

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LUCIANA MARIA DE HOLLANDA

**“FUNÇÕES DO GENE *GATA1*: CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO
DE MUTAÇÕES EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Campinas, 2006.

FICHA CATALOGRÁFICA

Hollanda, Luciana Maria

FUNÇÕES DO GENE GATA1: CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO DE MUTAÇÕES EM DOENÇAS HEMATOLOÓGICAS / Luciana Maria de Hollanda. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador: Fernando Ferreira Costa

Dissertação (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. *GATA1*. 2. Mutação Hereditária. 3. Fatores de Transcrição. 4. Síndrome mielodisplásica. I. Fernando Ferreira Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título

Campinas, 30 de agosto de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr.Fernando Ferreira Costa (Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

Prof. Dr. Roberto Passeto Falcão

Assinatura

Prof. Dr. José Orlando Bordim

Assinatura

Profa. Dra. Iscia Terezinha Lopes Cendes

Assinatura

Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto

Assinatura

*Aos meus pais Frederico e Iláudia,
À Tia-Olga (In memorian)
Dedico!*

Agradecimentos

A minha família pela paciência, carinho, amor e dedicação.

A Dra. Carmen Silvia Passos Lima por todo o meu crescimento profissional.

A família Cincoetti por toda a amizade e carinho, principalmente a minha grande amiga Daniella por toda a paciência.

As madrinhas Vera e Lúcia por todas as rezas e torcida.

Aos amigos da radiologia da Beneficência Portuguesa, principalmente ao Dr. Hélio Pupo, por toda a torcida e ajuda nos momentos em que mais precisei.

A Manoela Marques Ortega, Gustavo Jacob Lourenço, Hélvia Nascimento, Priscila, Sandro, Iramaia e Camila Oresco por todo o apoio, amizade, carinho, amor e compreensão.

Aos amigos Anderson, Dulcinéia, Paulo P. Joazeiro, José Vassallo, Margareth Castro Ozelo, Sheley Gambero, Carol Lanaro, Tânia, Sueli, Fernanda, Cristiano, Julio, Eduardo, Juvani que me ajudaram no trabalho e na publicação do artigo.

Aos amigos Lena, Simone, Ucha, Vagner, Adriana, Tereza, Marcelo Brandão, Fabíola, Camila Almeida, Babi, Maristela, Rose, por toda a ajuda profissional e amizade.

As amigas Rachel, Patrícia e Elisete, por sempre me atenderem prontamente nos momentos em que mais precisei.

A todos os funcionários, alunos e professores do Hemocentro, da UNICAMP, que me proporcionaram o conhecimento e o encontro de muitos e eternos amigos.

A CAPES que me proporcionou a ajuda financeira necessária para realizar este trabalho.

“Só sei que nada sei”.

(Sócrates de Atenas, 399 A. C).

Índice Geral

Agradecimentos	v
Índice Geral	7
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	10
<i>Resumo</i>	11
<i>Abstract</i>	13
<i>Introdução</i>	15
Síndrome mielodisplásica (SMD)	16
Classificação FAB	17
Alterações citogenéticas e moleculares	18
Família de fatores de transcrição GATA	19
Fator de transcrição GATA-1	19
Mecanismo de <i>splicing</i> alternativo origina a proteína GATA-1s	22
GATA-1 e a hemopoese	23
Mutações no gene <i>GATA1</i>	25
<i>Objetivos</i>	30
<i>Materiais e Métodos</i>	32
1. Casuística	33
2. Aspectos Éticos	34
3. Análise Molecular	45
3.1. Extração do DNA genômico total do sangue e medula óssea	45
3.2. Extração do RNA total	45
3.3. Transcrição do mRNA em cDNA	46
3.4. Desenho dos oligonucleotídeos	47
3.5. Reações em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos éxons pertencentes ao gene <i>GATA1</i> e do mRNA para GATA-1 e GATA-1s	49
3.6. Purificação do fragmento de DNA e dos fragmentos do mRNA correspondentes ao GATA-1 e GATA-1s	50
3.7. Reações de seqüenciamento	51
3.8. Quantificação da expressão dos genes <i>GATA1</i> e <i>GATA1s</i>	52

3.8.1. Eficiência da reação qRT-PCR.....	52
3.8.2. qRT-PCR	53
3.8.3. Quantificação e normalização das amostras pelo método <i>geNorm</i> version 3.4	54
4. Imunohistoquímica	55
4.1. Titulação dos anticorpos GATA-1 C-20 e N-6	55
4.2. Reação de Imunohistoquímica.....	55
4.2.1. Preparo das lâminas.....	55
4.2.2. Reação de Rotina de Imunoperoxidase.	56
5. Análise da unidade formadora de colônia granulocítica-monocítica (CFU-GM)	59
6. Crescimento e diferenciação de progenitores eritróides do sangue periférico (BFU-E) em eritropoetina.....	60
7. Análise dos fatores de coagulação plasmática.....	61
8. Análise das glicoproteínas de membrana plaquetária.....	62
9. Análise da ultraestrutura plaquetária	63
<i>Resultados</i>	65
1. Avaliação molecular do gene <i>GATA1</i>	66
2. Reação em cadeia polimerase (RT-PCR) para a detecção do mRNA GATA-1 e GATA-1s.....	71
3. Quantificação da expressão dos genes <i>GATA1</i> e <i>GATA1s</i>	73
4. Resultado de imunohistoquímica para os pacientes familiares analisados.....	77
5. Análise das unidades formadoras de colônia CFU-GM.	80
6. Análise das unidades formadoras de colônia BFU-E.	80
7. Resultado dos testes de coagulação e função plaquetária.....	82
8. Resultado da microscopia eletrônica de plaquetas	85
<i>Discussão</i>	90
<i>Conclusões</i>	96
<i>Referências Bibliográficas</i>	98
<i>Apêndices</i>	109

Índice de Figuras

Figura 1. Configuração espacial dos domínios dedos de zinco C e N terminal..	21
Figura 2. Fator de transcrição GATA-1 e a hemopoese.	24
Figura 3. Modelo proposto das células alvo e vias que conduzem a SD-AMKL.	29
Figura 4. Heredograma dos membros da família analisada.	38
Figura 5. Morfologia do sangue periférico e da medula óssea do paciente III-16	39
Figura 6. Morfologia da medula óssea do paciente III-16.	40
Figura 7. Gel de agarose 1,5% para a análise da amplificação do éxon 2 (365pb) do gene GATA1 em pacientes com SMD adquirida, em pacientes da família analisada e nos controles	67
Figura 8. Eletroferogramas do seqüenciamento do éxon 2 do gene GATA1	68
Figura 9. Eletroferogramas do seqüenciamento do éxon 2 do gene GATA1	69
Figura 10. Heredograma da família analisada após a genotipagem.	70
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% com formaldeído para avaliar a qualidade do RNA total	71
Figura 12. Formação do mRNA do GATA-1 e do GATA-1s	72
Figura 13. Gráficos das análises da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos utilizados no método da reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qRT-PCR).	74
Figura 14. Gráficos das curvas de dissociação utilizada para analisar a ausência de contaminantes ou geração de produtos inespecíficos	75
Figura 15. Gráfico com a comparação da expressão dos genes GATA1 e GATA1s por qRT-PCR	76
Figura 16. Estudo de imunohistoquímica para o controle (Aumento 640x)	78
Figura 17. Estudo de imunohistoquímica para o paciente III-16 (Aumento 640x).	79
Figura 18. Células BFU-E de uma colônia com 3U de eritropoetina (Aumento 256x)	81
Figura 19. Microscopia eletrônica do controle II-14 (Aumento de 6000x).	86
Figura 20. Microscopia eletrônica do paciente III-16 (Aumento de 6000x).	87
Figura 21. Microscopia eletrônica do controle II-14 (Aumento de 12930x).	88
Figura 22. Microscopia eletrônica do paciente III-16 (Aumento de 12930x).	89

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação da SMD segundo os critérios do grupo FAB	17
Tabela 2. Classificação FAB das SMD para os 20 pacientes avaliados.....	35
Tabela 3. Dados hematológicos dos pacientes com Síndrome mielodisplásica adquirida	36
Tabela 4. Dados hematológicos dos pacientes com Síndrome mielodisplásica adquirida.....	37
Tabela 5. Dados hematológicos dos homens doentes pertencentes à família analisada.....	41
Tabela 6. Dados hematológicos das mulheres pertencentes à família analisada.....	42
Tabela 7. Dados hematológicos dos homens normais, pertencentes à família analisada.	43
Tabela 8. Características morfológicas da medula óssea e sangue periférico dos homens doentes	44
Tabela 9. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar 5 dos 6 éxons do gene GATA1.....	48
Tabela 10. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do mRNA para GATA-1	48
Tabela 11. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do mRNA para GATA-1s.....	49
Tabela 12. Oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real	49
Tabela 13. Concentrações, eficiências e temperaturas de dissociação dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes GATA1 e GATA1s por qRT-PCR.....	74
Tabela 14. Número de colônias BFU-E em diferentes concentrações de eritropoetina.	81
Tabela 15. Teste de coagulação e quantificação dos fatores da coagulação	83
Tabela 16. Estudo da função plaquetária em indivíduos da família analisada	84

Resumo

Várias mutações hereditárias no gene *GATA1* localizadas no éxon 4 e conseqüentemente que afetam o domínio dedo de zinco N-terminal foram descritas em algumas famílias que apresentavam graus variáveis de plaquetopenia com ou sem anemia. Por outro lado, mutações adquiridas no éxon 2 deste gene foram observadas em quase todos os casos estudados de pacientes com Síndrome de Down e que apresentavam TMD ou AMKL. Essas mutações impedem a síntese da proteína total, mas permite a síntese da isoforma menor da proteína, denominada GATA-1s. Experimentos em camundongo sugeriram que a síntese única da isoforma GATA-1s seria suficiente para induzir hemopoese normal nesses animais. Neste trabalho descrevemos em pacientes e portadores de uma família a mutação 332G → C localizada no éxon 2 do gene *GATA 1* que conduz a produção apenas da proteína GATA-1s nos homens afetados. Os perfis hematológicos desses pacientes demonstraram anemia macrocítica, neutropenia em vários casos e número normal de plaquetas. Em seu conjunto, esses dados sugerem que a proteína GATA -1s, produzida em níveis normais ou baixos não é suficiente para conduzir à eritropoese normal. Além disso, este é o primeiro estudo onde uma mutação hereditária no éxon 2 do gene *GATA1* origina apenas a proteína GATA-1s e não provoca AMKL ou TMD em indivíduos não portadores de síndrome de Down. Desta forma este estudo indica que outros eventos cooperativos, como outras mutações ou a trissomia do cromossomo 21 provavelmente podem ser os responsáveis por essas anomalias em crianças com síndrome de Down.

Abstract

Inherited mutations in exon 4 of the GATA1 gene, which codes for the N-terminal zinc finger domain of GATA-1, have been found in some families, leading to a familial dyserythropoietic anemia with thrombocytopenia, X-linked thrombocytopenia and X-linked thalassemia with thrombocytopenia. Acquired somatic mutations in exon 2 of the hematopoietic transcription factor GATA-1 have been found in individuals with Down syndrome with both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia . These mutations prevent the synthesis of the full-length protein but allow the synthesis of its short isoform, GATA-1s. Experiments in mice suggest that GATA-1s supports normal adult megakaryopoiesis, platelet formation and erythropoiesis. Here we report a mutation, 332G-C, in exon 2 of GATA1, leading to the synthesis of only the short isoform in seven affected males from two generations of a family. Hematological profiles of affected males demonstrate macrocytic anemia, normal platelet counts and neutropenia in most cases. Altogether, data suggest that GATA-1s alone, produced in low or normal levels, is not sufficient to support normal erythropoiesis. Moreover, this is the first study to indicate that a germline splicing mutation does not lead to leukemia in the absence of other cooperating events, such as Down syndrome.

