITH-WHITLEY, K.; DAESCHNER, C. et al. Predictors of fetal hemoglobin response in children with sickle cell anemia receiving hydroxyurea therapy. **Blood,** 99: 10-4, 2002.

YANG, Y. M.; PACE, B.; KITCHENS, D.; BALLAS, S. K.; SHAH, A.; BALIGA, B. S. BFU-E colony growth in response to hydroxyurea: correlation between in vitro and in vivo fetal hemoglobin induction. **Am J Hematol**, 56: 252-8, 1997.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F.; ISMAEL, S. J.; BOTTURA, C. Sickle-cell disease in a Brazilian population. **Sangre,** 28: 191-8, 1983.

8 - ANEXOS

UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PEQUISA

HEMOCAMP

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: "ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR *SERIAL ANALISYS OF GENE EXPRESSION (SAGE)* EM UM PACIENTE HOMOZIGOTO PARA ANEMIA FALCIFORME ANTES E APÓS A HIDROXIUREIA".

OBJETIVOS DO TRABALHO:

Determinar o perfil de expressão gênica por "*Serial Analisys Of Gene Expression*" *(SAGE)* em amostra de medula óssea de um paciente homozigoto para Anemia Falciforme antes e após a administração inicial da Hidroxiuréia, bem como mecanismos moleculares envolvidos.

JUSTIFICATIVA

Os estudos de expressão gênica envolvendo alterações genéticas das globinas podem fornecer importantes informações a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na expressão dos genes da globina durante o desenvolvimento ontogenético. Agentes farmacológicos como a hidroxiuréia, que amenizam os sintomas da doença vem sendo amplamente utilizadas com sucesso no tratamento, porém, os mecanismos de atuação deste fármaco e mecanismos moleculares envolvidos na melhor evolução do quadro clínico ainda permanecem obscuros. A determinação do perfil de expressão gênica em pacientes com anemia falciforme e dos mecanismos moleculares envolvidos na melhora clínica mediante o uso da hidroxiuréia pode representar uma eficiente e importante ferramenta terapêutica a ser utilizada nas hemoglobinopatias.

UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PEQUISA

HEMOCAMP

Nome do paciente:_____

Idade:_____ anos

HC:_____ **RG:**_____

Responsável Legal (em caso de paciente menor de idade):

_____

Grau de parentesco:_____

Endereço: _____

_____ **Fone:**_____

Estou ciente e concordo em participar deste estudo, onde será necessária a coleta de 10 a 20 ml de medula óssea (punção aspirativa) retirado da crista ilíaca ("bacia"), ou ainda, 10 a 20 ml de sangue periférico. A desvantagem e desconforto deste procedimento é anestesia local e dor e/ ou possível aparecimento de mancha roxa no local de coleta. Estou ciente ainda, de que meus dados serão mantidos em absoluto sigilo pelo pesquisador responsável. No caso de dúvida sobre este procedimento ou participação neste estudo, poderei procurar o pesquisador responsável, a aluna de doutorado *Flávia Chagas Costa (fone 3788-8611)* ou o médico responsável pelo estudo, o *Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (fone 3788-8734)*, no Hemocentro – UNICAMP. Poderei também procurar o *Comitê de Ética em Pesquisa (3788-8936)* da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP em caso de dúvida ou reclamação quanto a qualquer procedimento relacionado com este estudo.

UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PEQUISA

HEMOCAMP

Confirmo que li ou me foi explicado o termo de consentimento e estou de pleno acordo em participar deste estudo.

Data: Campinas, _____ de _____ de 200___

_____

Assinatura do paciente ou responsável

_____

Assinatura do Pesquisador Responsável

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-7187
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
cep@fcm.unicamp.br

PARECER: N° 071/98

PESQUISA: GENÉTICA MOLECULAR DAS ALTERAÇÕES HEREDITÁRIAS DA HEMOGLOBINA E ESTUDO FUNCIONAL DOS GENES DA GLOBINA GAMA

PESQUISADOR: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores, aprova a pesquisa supracitada bem como o Termo de Consentimento Pós-Informação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e complemetares.

CEP/FCM, 01/12/2004.

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