Introdução

Síndrome mielodisplásica (SMD)

A síndrome mielodisplásica (SMD) compreende um grupo de distúrbios hematológicos, caracterizado por citopenias, hemopoese defeituosa e medula óssea geralmente hiper celular. As principais características são: a displasia de pelo menos uma linhagem celular; mielóide, eritróide ou plaquetária e a evolução de 30 a 40% dos casos para leucemia mielóide aguda (LMA) (Heaney e Golde, 1999). Anemia, neutropenia e/ou trombocitopenia com monocitose eventual são achados usuais do sangue periférico. Aproximadamente 35% dos pacientes com SMD apresentam apenas anemia, 30% bicitopenia e 19 % pancitopenia (Mckenzie, 2004).

A medula óssea pode ser normo ou hiper celular sendo raramente hipocelular. Além das alterações quantitativas, anormalidades morfológicas são tipicamente observadas: micromegaciócitos, blastos mielóides em localização atípica (ALIP), nódulos linfóides de aspecto benigno, sideroblastos em anel e granulocíticos com anomalia de pseudo Pelger-Hüet (Lorand-Metze, 2005).

A SMD pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade, sendo rara em crianças, pouco comum em adultos e mais freqüente em indivíduos com mais de 50 anos. Manifesta-se em pessoas previamente expostas a agentes químicos, como benzeno e o álcool, e em pessoas com distúrbios nutricionais ou que foram submetidos à quimioterapia e radioterapia no passado (Campbell, 2001). Clinicamente os pacientes apresentam anemia, sangramento cutâneo-mucoso ou infecções bacterianas (Lorand-Metze, 2005).

Classificação FAB

Em 1982 foi proposta a primeira classificação para a doença, a classificação FAB por pesquisadores franceses, americanos e ingleses (Bennett, Catovsky *et al.*, 1982). Cinco subtipos da doença foram identificados, considerando a porcentagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea, a porcentagem de sideroblastos em anel e o número de monócitos no sangue periférico (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da SMD segundo os critérios do grupo FAB

Tipo	Sangue Periférico	Medula Óssea
Anemia Refratária (AR)	Citopenias < 1% blastos	Blastos < 5% Celularidade variável Atipias diversas
Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)	Anemia Blastos < 1%	Blastos < 5% Sideroblastos em anel > 15%
Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB)	Blastos < 5% Pancitopenia	Blastos 5-20% Hipercelular com atipias nas 3 séries.
Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação (AREBT)	Blastos > 5% Pancitopenia	Blastos 21-30% Bastonetes de Auer.
Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC)	Blastos < 5% Monócitos > 1000/ μ l	Blastos < 20%

Alterações citogenéticas e moleculares

Anormalidades cariotípicas são observadas em aproximadamente 40-50% dos casos de SMD primária e em 90% dos casos de SMD secundária (Heaney e Golde, 1999; Olney e Le Beau, 2001). As anormalidades cromossômicas mais encontradas nesta doença são as deleções dos cromossomos 5, 7, 11, 12 e 20 e a trissomia do cromossomo 8. Deleções cromossômicas relacionadas à SMD implicam, em geral, na perda de genes supressores tumorais ou genes de reparo do DNA. Geralmente essas alterações requerem dois acontecimentos: mutação de um gene alvo e a perda do segundo alelo por deleção, duplicação ou recombinação (Hofmann e Koeffler, 2005). Vários estudos com SMD demonstraram que as anormalidades clonais da célula-tronco hemopoética caracterizaram-se pela maturação defeituosa e, nos estágios avançados, pela proliferação descontrolada (Parker e Mufti, 1996). Após o dano inicial da célula progenitora por alguma toxina ou mutação espontânea, diversas alterações adicionais podem afetar esta célula proporcionando uma vantagem de crescimento. Estas alterações podem influenciar a expressão de genes relacionados à regulação do ciclo celular, aos fatores de transcrição e a supressores tumorais (Hofmann e Koeffler, 2005).

Estudos recentes sugerem que a análise através da técnica de “microarray” pode fornecer dados suficientes para descobrir genes ou padrões gênicos associados com alterações de vias celulares específicas ou cascatas de sinalização na SMD (Miyazato, Ueno *et al.*, 2001; Hofmann, De Vos *et al.*, 2002; Ueda, Ota *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos com fatores de transcrição mostram uma diminuição da expressão dos genes *GATA1* e *GATA2* nesta doença (Fadilah, Cheong *et al.*, 2002).

Família de fatores de transcrição GATA

A família de fatores de transcrição GATA é formada por seis genes, *GATA1* a *GATA6*, que possuem numerosas características em comum. A conservação evolutiva destes genes pode ser observada de duas maneiras. Primeiro, os seis genes foram identificados em aves, fungos, leveduras, moscas e vermes com homólogos em anfíbios e mamíferos. Segundo, todas as proteínas derivadas destes genes ligam-se a uma sequência consenso no DNA (A/T)GATA(A/G) através de um domínio dedo de zinco altamente conservado (Evans e Felsenfeld, 1989; Elefanty, Antoniou *et al.*, 1996).

Como consequência da análise do perfil de expressão gênica em diversos tipos celulares, as proteínas pertencentes a esta família foram agrupadas em duas classes: a classe hemopoética e a classe não-hemopoética (Elefanty, Antoniou *et al.*, 1996).

Os três primeiros genes (*GATA1* a *GATA3*) pertencentes à classe hemopoética contribuem para a proliferação e/ou diferenciação de determinados tipos celulares sanguíneos. A classe não hemopoética formada pelos genes *GATA4* a *GATA6*, estão expressos em vários tecidos, entre eles, o coração, o intestino, o ovário, o fígado, o pulmão e o baço (Orkin, 1992; Visvader, Crossley *et al.*, 1995; Elefanty, Antoniou *et al.*, 1996; Lowry e Atchley, 2000; Lavoie, 2003; Lowry e Mackay, 2006).

Dentre todos os fatores de transcrição pertencentes a esta família, o mais estudado é o GATA-1 (Evans, Reitman *et al.*, 1988; Wall, Deboer *et al.*, 1988; Martin, Zon *et al.*, 1990).

Fator de transcrição GATA-1

A proteína GATA-1 é um fator de transcrição altamente relacionado com a diferenciação celular do sistema hemopoético, sendo codificada a partir do gene *GATA1* localizado na região Xp11.23 do cromossomo X humano. Esta região é formada por dois primeiros éxons alternativos

não codificantes localizados na região 5', e cinco éxons codificantes (II a VI) que dão origem à proteína GATA-1 (Caiulo, Nicolis *et al.*, 1991; Chapman, Stephenson *et al.*, 1991; Lowry e Mackay, 2006).

A proteína GATA-1 é formada por três domínios funcionais distintos, o domínio de transativação N-terminal (codificado pelo éxon 2) e dois domínios dedos de zinco. O domínio dedo de zinco N-terminal (Figura 1a) é codificado pelo éxon 4 e o domínio dedo de zinco C-terminal (Figura 1b) é codificado pelo éxon 5 e parte do éxon 6 do gene *GATA1*. Estes domínios receberam estes nomes devido à proximidade com as regiões amino e carboxila terminais (Newton, Mackay *et al.*, 2001; Lavoie, 2003). A região dedo de zinco C-terminal possui seqüências susceptíveis à acetilação estimulando a atividade transcricional desta proteína e também possui a função de ligar-se numa seqüência consenso WGATAR (W=A/T e R=A/G) altamente conservada no DNA (Secco, Cotella *et al.*, 2003; Ferreira, Ohneda *et al.*, 2005). Em contrapartida, a região dedo de zinco N-terminal influencia a estabilidade e a especificidade da ligação do dedo de zinco C-terminal com o DNA e atua interagindo com outras proteínas transcricionais como Sp1, EKLF, FOG-1 e outros fatores GATA. Predições estruturais guiadas por estudos de ressonância magnética nuclear sugeriram que o dedo de zinco N-terminal pode participar simultaneamente na interação com o DNA e com o FOG-1 (Figura 1c) (Kowalski, Czolij *et al.*, 1999). Dados na literatura indicam que a função do domínio de transativação N-terminal é controversa, pois parece ser essencial (Shimizu, Takahashi *et al.*, 2001) ou dispensável na diferenciação eritrocitária e megacariocítica (Blobel, Simon *et al.*, 1995; Visvader, Crossley *et al.*, 1995; Weiss, Yu *et al.*, 1997).

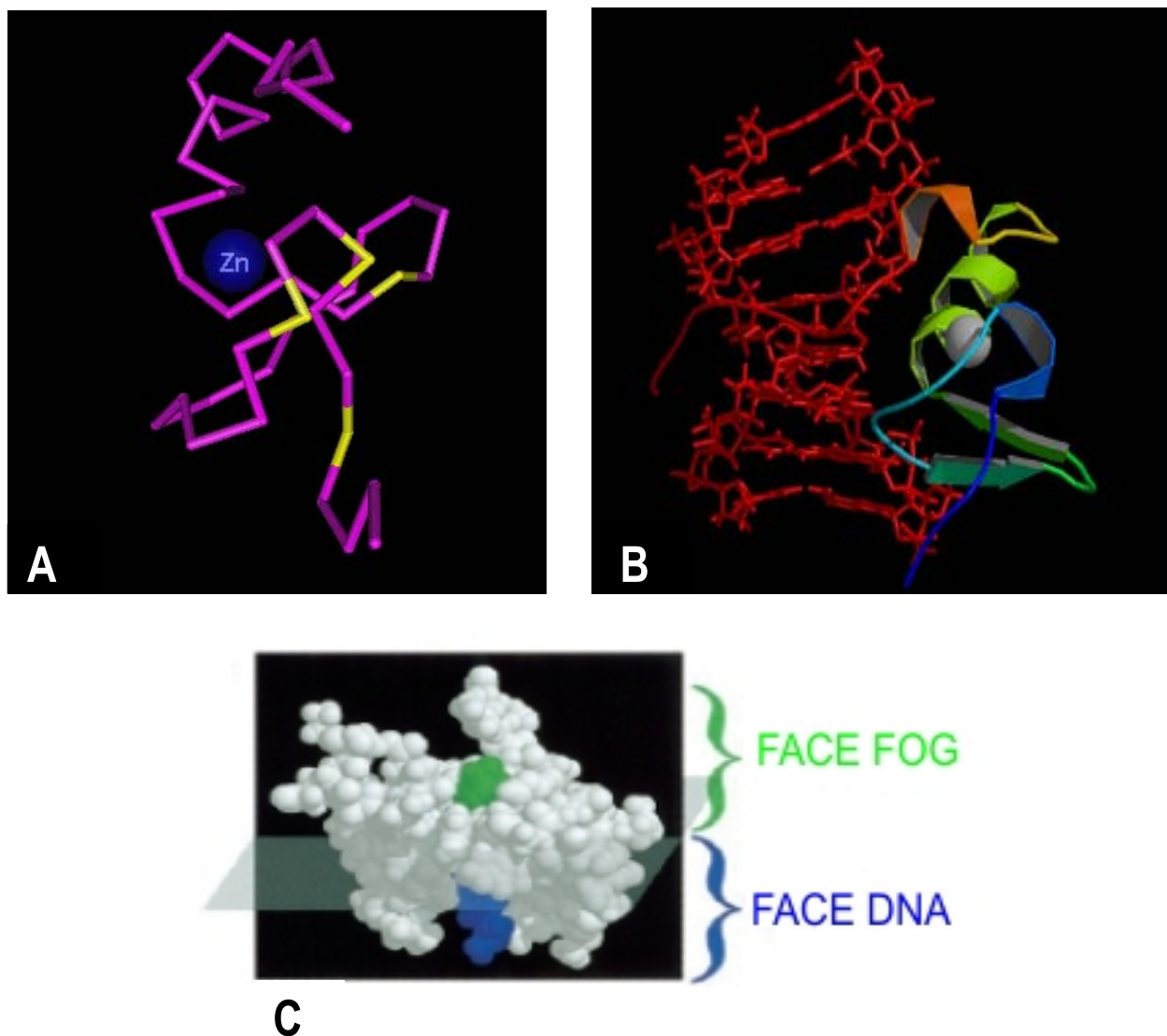


Figura 1. Configuração espacial dos domínios dedos de zinco C e N terminal. (A) Estrutura espacial do domínio dedo de zinco N-terminal. Em amarelo, os locais de ligação com o FOG-1. (B) Estrutura dedo de zinco C-terminal. Em vermelho a molécula de DNA. (C) Estrutura dedo de zinco N-terminal mostrando as faces de interação com o FOG-1 e com o DNA.

Mecanismo de *splicing* alternativo origina a proteína GATA-1s

Através de vários mecanismos, o mesmo gene origina diferentes RNA mensageiros (mRNAs). Provavelmente o mecanismo mais utilizado pela natureza para a geração destes mRNAs seja o mecanismo de *splicing* alternativo (Graveley, 2001), sendo os outros representados pela utilização de diferentes sítios de início da transcrição ou poliadenilação e edição de RNA (Beaudoing e Gautheret, 2001; Keegan, Gallo *et al.*, 2001; Down e Hubbard, 2002). Cerca de 30 a 60% dos genes do genoma humano apresentam variantes de *splicing* que originam centenas de transcritos diferentes (Graveley, 2001; Lee, Atanelov *et al.*, 2003) e em 80% destes casos o mecanismo de *splicing* ocorre dentro da região codificadora alterando o mRNA transcrito e posteriormente a proteína traduzida (Modrek, Resch *et al.*, 2001). Assim, o *splicing* alternativo promove a diversidade dos produtos gênicos a partir de uma pequena quantidade de genes. A proteína GATA-1 parece ser um dos exemplos dessa diversidade de produtos gênicos.

Através do mecanismo de *splicing* alternativo, a mesma região codificadora da proteína GATA-1, também origina a isoforma de menor peso molecular (GATA-1s) através da ligação entre os éxons 1 e 3. A proteína GATA-1s perde o domínio de transativação N-terminal, sendo menos ativa, apesar de aparentemente se ligar ao DNA e ao FOG-1 com a mesma intensidade que a proteína GATA-1 (Calligaris, Bottardi *et al.*, 1995; Visvader, Crossley *et al.*, 1995; Rainis, Bercovich *et al.*, 2003; Gurbuxani, Vyas *et al.*, 2004).

Distúrbios no mecanismo de *splicing* alternativo relacionam-se com várias doenças, inclusive câncer. Aproximadamente 15% de todas as mutações que causam doenças alteram o mecanismo de *splicing* e entre essas podemos citar a hemofilia A, a síndrome de Marfan e a neurofibromatose tipo I (Krawczak, Reiss *et al.*, 1992). Além disso, foram encontradas mutações no éxon 2 do gene *GATA1* que alteram o mecanismo de *splicing* e produzem apenas a proteína

GATA-1s em crianças com síndrome de Down (SD). Estas crianças desenvolvem leucemia mieloproliferativa transitória (TMD) ou leucemia megacarioblástica aguda (AMKL) provavelmente em razão desta mutação associar-se à trissomia do cromossomo 21 (Wechsler, Greene *et al.*, 2002; Greene, Mundschau *et al.*, 2003; Mundschau, Gurbuxani *et al.*, 2003; Rainis, Bercovich *et al.*, 2003).

GATA-1 e a hemopoese

O gene *GATA1* é expresso em células das linhagens eritróide, megacarioblástica, eosinofílica, mastocitária e nos progenitores multipotenciais mielóide (Figura 2). Mas, não é expresso em linfócitos, monócitos/macrófagos e neutrófilos (Crotta, Nicolis *et al.*, 1990; Martin, Zon *et al.*, 1990; Zon, Gurish *et al.*, 1991; Sposi, Zon *et al.*, 1992; Leonard, Brice *et al.*, 1993; Mouthon, Bernard *et al.*, 1993; Zon, Yamaguchi *et al.*, 1993; Yomogida, Ohtani *et al.*, 1994; Fujiwara, Browne *et al.*, 1996). Esta proteína é também expressa nas células de Sertoli dos testículos (Yomogida, Ohtani *et al.*, 1994).

A proteína GATA-1 pode interagir com outras proteínas formando complexos protéicos que estimulam ou inibem determinadas regiões gênicas. Entre as proteínas que a GATA-1 interage destacam-se: c-Myb, EKLF, Fli-1, FOG-1, HDAC5, LMO2, PU.1, RUNX-1 (AML-1), CREB-1, Ski-1, Sp1 (Lowry e Mackay, 2006). Entre estas interações protéicas a mais estudada é a ligação da proteína GATA-1 com a proteína FOG-1 que está relacionada com a diferenciação das células da linhagem eritróide e megacarioblástica (Cantor, Katz *et al.*, 2002; Cantor e Orkin, 2002; Chang, Cantor *et al.*, 2002). O complexo protéico GATA-1/FOG-1 é responsável por inibir uma variedade de genes, entre eles o GATA2 e ativar outros como, por exemplo, EKLF e β -globina (Anguita, Hughes *et al.*, 2004; Letting, Chen *et al.*, 2004; Pal, Cantor *et al.*, 2004).

megacariócitos e diminuída nos eritrócitos, contrastando com os resultados de expressão gênica para GATA-1, que é igualmente expresso nos eritrócitos e megacariócitos (Shivdasani, Fujiwara *et al.*, 1997).

Estudos de interação gênica demonstraram que os fatores de transcrição PU.1 e GATA-1 interagem entre si (Galloway, Wingert *et al.*, 2005). A hiperexpressão de GATA-1 inibe a função de PU.1 pois liga-se a este na mesma região que o seu principal coativador (c-jun) impedindo a diferenciação granulocítica. De outra maneira, a hiperexpressão de PU.1 inibe a função do GATA-1 pois liga-se a este no domínio dedo de zinco C-terminal, impedindo que este se ligue nas seqüências consenso do DNA, não promovendo desta maneira a diferenciação eritropoética (Zhang, Zhang *et al.*, 2000).

Mutações no gene *GATA1*

Mutações *missense* herdadas no éxon 4 do gene *GATA1* produziram trombocitopenia acompanhada ou não de anemia em membros de quatro famílias analisadas. Estas mutações alteram a configuração espacial do domínio dedo de zinco N-terminal (codificado pelo éxon 4) impedindo que este se ligue ao seu principal cofator FOG-1.

A primeira descrição desta mutação foi encontrada numa mulher com trombocitopenia moderada que teve dois filhos, que apresentaram desde o nascimento trombocitopenia grave e anemia. O exame do sangue periférico dos meninos analisados apresentou plaquetopenia e plaquetas com grânulos citoplasmáticos anormais; e poiquilocitose e anisocitose moderada em eritrócitos. A medula óssea de ambos os casos era hipercelular e com inúmeros precursores eritróides multinucleados e pequeno número de megacariócitos displásicos. A transição G→A na posição 613 foi identificada nos indivíduos hemizigóticos e na mãe heterozigótica. Esta mutação converte um resíduo de valina em um resíduo de metionina na posição 205 (V205M) da proteína

GATA-1, alterando desta maneira a configuração espacial do domínio dedo de zinco N-terminal impedindo que o FOG-1 se ligue neste domínio, conduzindo ao quadro clínico apresentado pelos pacientes (Nichols, Crispino *et al.*, 2000).

Outra mutação neste mesmo domínio foi descrita por Freson *et al* (Freson, Devriendt *et al.*, 2001) em membros de quatro gerações da família avaliada. Os pacientes apresentaram apenas número diminuído de macroplaquetas. Uma alteração de aspartato para glicina na posição 218 (D218G) foi encontrada tanto nas mulheres heterozigóticas quanto nos homens hemizigóticos. Apenas os homens hemizigóticos apresentam trombocitopenia acentuada; as mulheres não apresentam alterações clínicas. No esfregaço de medula óssea de dois homens hemizigóticos foram encontrados micromegacariócitos. A microscopia eletrônica revelou aumento do tamanho das plaquetas com redução dos seus α -grânulos. Mehaffey *et al* (Mehaffey, Newton *et al.*, 2001) encontraram em membros de uma família analisada uma alteração de dois nucleotídeos (GG→TC) na posição 622 e 623 resultando na alteração G208S para o domínio dedo de zinco N-terminal. Nos homens hemizigóticos foi encontrado apenas uma diminuição do número de plaquetas; enquanto nas mulheres heterozigotas não foram encontradas alterações clínicas.

Recentemente, Yu *et al* (Yu, Niakan *et al.*, 2002) descobriram a primeira e única mutação descrita até o presente momento na região do éxon 4 do gene *GATA1* que altera a configuração espacial do domínio dedo de zinco N-terminal impedindo que este se ligue a uma sequência consenso no DNA (GATAC). Esta mutação (R216Q) produziu trombocitopenia e β -talassemia nos indivíduos hemizigóticos, e anemia discreta nas mulheres heterozigotas.

Freson *et al* (Freson, Matthijs *et al.*, 2002) descreveram outra mutação (D218Y) no domínio dedo de zinco N-terminal localizada imediatamente adjacente a uma mutação previamente descrita pelos mesmos autores (D218G). Os indivíduos hemizigóticos para a mutação D218Y apresentaram um fenótipo mais grave do que na mutação D218G com anemia

diseritropoética grave e número diminuído de macroplaquetas. Na família descrita, seis homens doentes morreram após os dois anos de idade e o único paciente vivo é dependente de transfusões mensais de eritrócitos devido à anemia grave. A microscopia eletrônica das plaquetas mostra diminuição de α -grânulos e agrupamentos de retículo endoplasmático liso. A análise da medula óssea deste paciente revelou acentuada diseritropoese e megacarioblastos displásicos.

Portanto, as mutações no éxon 4 do gene *GATA1* parecem levar a variados graus de plaquetopenia com ou sem anormalidades na linhagem eritróide. Todas as anormalidades encontradas nessas mutações foram atribuídas a interrupções na ligação do domínio dedo de zinco *GATA-1* com o seu principal cofator *FOG-1*, ou a ligação deste domínio com uma outra região consenso no DNA (Nichols, Crispino *et al.*, 2000; Mehaffey, Newton *et al.*, 2001; Freson, Matthijs *et al.*, 2002; Yu, Niakan *et al.*, 2002).

Além das mutações encontradas no éxon 4, também foram identificados mutações adquiridas no éxon 2 do gene *GATA1* em pacientes portadores de SD e que apresentavam TMD ou AMKL. Essas mutações adquiridas impedem ou interrompem a síntese da proteína de maior peso molecular *GATA-1*, resultando na síntese da proteína de menor peso molecular ou *GATA-1s* (Greene, Mundschau *et al.*, 2003; Groet, Mcelwaine *et al.*, 2003; Hitzler, Cheung *et al.*, 2003; Mundschau, Gurbuxani *et al.*, 2003). Na literatura existe apenas uma descrição deste tipo de mutação em uma mulher sem SD e com AMKL (Harigae, Xu *et al.*, 2004).

Desta forma, aparentemente, a presença única da proteína *GATA-1s* associada a alguma mutação ou a algum fator específico da SD parece estar associada ao aparecimento da TMD e AMKL na SD. A procura das causas desses fatores tem provocado o aparecimento de numerosos estudos que procuram pesquisar a função da proteína *GATA-1s* e seu papel no desenvolvimento da TMD e AMKL.

Vários experimentos sugerem que GATA-1s auxilia a diferenciação megacariocítica e eritrocitária (Blobel, Simon *et al.*, 1995; Visvader, Crossley *et al.*, 1995; Weiss, Yu *et al.*, 1997). No entanto, estudos com resgate gênico *in vivo* sugerem que apenas a expressão GATA-1s endógena não seria suficiente para restaurar a eritropoese definitiva, a não ser quando este gene é hiperexpresso (Shimizu, Takahashi *et al.*, 2001). Recentemente, Li *et al* (Li, Godinho *et al.*, 2005) geraram células-tronco embrionárias (ES) e camundongos transgênicos que expressavam apenas a proteína GATA-1s (GATA-1ΔN). Os camundongos adultos apresentaram números normais de plaquetas, eritrócitos e leucócitos. No entanto, durante a fase embrionária ocorreu à proliferação anormal de uma linhagem celular que desapareceu após este período. Assim as conclusões deste experimento foram que a proteína GATA-1s seria capaz de promover a hemopoese normal no adulto. Frente ao exposto os autores concluíram que a proteína GATA-1s é capaz de promover a hemopoese normal no adulto. Os autores sugeriram que a proliferação anormal de células no sangue na vida embrionária poderia ser responsável pela TMD e AMKL geralmente associada à SD como mostra o esquema proposto por esses autores (Figura 3).

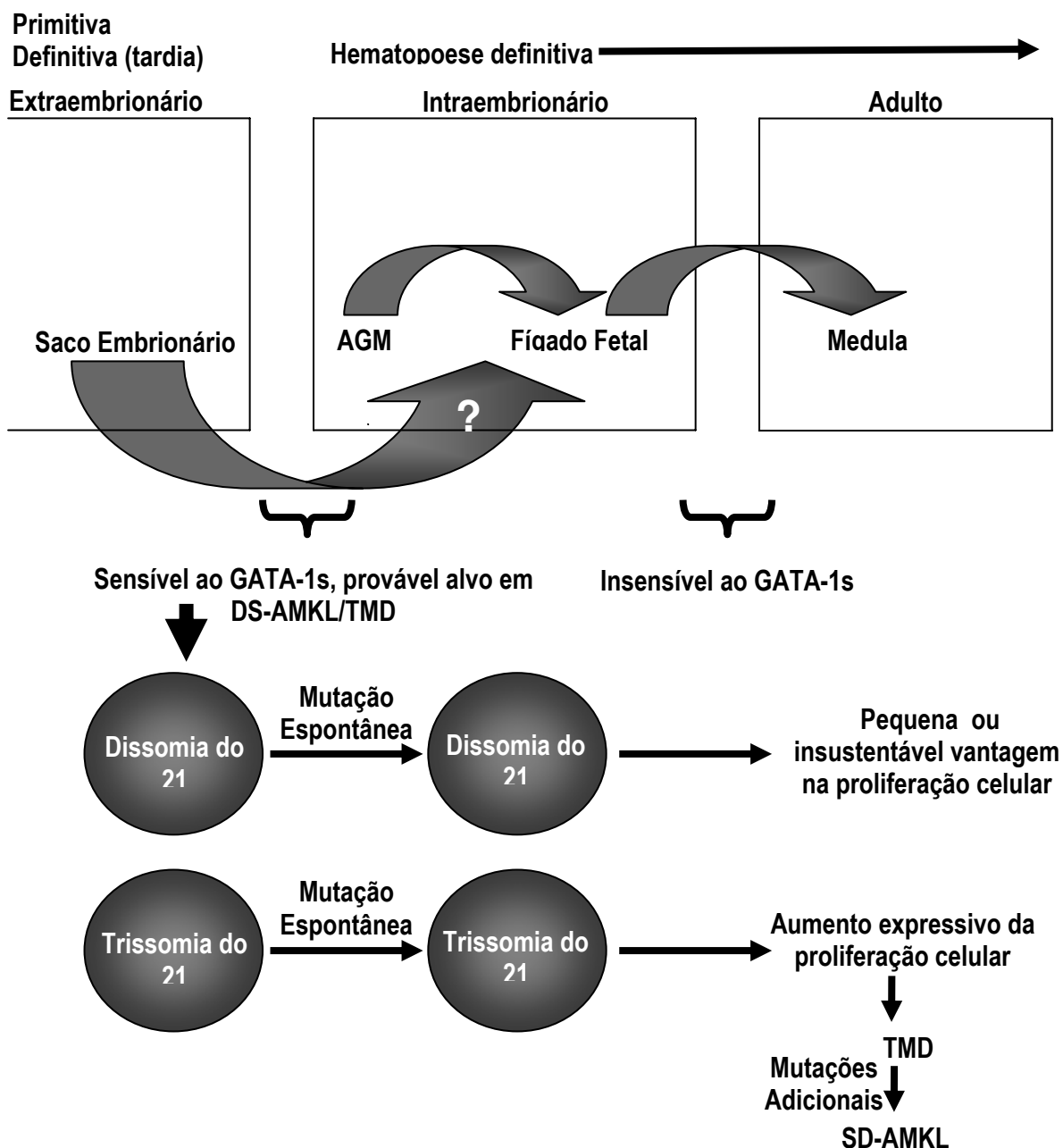


Figura 3. Modelo proposto das células alvo e vias que conduzem a SD-AMKL. Durante o primeiro estágio do desenvolvimento na fase fígado fetal ou embrionário, ocorre mutações somáticas no gene *GATA1* em células progenitoras gerando apenas a proteína GATA-1s. Essas mutações nestes progenitores com dissomia do cromossomo 21 promovem uma pequena ou insustentável vantagem na proliferação celular. Entretanto quando as células apresentam a trissomia do cromossomo 21, ocorre um aumento expressivo na proliferação celular levando a doença de TMD. Mutações adicionais desconhecidas são requeridas para a progressão da TMD para AMKL (Li, Godinho *et al.*, 2005).

Objetivos

Este trabalho teve por objetivo:

Investigar anormalidades no gene *GATA1* em pacientes com SMD adquirida e em pacientes com SMD hipocelular familiar;

Nos pacientes da família analisada também temos por objetivo:

Investigar a presença do mRNA *GATA-1* e *GATA-1s* através da técnica de RT-PCR;

Quantificar a expressão dos genes *GATA1* e *GATA1s* através da técnica de qRT-PCR;

Investigar a presença das proteínas *GATA-1* e *GATA-1s*, através da técnica de imunohistoquímica;

Quantificar as unidades formadoras de colônia CFU-GM;

Quantificar as unidades formadoras de colônia BFU-E;

Analisar a coagulação e função plaquetária;

Investigar prováveis alterações estruturais plaquetárias, através da técnica de microscopia eletrônica.

Materiais e Métodos

1. Casuística

Foram estudados 20 pacientes com SMD adquirida, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCENTRO) da UNICAMP e classificados de acordo com os critérios estabelecidos pelo Grupo FAB (Bennett, Catovsky *et al.*, 1982). Oito pacientes (SMD-1, SMD-4, SMD-5, SMD-10, SMD-11, SMD-12, SMD-13, SMD-14) apresentaram anemia refratária (AR), Sete (SMD-2, SMD-3, SMD-6, SMD-7, SMD-8, SMD-9, e SMD-15) apresentaram anemia refratária com excesso de blastos (AREB), e cinco (SMD-16, SMD-17, SMD-18, SMD-19 e SMD-20) apresentaram anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) (Tabela 2). Os dados hematológicos para os pacientes com SMD adquirida encontram-se nas Tabelas 3 e 4 e foi obtida em períodos prévios a transfusão de eritrócitos.

Além dos casos descritos acima também foi estudado um paciente (III-16) com quadro clínico e laboratorial de SMD hipocelular hereditária. Ele foi atendido no HEMOCENTRO da UNICAMP aos 19 anos de idade referindo anemia desde os quatro anos, tendo recebido inúmeras transfusões de sangue. Após a avaliação do sangue periférico, mielograma e biópsia de medula óssea foi aventado o diagnóstico de SMD hipocelular. O estudo deste paciente facultou a análise de 22 membros pertencentes à mesma família (Figura 4). Destes seis (II-5, II-7, II-8, III-6, III-10, III-12) apresentaram citopenias e os demais não apresentaram qualquer anormalidade de sangue periférico (I-1, I-2, II-3, II-9, II-12, II-13, II-14, III-5, III-7, III-8, III-9, III-11, III-14, III-15, IV-1).

Entre os membros da família avaliada, dois (III-6 e III-10) já eram seguidos no HEMOCENTRO da UNICAMP com um diagnóstico de anemia aplástica, sendo submetidos ao transplante de medula óssea como terapêutica. Outro membro (III-12) era seguido em outro serviço devido à anemia e neutropenia. Os pais dos pacientes III-6 e III-10 são primos de segundo

grau e os pais dos pacientes III-16 e III-17 são primos de primeiro grau. Os pais dos pacientes III-12 não são consanguíneos e ele apresenta as mesmas características clínicas e laboratoriais dos pacientes III-6, III-10, III-16, III-17. O heredograma dos membros da família analisada está apresentado na Figura 2. As atipias celulares em elementos do sangue periférico e da medula óssea de um indivíduo doente (III-16) estão apresentadas nas Figuras 5 e 6.

Os dados hematológicos do sangue periférico e medula óssea dos membros da família analisada estão apresentados nas Tabelas 5 a 8.

2. Aspectos Éticos

O protocolo de estudo está de acordo com a declaração de Helsink de 2000 e foi aprovado pelo comitê de ética local (Processo nº559/2004). O termo de livre consentimento por escrito, foi obtido de todos os pacientes e controles que participaram deste estudo.

Tabela 2. Classificação FAB das SMD para os 20 pacientes avaliados

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Subtipos da doença segundo a classificação FAB
1	F	89	AR
2	M	79	AREB
3	F	67	AREB
4	M	34	AR
5	M	59	AR
6	M	61	AREB
7	F	61	AREB
8	M	64	AREB
9	F	85	AREB
10	M	29	AR
11	F	59	AR
12	F	59	AR
13	F	61	AR
14	M	91	AR
15	M	76	AREB
16	M	77	ARSA
17	F	92	ARSA
18	F	85	ARSA
19	F	69	ARSA
20	F	82	ARSA

M, Masculino; F, Feminino; AR, Anemia refratária; AREB, Anemia refratária com excesso de blastos; ARSA, Anemia refratária com sideroblastos em anel.

Tabela 3. Dados hematológicos dos pacientes com Síndrome mielodisplásica adquirida

Paciente (Diagnóstico- Sexo)	RBC (x106/ μ L)	Hgb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	Ret (x109/L)	RDW (%)	WBC (x103/ μ L)	Neut (x103/ μ L)	Eo (x103/ μ L)	Plt (x103/ μ L)
Valores Normais	Homens (4,2-6,1) Mulheres (4,2-6,1)	Homens (13,0-17,5) Mulheres (11,5-16,5)	Homens (44,0-50,0) Mulheres (40,0-44,1)	(80,0-99,0)	(27,0-31,0)	(22,0-139,0)	(11,5-14,5)	Homens (5,2-12,4) Mulheres (4,0-10,0)	(1,9-8,0)	(0,0-0,5)	(130,0-400,0)
1 (AR - M)	4,8	12,0	39,2	80,9	24,7	86,3	15,7	3,5	2,2	0,1	97,0
2 (AREB - H)	3,4	12,5	38,0	112,9	37,1	60,9	15,9	3,1	1,7	0,05	97,0
3 (AREB - M)	5,1	12,0	37,0	71,5	23,2	64,4	14,6	2,6	1,0	0,1	171,0
4 (AR -M)	5,0	13,4	40,1	80,1	26,8	96,3	13,8	1,7	0,6	0,05	107,0
5 (AR - H)	4,6	14,7	43,4	93,2	31,5	149,5	12,1	2,8	1,5	0,2	98,0
6 (AREB - H)	2,0	15,3	45,0	92,8	30,7	7,5	18,2	5,1	3,2	0,5	118,0
7 (AREB - M)	4,4	12,8	39,0	88,7	29,1	28,0	16,2	3,8	1,6	0,01	42,0
8 (AREB - H)	3,9	8,9	32,1	81,7	22,6	145,2	22,7	6,5	1,8	0,5	39,0
9 (AREB - M)	3,5	9,7	31,6	89,9	27,6	51,6	19,3	3,9	1,2	0,4	429,0
10 (AR-H)	1,7	5,1	15,3	90,8	30,2	NP	14,5	2,3	1,2	0,01	266,0

Valores normais são mostrados no topo entre parênteses. RCB, número de células vermelhas; Hgb, concentração de hemoglobina; Hct, hematócrito; MCV, volume corpuscular médio; MCH, média corpuscular da hemoglobina; Ret, número de reticulócitos; RDW, largura da distribuição das células vermelhas; WBC, número de leucócitos; Neut, número de neutrófilos; Eo, número de eosinófilos; Plt, número de plaquetas; M, mulher; H, homem.

Tabela 4. Dados hematológicos dos pacientes com Síndrome mielodisplásica adquirida

Paciente (Diagnóstico- Sexo)	RBC (x10 ⁶ /μL)	Hgb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	Ret (x10 ⁹ /L)	RDW (%)	WBC (x10 ³ /μL)	Neut (x10 ³ /μL)	Eo (x10 ³ /μL)	Plt (x10 ³ /μL)
Valores Normais	Homens (4,2-6,1) Mulheres (4,2-6,1)	Homens (13,0-17,5) Mulheres (11,5-16,5)	Homens (44,0-50,0) Mulheres (40,0-44,1)	(80,0-99,0)	(27,0-31,0)	(22,0-139,0)	(11,5-14,5)	Homens (5,2-12,4) Mulheres (4,0-10,0)	(1,9-8,0)	(0,0-0,5)	(130,0-400,0)
11 (AR - M)	2,3	7,0	21,1	90,7	30,0	90,2	20,0	11,5	7,7	0,25	281,0
12 (AR - M)	2,4	7,8	24,8	101,7	32,0	35,7	25,7	2,5	1,3	0,1	298,
13 (AR - M)	3,6	13,2	36,2	98,8	36,1	145,3	14,5	4,7	3,5	0,05	245,0
14 (AR - H)	2,1	7,1	22,8	108,2	33,6	43,2	24,5	8,1	4,3	0,2	281,0
15 (AREB - H)	2,1	7,3	22,1	104,8	34,6	84,0	20,7	0,99	0,4	0,01	125,0
16 (ARSA - H)	2,4	8,7	25,5	108,1	36,9	67,8	16,1	3,5	1,5	0,1	178,0
17 (ARSA - M)	2,6	8,3	26,1	99,4	31,6	96,3	18,6	3,7	1,1	0,7	245,0
18 (ARSA - M)	3,5	11,4	34,9	99,1	32,4	NP	20,7	3,6	1,4	0,2	245,0
19 (ARSA - M)	2,9	8,2	25,3	86,3	28,0	61,7	21,6	3,4	1,3	0,03	52,0
20 (ARSA - M)	2,4	8,7	25,4	103,9	35,7	34,1	17,8	3,3	1,9	0,03	153,0

Valores normais são mostrados no topo entre parênteses. RCB, número de células vermelhas; Hgb, concentração de hemoglobina; Hct, hematócrito; MCV, volume corpuscular médio; MCH, média corpuscular da hemoglobina; Ret, número de reticulócitos; RDW, largura da distribuição das células vermelhas; WBC, número de leucócitos; Neut, número de neutrófilos; Eo, número de eosinófilos; Plt, número de plaquetas; M, mulher; H, homem.

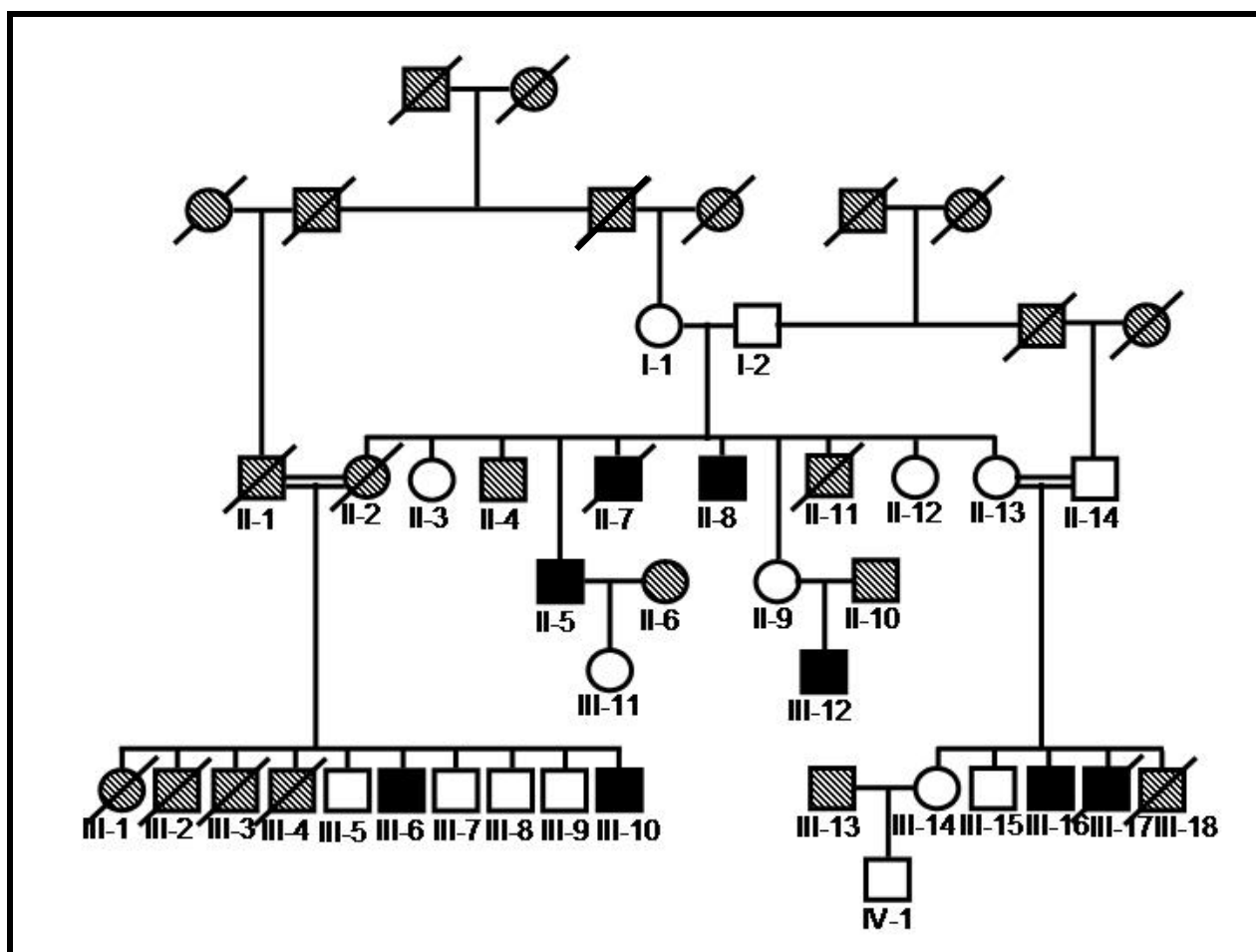


Figura 4. Heredograma dos membros da família analisada. Os quadrados pretos representam os homens sintomáticos com diferentes graus de anemia e neutropenia. Os círculos e quadrados hachurados, representam respectivamente, as mulheres e homens que não foram avaliados. Os círculos e quadrados não preenchidos representam, respectivamente, as mulheres e os homens normais.

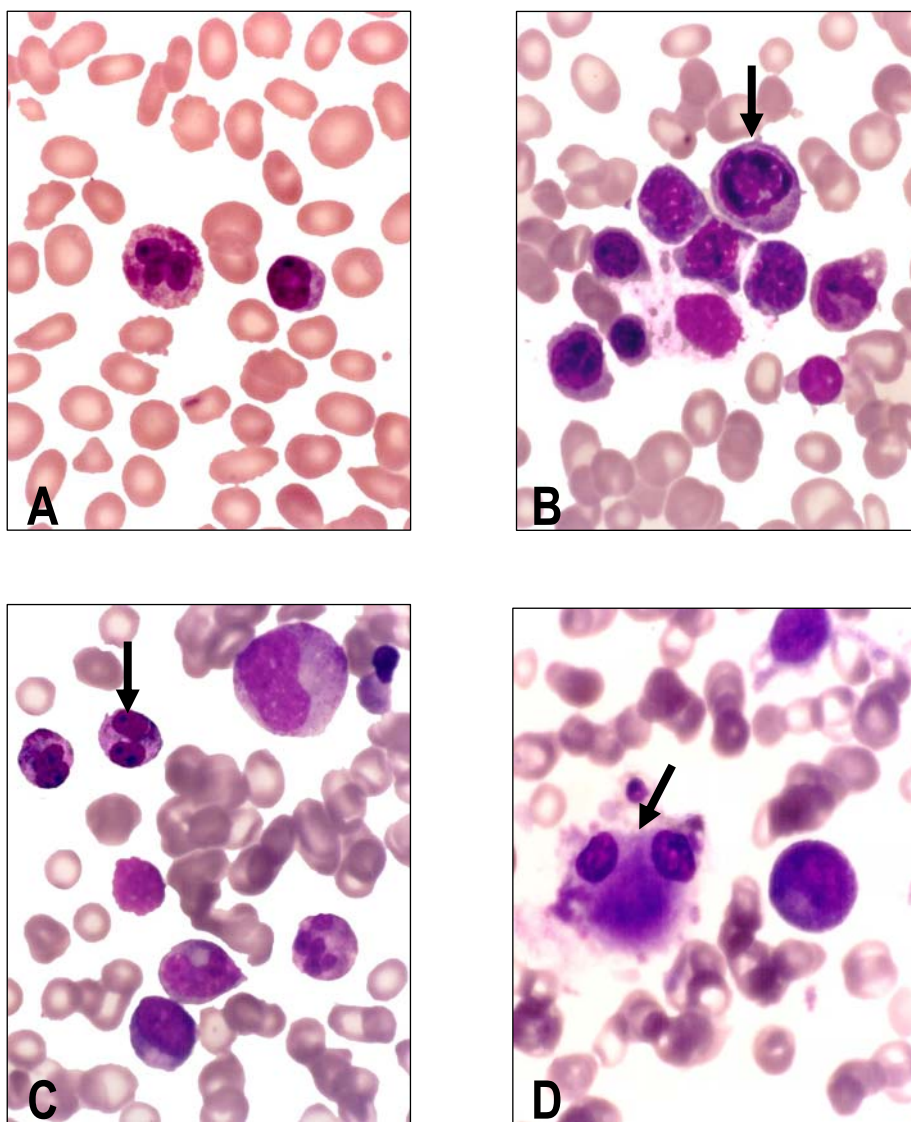


Figura 5. Morfologia do sangue periférico e da medula óssea do paciente III-16. (A) Esfregaço de sangue periférico apresentando, anisocitose, macrocitose, poiquilocitose e eritrócitos fragmentados (Leishman, 1000x). (B) Esfregaço de medula óssea com eritroblastos atípicos (seta) (Leishman, 1000x). (C) Esfregaço de medula óssea com granulócitos que apresentam anormalidades do tipo pseudo Pelger-Hüet (seta) (Leishman, 1000x). (D) Esfregaço de medula óssea com micromegacariócito (seta) (Leishman, 1000x).

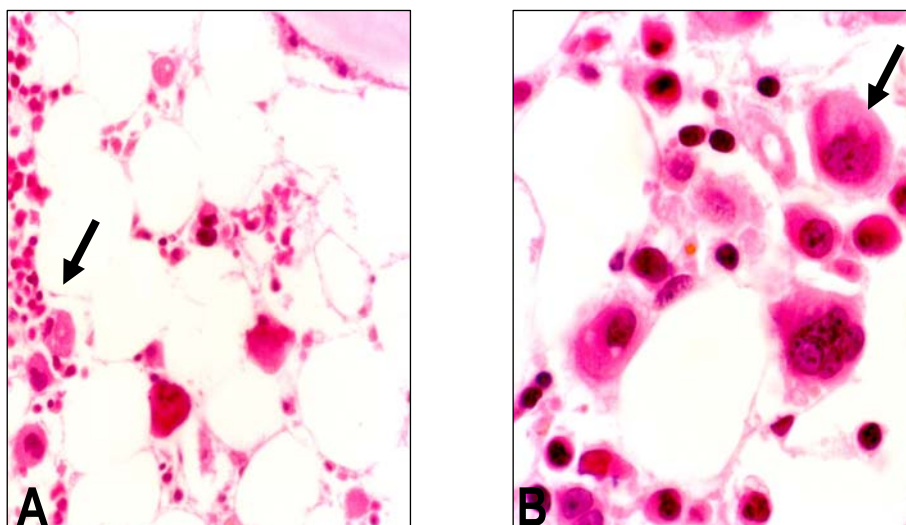


Figura 6. Morfologia da medula óssea do paciente III-16. (A) Biópsia de medula óssea com hipocelularidade e micromegacariócitos (Hematoxilina e Eosina, 400x). (B) Biópsia de medula óssea com hipocelularidade e a presença de micromegacariócitos (seta) (Hematoxilina e Eosina, 1000x).

Tabela 5. Dados hematológicos dos homens doentes pertencentes à família analisada

Paciente (Diagnóstico- Idade)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hgb (g/dl)	HbF (%)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	Ret ($\times 10^9/\text{L}$)	RDW (%)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Neut ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Eo ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Valores Normais (Idade do diagnóstico) ^a	Homens (4,2-6,1)	Homens (13,0-17,5)	(≤ 2)	Homens (44,0-50,0)	(80,0-99,0)	(27,0-31,0)	(22,0-139,0)	(11,5-14,5)	Homens (5,2-12,4)	(1,9-8,0)	(0,0-0,5)	(130,0- 400,0)
II-5 (40 A)	3,6	10,9	NP	36,1	100,6	30,4	NP	19,0	5,9	2,8	0,1	352,0
II-7 (24 A)	2,7	7,7	NP	27,8	99,0	30,0	56,0	NP	3,7	1,2	NP	161,0
II-8 (35 A)	3,8	11,8	NP	38,0	100,8	31,3	139,0	17,8	5,2	2,0	0,0	190,0
III-6 ^b (12 A)	2,0	5,2	4,3	15,3	94,0	34,4	108,0	25,3	2,0	0,6	0,0	135,0
III-10 ^b (20 A)	1,2	3,8	6,9	12,1	101	31	108,0	26,4	1,6	0,5	0,3	144,0
III-12 (2 M)	2,2	6,1	NP	20,1	93,0	28,2	NP	NP	7,5	NP	0,0	345,0
III-12 ^c (11 A)	2,5	7,8	NP	24,7	97,1	30,7	56,0	22,	2,8	0,9	0,1	286,0
III-16 ^c (4 A)	1,9	5,3	2,1	16,3	88,1	28,6	44,2	24,4	2,2	0,6	0,1	294,0
III-17 ^c (17 A)	2,7	9,6	5,0	28,7	102,8	34,4	58,1	20,4	3,7	1,0	0,1	400,0

Valores normais são mostrados no topo entre parênteses. RCB, número de células vermelhas; Hgb, concentração de hemoglobina; HbF, número de hemoglobinas fetais; Hct, hematócrito; MCV, volume corpuscular médio; MCH, média corpuscular da hemoglobina; Ret, número de reticulócitos; RDW, largura da distribuição das células vermelhas; WBC, número de leucócitos; Neut, número de neutrófilos; Eo, número de eosinófilos; Plt, número de plaquetas; a, Idade de detecção para anemia; b, Dados obtidos antes do transplante de medula óssea; c, dados obtidos antes da transfusão sanguínea.

Tabela 6. Dados hematológicos das mulheres pertencentes à família analisada

Paciente (Diagnóstico- Sexo)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hgb (g/dl)	HbF (%)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	Ret ($\times 10^9/\text{L}$)	RDW (%)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Neut ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Eo ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Valores Normais	Mulheres (4,2-6,1)	Mulheres (11,5-16,5)	(≤ 2)	Mulheres (40,0-44,1)	(80,0-99,0)	(27,0-31,0)	(22,0-139,0)	(11,5-14,5)	Mulheres (4,0-10,0)	(1,9-8,0)	(0,0-0,5)	(130,0-400,0)
I-1 (68 A)	4,2	14,0	NP	39,4	93,9	33,3	147,4	13,6	9,2	7,3	0,1	138,0
II-3 (45 A)	5,0	14,6	NP	41,0	83,3	29,7	128,4	13,1	7,4	4,3	0,1	245,0
II-9 (50 A)	4,4	13,5	NP	42,1	96,1	30,8	NP	13,6	10,1	5,1	0,4	267,0
II-12 (35 A)	4,8	14,3	NP	40,0	83,8	30,0	80,3	12,8	7,1	4,6	0,1	195,0
II-13 (29 A)	4,2	14,3	1,3	44,0	102,7	33,4	73,8	13,1	6,2	3,2	0,1	216,0
III-11 (3 A)	4,9	12,4	NP	38,3	78,0	25,3	NP	16,7	13,4	6,7	0,4	346,0
III-14 (16 A)	5,2	14,8	NP	43,9	83,1	28,0	NP	13,5	11,7	6,8	0,5	400,0

Valores normais são mostrados no topo entre parênteses. RCB, número de células vermelhas; Hgb, concentração de hemoglobina; HbF, número de hemoglobinas fetais; Hct, hematócrito; MCV, volume corpuscular médio; MCH, média corpuscular da hemoglobina; Ret, número de reticulócitos; RDW, largura da distribuição das células vermelhas; WBC, número de leucócitos; Neut, número de neutrófilos; Eo, número de eosinófilos; Plt, número de plaquetas.

Tabela 7. Dados hematológicos dos homens normais, pertencentes à família analisada.

Paciente (Diagnóstico- Sexo)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hgb (g/dl)	HbF (%)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	Ret ($\times 10^9/\text{L}$)	RDW (%)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Neut ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Eo ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Valores Normais	Homens (4,2-6,1)	Homens (13,0-17,5)	(≤ 2)	Homens (44,0-50,0)	(80,0-99,0)	(27,0-31,0)	(22,0-139,0)	(11,5-14,5)	Homens (5,2-12,4)	(1,9-8,0)	(0,0-0,5)	(130,0-400,0)
I-2 (75 A)	4,3	12,8	NP	38,1	86,9	29,2	77,2	13,5	8,7	5,1	0,5	200,0
II-14 (40 A)	4,8	15,3	NP	45,0	93,9	31,9	NP	13,9	7,2	3,8	0,3	259,0
III-5 (18 A)	5,3	14,5	NP	44,1	89,5	31,2	NP	12,9	5,7	2,8	0,5	152,0
III-7 (20 A)	5,8	17,5	NP	51,8	90,1	30,4	NP	13,3	6,1	3,4	0,2	165,0
III-8 (17 A)	5,1	16,5	NP	46,8	90,5	31,9	NP	12,8	4,8	3,2	0,2	177,0
III-9 (24 A)	5,4	16,7	NP	48,9	90,4	30,9	NP	13,1	5,8	4,1	0,3	130,0
III-15 (16 A)	4,9	14,8	NP	43,3	89,5	30,6	NP	14,1	10,0	6,9	0,5	230,0
I-2 (75 A)	4,3	12,8	NP	38,1	86,9	29,2	77,2	13,5	8,7	5,1	0,5	200,0
II-14 (40 A)	4,8	15,3	NP	45,0	93,9	31,9	NP	13,9	7,2	3,8	0,3	259,0

Valores normais são mostrados no topo entre parênteses. RCB, número de células vermelhas; Hgb, concentração de hemoglobina; HbF, número de hemoglobinas fetais; Hct, hematócrito; MCV, volume corpuscular médio; MCH, média corpuscular da hemoglobina; Ret, número de reticulócitos; RDW, largura da distribuição das células vermelhas; WBC, número de leucócitos; Neut, número de neutrófilos; Eo, número de eosinófilos; Plt, número de plaquetas.

Tabela 8. Características morfológicas da medula óssea e sangue periférico dos homens doentes

Paciente (idade do diagnóstico)	Quadro Clínico	Sangue Periférico	Biópsia de Medula Óssea	Cariótipo
II-5 (38a)	Anemia	Anisocitose, macrocitose, hemácias fragmentadas, neutrófilos pseudo Pelger-Hüet	Moderada hipercelularidade nas 3 linhagens hematopoéticas. Moderada redução da relação entre Granulócito/Eritrócito. Retardo da maturação granulocítica e eritroblástica. Moderado número de micromegacariócitos. Neutrófilos pseudo Pelger-Hüet	46, XY
II-7 (20a)	Anemia	Anisocitose, macrocitose, hemácias fragmentadas	Hipocelularidade com número normal de megacariócitos e alguns micromegacariócitos	Não realizado
II-8 (38a)	Anemia	Anisocitose, macrocitose, poiquilocitose, hemácias fragmentadas, neutrófilos pseudo Pelger-Hüet	Não realizado	Não realizado
III-6 (12a)	Anemia e esplenomegalia (4cm)	Anisocitose, macrocitose, poiquilocitose, hemácias fragmentadas, neutrófilos pseudo Pelger-Hüet	Moderada hipocelularidade com multinucleação e cariorequice nuclear nos eritroblastos. Moderado número de micromegacariócitos. Neutrófilos pseudo Pelger-Hüet. Não foram observados sideroblastos em anel	46, XY
III-10 (20a)	Anemia	Anisocitose, macrocitose, poiquilocitose, células vermelhas fragmentadas, neutrófilos pseudo Pelger-Hüet	Moderada hipocelularidade com multinucleação e cariorequice nuclear nos eritroblastos. Moderado número de micromegacariócitos. Neutrófilos pseudo Pelger-Hüet. Não foram observados sideroblastos em anel	46, XY
III-12 (2a)	Anemia e cardiopatia congenita	Anisocitose, macrocitose, poiquilocitose, hemácias fragmentadas, neutrófilos pseudo Pelger-Hüet	Normocelularidade com moderada redução na relação Granulócito/Eritrócito. Maturação preservada e moderado número de megacariócitos, com alguns micromegacariócitos	46, XY
III-16 (4a)	Anemia	Anisocitose, macrocitose, poiquilocitose, hemácias fragmentadas, neutrófilos pseudo Pelger-Hüet	Moderada hipocelularidade com multinucleação e cariorequice nuclear nos eritroblastos. Moderado número de micromegacariócitos. Neutrófilos pseudo Pelger-Hüet. Não foram observados sideroblastos em anel	46, XY
III-17 (17y)	Anemia	Anisocitose, macrocitose, poiquilocitose, hemácias fragmentadas, neutrófilos pseudo Pelger-Hüet	Moderada hipocelularidade com multinucleação e cariorequice nuclear nos eritroblastos. Moderado número de micromegacariócitos. Neutrófilos pseudo Pelger-Hüet. Não foram observados sideroblastos em anel	46, XY

3. Análise Molecular

3.1. Extração do DNA genômico total do sangue e medula óssea

A extração de DNA genômico total, das amostras de sangue periférico e medula óssea dos pacientes e controles foi realizada com a utilização do *GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit* (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, USA) conforme especificações do fabricante.

A integridade e qualidade das amostras de DNA total foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2. Extração do RNA total

O RNA total das amostras de sangue periférico e medula óssea dos pacientes e controles foi extraído utilizando-se o reagente *Trizol®* (GibcoBRL Life Technologies, New York, USA), solução monofásica de fenol e guanidina isoticianato, como segue:

Cinco mililitros de sangue foram coletados em tubo plástico contendo heparina. O sangue foi transferido para um tubo Falcon de 15ml e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida o plasma foi removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o volume celular foi estimado e adicionou-se 5x do volume celular de tampão de lise (40 ml de Cloreto de Amônio mais 10ml de Cloreto de Bicarbonato). O conteúdo do tubo Falcon foi incubado em gelo por 30 minutos, sendo agitado a cada 3 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram acrescentados 1000 µL de *Trizol®*. A amostra foi homogeneizada através de várias pipetagens até tornar-se bastante fluída e a solução foi transferida para um microtubo esterilizado de 1,5 ml.

A solução de células com *Trizol®* foi estocada ou incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Acrescentou-se 200 µL de clorofórmio e o microtubo foi agitado vigorosamente. A

seguir a solução foi e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugada por 15 minutos a 13.500 rpm a 4°C. A fase aquosa, onde fica o RNA, foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga acrescentando-se 500 µL de isopropanol. A solução foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 13.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 1000 µL de etanol 75% ao RNA precipitado. Novamente a amostra foi centrifugada a 11.500 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado.

As amostras foram deixadas 5 minutos a temperatura ambiente para a total evaporação do etanol e em seguida, foram ressuspensas em água com dietilpirocarbonato (DEPC) e incubadas por 10 minutos a 55°C. As amostras de RNA foram estocadas a -80°C.

A quantificação do RNA foi realizada através da leitura de densidade óptica em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm e a sua integridade foi verificada através da eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% com formaldeído.

3.3. Transcrição do mRNA em cDNA

As amostras de RNA extraídas como descrito anteriormente, foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit *Superscript III RTTM* (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, USA). Após leitura e quantificação no espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, USA), cerca de 2,5 µg RNA foram tratados com DNase I (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, USA), para a remoção de qualquer contaminante de DNA, adicionando-se 1,0 µL de 1U/µL DNase I, 1,0 µL de 10X *DNase I reaction buffer* (200mM Tris-HCl, 20mM MgCl₂, 500mM KCl₂) e água suficiente para um volume final de 10,0 µL de reação. A reação foi realizada por 15 min à temperatura ambiente e paralisada com 1,0 µL de 25mM EDTA, incubando-se por 10 min a 65°C.

Para a síntese do cDNA foram adicionados 1,0 µL de *oligodT* e 1,0 µL de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP's). As amostras foram incubadas por 5 min a 65°C, seguidos por 1 min a 4°C. A cada amostra, adicionaram-se 10,0 µL da seguinte mistura de reação: 2 µL de 10x *RT buffer*, 4,0 µL de 25mM MgCl₂, 2,0µl de 0,1M DTT, 1,0µl de 40U/µl *RNaseOUTTM* e 1,0µl de 200U/µl *Superscript III RTTM*. A reação ocorreu por 50 min a 50°C, seguindo-se de 5 min a 85°C. A seguir, acrescentaram-se as amostras 1,0 µl de 2U/µl *E. coli RNase H* por 20min a 37°C.

A quantificação dos cDNA foi realizada no espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, USA).

3.4. Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de 5 dos 6 éxons pertencentes ao gene *GATA1* e para amplificar o mRNA do GATA-1 e do GATA-1s foram sintetizados de acordo com seqüências previamente descritas (Nichols, Crispino *et al.*, 2000; Rainis, Bercovich *et al.*, 2003) (Tabela 9, Tabela 10, Tabela 11).

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações da qRT-PCR foram desenhados com o uso do programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, USA) e analisados no programa *GeneRunner* (Hastings Software) e *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para verificar as suas especificidades.

Os oligonucleotídeos foram eluídos em água, para obter a concentração final de 100 µM, em capela de fluxo laminar esterilizada. A seguir, foram quantificados em espectrofotômetro.

A sequência em bases desidrogenadas da região 5' para a 3' de cada um dos oligonucleotídeos utilizados para quantificar a expressão dos genes *GATA1*, *GATA1s* e dos genes constitutivos *β -actina* e *GAPDH* foram descritos conforme Tabela 12.

Tabela 9. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar 5 dos 6 éxons do gene *GATA1*

Exon	Oligonucleotídeos	Tamanho dos fragmentos amplificado
2	E2F, 5'-GGGAAAGGAGGAAGAGGAG-3'	365 pb
	E2R, 5'-CCAACAGCACTCAGCCAATG-3'	
3	E3F, 5'-GAACTTGGCCACCATGTTGG-3',	563 pb
	E3R, 5'-AGCTAGGCTCAGCTCAGCTTTAC-3'	
4	E4F, 5'-GAGGTGGGAGGGGTGGCCCAAAG-3'	460 pb
	E4R, 5'-GGGCAGGAGTTCTCATGCAGG-3'	
5	5F, 5'-GGCATCACCCCTGTAAACAAAGCC-3'	305 pb
	5R, 5'-GAAGACAGGGAAAGCAGAGG-3'	
6	6F, 5'-GTGTCCCTGGTTGACACAGAG-3'	493 pb
	HG1R, 5'-GGCTACAAGAGGAGAAGGAC-3'	

Tabela 10. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do mRNA para *GATA-1*

RNA	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento amplificado
GATA-1	GATAEX1F: 5'-ACACTGAGCTTGCCACATC-3'	400pb
	GATAEX3R: 5'-CTCAGTTGAGGCAGGGTAGAG-3'	

Tabela 11. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do mRNA para GATA-1s

RNA	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento amplificado
GATA-1s	GATAEX1F: 5'-ACACTGAGCTTGCCACATC-3' GATAEX3R: 5'-CTCAGTTGAGGCAGGGTAGAG-3'	172pb

Tabela 12. Oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real

Gene	Seqüência de Oligonucleotídeos	Concentração (nM)	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento amplificado
<i>BAC</i>	F – 5' AGGCCAACCGCGAGAAG 3' R – 5' ACAGCCTGGATAGCAACGTACA 3'	150 nM	82°C	79 pb
<i>GAPDH</i>	F – 5' GCACCGTCAAGGCTGAGAAC 3' R – 5' CCACTTGATTTTGGAGGGATCT 3'	300 nM	81°C	89 pb
<i>GATAI</i>	F – 5' CTACTACAGGGACGCTGAGG 3' R – 5' CCCC GTCTTGCCGTAGG 3'	150 nM	84.5°C	124 pb
<i>GATA1s</i>	F – 5' CCAGCCCAGTCTTTCAGGTG 3' R – 5' CCCC GTCTTGCCGTAGG 3'	150 nM	84°C	95 pb

3.5. Reações em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos éxons pertencentes ao gene *GATAI* e do mRNA para *GATA-1* e *GATA-1s*.

As reações de PCR para a amplificação dos éxons pertencentes ao gene *GATAI* (Nichols, Crispino et al., 2000), foram realizadas em termociclador automático (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) e padronizadas em 50,0 µl contendo 0,6 µl de cada oligonucleotídeo (10 pMol), 1,0 µl de dNTPs (1,25 mM), 5,0 µl de Tampão 10X, 2,0 µl de MgCl₂ (50µM), 1,0 µl a 3,0 µl de

DNA (1µg/µL), 0,3 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl) e H₂O suficiente para 50 µL. Os ciclos utilizados foram os seguintes: 96°C por 2 min; seguidos de 35 ciclos de 96°C por 30 seg; 63°C por 30 seg; 72°C por 1 min; com uma extensão final de 72°C por 7 min.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

Para detecção dos dois mRNAs (GATA-1 ou GATA-1s) ou apenas do mRNA (GATA-1s), utilizamos a técnica de RT-PCR, descrita por Rainis e colaboradores (Rainis, Bercovich *et al.*, 2003).

O produto do PCR foi analisado em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Como controle positivo para a reação foi utilizada uma amostra de cDNA da linhagem celular de K562, que expressa as duas isoformas da proteína, portanto possui os dois RNAm e para o controle negativo desta reação foi feita uma reação de PCR sem adição de cDNA.

Para confirmar se os fragmentos amplificados pertenciam realmente aos mRNA GATA-1 e GATA-1s os fragmentos foram cortados do gel purificados com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) e posteriormente seqüenciados.

3.6. Purificação do fragmento de DNA e dos fragmentos do mRNA correspondentes ao GATA-1 e GATA-1s

Utilizando um bisturi novo esterilizado, a banda purificada foi cortada do gel de agarose 1,5%, e colocada dentro de um microtubo de 1,5 ml. Ao microtubo foram adicionados 30 µL de *Capture buffer*. O microtubo foi agitado no vórtex e incubado a 60°C por 15 minutos, sendo agitado a cada 3 minutos até a completa dissolução do gel, formando uma solução.

A solução foi transferida para a coluna *GFXTM* acoplada a um novo microtubo e centrifugada a 13.400 rpm por 30 segundos. O material que passou pela coluna e que se encontra no microtubo foi descartado e a coluna novamente acoplada adicionou-se 500 µL de *Wash buffer* (10mM Tris-HCl pH=8.0, 1mM EDTA, 80% de Etanol absoluto) e centrifugou-se a 13.400 rpm por 30 segundos.

A coluna foi acoplada em um novo microtubo limpo e esterilizado. À coluna foi adicionado 50 µL de *Elution buffer* (10mM Tris-HCl pH=8.0, TE pH=8.0 ou água Mili-Q) diretamente no topo da matriz de fibra de vidro da coluna *GFXTM*. O *Elution buffer* na coluna foi incubado por 1 minuto a temperatura ambiente em seguida a coluna acoplada ao microtubo foi centrifugada a 13.400 rpm por 1 minuto.

3.7. Reações de seqüenciamento

As reações para o seqüenciamento dos éxons pertencentes ao gene *GATA1* e para os fragmentos pertencentes ao mRNA do GATA-1 e GATA-1s foram realizadas em 10 µL de reação final utilizando 1 µL de *Big Dye terminator* (Applied biosystems, Foster City, USA), 5 pmol de primer e 40 ng do produto do PCR, seguindo as instruções do fabricante.

Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C por 30 seg; seguidos de 49 ciclos de 57°C por 25 seg; 60°C por 4 min; e incubados a 4°C.

As reações foram purificadas através da adição de 2µL de Acetato de Amônio 7,5M e 50µL de Etanol 100%. As amostras foram incubadas na ausência de luz por 20 minutos, centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos e lavadas com Etanol 70%. As amostras foram ressuspensas em 2µL de tampão de corrida (Formamida deionizada pH=7,0 5x para 25mM de EDTA/Blue dextran 50mg/ml 1x) e levadas a seqüenciamento no seqüenciador ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

O resultado do seqüenciamento foi comparado com as seqüências depositadas no *Genebank* com o auxílio do programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.8. Quantificação da expressão dos genes *GATA1* e *GATA1s*

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) representa um grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, já que facilita a quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica.

Para quantificar a expressão de um determinado gene, o método, utiliza um sistema fluorescente em plataforma, capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação.

3.8.1. Eficiência da reação qRT-PCR.

Utilizando a concentração ideal de cada iniciador foi determinada então a eficiência da reação qRT-PCR. Para tanto foram feitas reações com cinco quantidades conhecidas de amostras, em escala logarítmica: 2×10^0 ng; $2 \times 10^{0,5}$ ng; 2×10^1 ng; $2 \times 10^{1,5}$ ng; 2×10^2 ng. Além disso, foi feita também uma reação contendo quantidade intermediária de amostra, 120ng, perfazendo um total de seis reações.

Durante a fase exponencial das curvas de fluorescência, um coeficiente de inclinação da reta (Slope) foi traçado. A eficiência da reação foi calculada pela fórmula: $\text{Eff} = 10^{(-1/\text{slope}) - 1}$ (PFAFFL, 2001), dado pelo programa *GeneAmp*[®] 5700 SDS (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Assim, para que a qRT-PCR seja confiável e reprodutiva são necessárias que as amplificações apresentem 95-100% de eficiência de amplificação (coeficiente de correlação de Pearson ou R^2 , onde r deve ser $>0,95$, o qual é a reflexão da eficiência da amplificação da qRT-PCR), a cada ciclo em duplicata e inclinação da reta ou Slope entre -3,1 e 3,6.

Os resultados foram utilizados para construção de uma curva de diluição, apresentando os números de ciclos, onde foi determinado o CT versus a quantidade das amostras em duplicata.

3.8.2. qRT-PCR

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *ABI 5700 Sequence Detection System*® (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) utilizando o reagente *SYBR*® *Green PCR Master Mix* (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, USA), que contém o corante *SYBR*® *Green*, dNTPs, MgCl₂, Tampão e Taq Ampli-Gold. Tendo sido feitas as devidas padronizações, as reações realizadas continham 12,5 µL do reagente *SYBR*® *Green PCR Master Mix*, 2 ng de amostra de cDNA da medula óssea do paciente III-16, 2 ng de amostra de cDNA de K562, e 2 ng de um pool de medula óssea de controles normais e a concentração ideal de cada iniciador determinada anteriormente, perfazendo um volume final de 25µL.

Em todas as reações, foram feitos controles negativos, contendo água esterilizada em substituição às amostras. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc, USA) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. Os ciclos utilizados foram os seguintes 95°C por 10 min seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 seg; 60°C por 1 minuto e estocagem a 4°C.

Para certificação de que a fluorescência emitida não foi gerada por amplificação inespecífica dos oligonucleotídeos, foi feita a análise da curva de dissociação gerada pelo programa do aparelho. Esta curva baseia-se na temperatura de anelamento (T_M) específico de cada produto amplificado ou temperatura de dissociação, 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 da PCR, são coletados dados de fluorescência. A curva de dissociação ocorre quando em determinada temperatura, o produto da PCR separa as fitas de DNA e ocorre a queda de

fluorescência gerada pelo fluoróforo *SYBR[®] Green*, já que o mesmo intercala somente na dupla fita.

Vale comentar que todos os passos descritos acima foram seguidos levando em consideração as recomendações citadas no *User Bulletin* da *Applied Biosystems* (Foster City, USA).

3.8.3. Quantificação e normalização das amostras pelo método *geNorm* version 3.4

A expressão dos genes de interesse foi quantificada e normalizada com relação a dois genes controles ou calibradores (*β -ACTINA* e *GAPDH*). Estes são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições.

Para tanto, após a exportação dos valores dos CTs obtidos, para uma planilha *Excel* (Microsoft Corporation, USA), foi calculada a média aritmética do CT das duplicatas. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula $Q = E^{\Delta CT}$, onde E = eficiência de reação e ΔCT = menor CT observado – CT de cada amostra. Desta forma, a expressão gênica foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (menor CT observado).

Os valores Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao método *geNorm* (*Program geNorm version 3.4*) (Vandesompele, De Paepe *et al.*, 2002; Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002), que calcula a média geométrica entre eles, valor este denominado fator de normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e o fator de normalização da mesma.

4. Imunohistoquímica

O anticorpo GATA-1 (N6), utilizado para detectar uma região da proteína GATA-1 que compreende o domínio de transativação N-terminal (Wechsler, Greene *et al.*, 2002) é um anticorpo monoclonal de rato. Por outro lado, o anticorpo GATA-1 (C-20) é um anticorpo policlonal de cabra utilizado para mapear a região da proteína GATA-1 que compreende o dedo de zinco C-terminal (Wechsler, Greene *et al.*, 2002).

Fragmentos de medula óssea inseridos em parafina de cinco controles e dos pacientes II-5, III-6, III-10, III-16 e III-17 (Figura 15) foram cortados em micrótomo para a obtenção de cortes histológicos de 12 micra, que foram fixados em lâminas de vidro.

Em seguida foi feita a titulação dos anticorpos para encontrar a melhor diluição de trabalho. A diluição de trabalho é aquela onde não apareça coloração de fundo nas amostras teciduais e onde somente o núcleo e uma pequena quantidade de citoplasma dos precursores eritróides e megacariocíticos apareça corada.

4.1. Titulação dos anticorpos GATA-1 C-20 e N-6

Tomando-se como base os cinco controles, foram feitas cinco diluições dos anticorpos 1:20, 1:100, 1:200, 1:600, 1:800. A melhor diluição encontrada para o anticorpo GATA-1 (C-20) foi de 1:600 e para o anticorpo GATA-1 (N-6) foi 1:20.

4.2. Reação de Imunohistoquímica

4.2.1. Preparo das lâminas

As lâminas para microscopia, que posteriormente foram utilizadas para a fixação dos cortes histológicos de medula óssea, foram mergulhadas em uma solução de extran 0,5% diluído em água por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por no mínimo

2 horas até a completa remoção do detergente. As lâminas foram então lavadas em água destilada várias vezes, mergulhadas em um solução de HCl 2N por 5 minutos, lavadas em água destilada por 1 minuto e lavadas numa solução de HCl 1% diluído em etanol 70% por 5 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada e seca em estufa a 70°C. Depois de secas as lâminas foram guardadas em caixas limpas para evitar contaminação por poeira ou foram submetidas à silanização.

Foram preparadas 3 cubas de vidro com tampa na capela, uma contendo acetona PA (cuba 1), outra contendo uma solução APTS 4% (Silano – Sigma-Aldrich, Chicago, USA) diluído em acetona PA (cuba 2) e a terceira cuba contendo acetona PA, para serem utilizadas na silanização das lâminas.

As lâminas foram primeiramente mergulhadas na cuba 1 por 2 minutos, em seguida, depois de retirado o excesso de acetona para não diluir a solução de APTS, as lâminas foram imersas na segunda cuba por 2 minutos, depois de retirado o excesso elas foram imersas na cuba 3 por 4 vezes. Depois de retirado o excesso de acetona elas foram secas em estufa a 60°C, esfriadas e guardadas em caixas de papel até a sua utilização.

4.2.2. Reação de Rotina de Imunoperoxidase.

Oito cubas de vidro contendo soluções diferentes foram preparadas como segue e colocadas uma ao lado da outra dentro da capela, para a desparafinização dos cortes histológicos,.

Cuba 1: Solução de Xilol P.A. aquecida por 30 minutos a 110°C.

Cuba 2: Solução de Xilol P.A. a temperatura ambiente.

Cuba 3: Solução de Xilol P.A. a temperatura ambiente.

Cuba 4: Solução de Etanol Absoluto a temperatura ambiente.

Cuba 5: Solução de Etanol Absoluto a temperatura ambiente.

Cuba 6: Solução de Etanol Absoluto a temperatura ambiente.

Cuba 7: Solução de Etanol 80% a temperatura ambiente.

Cuba 8: Solução de Etanol 50% a temperatura ambiente.

As lâminas foram colocadas em uma grade vazada, que cabe dentro da cuba de vidro e permite o contato do material com a solução. As lâminas foram submersas por 5 vezes dentro de cada cuba na seqüência descrita acima. Terminada a última cuba as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

Em seguida as lâminas foram submersas em uma cuba de vidro contendo uma solução de H_2O_2 a 10% por 3 minutos. Essa etapa do processo foi realizada por 3 vezes, sendo que a cada 3 minutos a solução era desprezada e uma nova solução era colocada dentro da cuba. Esta etapa do processo tem a finalidade de bloquear a peroxidase endógena para que não ocorra uma reação cruzada entre o anticorpo e possíveis epítomos que não são os epítomos de interesse a serem analisados.

Terminada esta etapa do processo as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e passadas em água destilada.

Em seguida foi realizada a recuperação antigênica. As lâminas foram mergulhadas em uma cuba contendo tampão Citrato 10mM pH=6.0 e deixadas em uma panela de vapor por 30 minutos. As lâminas em seguida, foram esfriadas por 20 minutos e lavadas em água corrente.

As lâminas foram então mergulhadas em solução de PBS (1,38g de $NaH_2PO_2 \cdot H_2O$; 6,96 gr de K_2HPO_4 ; 7,2 gr de $NaCl$; H_2O q.s.p 1000 ml acertar o pH=7,4 e estocar) com 1% de tripsina por 30 minutos, e receberam 150 μ l dos anticorpos primários GATA-1 (C-20) e GATA-1 (N-6). Foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C ou colocadas na geladeira *overnight* a 4°C. Após a incubação as lâminas com o anticorpo primário GATA-1 (C-20) foram lavadas em três etapas sob agitação contínua em tampão PBS, com duração de 5 minutos para cada etapa. As

lâminas foram secas com papel de filtro e em seguida submetidas ao processo de coloração com o sistema *DakoCytomation LSAB+System* (Dako Corporation, Carpinteria, USA).

As lâminas contendo o anticorpo primário GATA-1 (N-6) foram lavadas em três etapas sob agitação contínua em tampão PBS, com duração de 5 minutos para cada etapa, o excesso de tampão foi retirado com papel de filtro e o anticorpo secundário Anti-Rato-HRP diluído 1:100 foi espalhado em cima da lâmina que foram então colocadas em câmara úmida por 45 minutos a 37°C e, em seguida, lavadas com tampão PBS e tampão TBS (solução estoque 1: 6,06 gr de Tris-HCl; 1,39 gr de Tris Base; H₂O q.s.p 100 ml; acertar o pH=7,6. solução estoque 2: 0,89 gr de NaCl; H₂O q.s.p 100 ml. Diluir 1 parte da Solução Estoque 1 em 9 partes da Solução Estoque 2). Em seguida as lâminas foram coradas pelo sistema *Dako Cytomation StreptABComplex/HRP* (Dako Corporation, Carpinteria, USA).

Após a secagem das lâminas com papel de filtro elas foram submetidas aos sistemas *DakoCytomation LSAB+System* (Dako Corporation, Carpinteria, USA) para a detecção do anticorpo GATA-1 (C-20) e *StreptABComplex/HRP* (Dako Corporation, Carpinteria, USA) para a detecção do anticorpo GATA-1 (N-6) seguindo as instruções do fabricante.

As lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C, em seguida o excesso dos reagentes foi escoado e as lâminas foram colocadas em tampão PBS pré-aquecido a 37°C. Após algumas lavagens o tampão PBS foi descartado e as lâminas foram submersas numa solução de DAB (60 mg de DAB; 100 ml de PBS; 1500 µl de 10% H₂O₂; 1 ml de DMSO) por 5 minutos a 37°C, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada para retirar o excesso de DAB e em seguida contra coradas com Hematoxilina de Mayer por 30 segundos. As lâminas foram novamente lavadas e passadas por alguns segundos em água amoniacal, foram passadas em água corrente, desidratadas, montadas e fixadas para visualização.

As moléculas de anticorpo não podem ser vistas no microscópio óptico sob condições normais. Elas só poderão ser visualizadas se forem submetidas a algum tipo de marcação ou coloração.

O sistema *Dako Cytomation LSAB+ System* (Dako Corporation, Carpinteria, USA), que foi utilizado para a marcação do anticorpo GATA-1 (C20), explora a alta afinidade de ligação entre a estreptoavidina e a avidina. A biotina liga-se quimicamente ao anticorpo primário GATA-1 (C-20) que está ligado ao epítipo da região dedo de zinco C-terminal, produzindo um conjugado bioatinilado. Subseqüentemente, a estreptoavidina, quimicamente conjugada a peroxidase, é adicionada ligando-se ao conjugado bioatinilado. A peroxidase reage então com o DAB (diaminobenzidina) que será posteriormente introduzido, produzindo no local do epítipo uma coloração amarronzada.

O sistema *StreptABC/HRP* (Dako Corporation, Carpinteria, USA) utilizado para a marcação do anticorpo GATA-1 (N6) tem como reagentes a estreptoavidina e a peroxidase. A estreptoavidina ligada a peroxidase reage contra o anticorpo secundário que está ligado ao anticorpo primário e este por sua vez ligado ao epítipo. Quando a peroxidase reage com o DAB ocorre à formação de um granulado marrom no local que está localizado o epítipo.

5. Análise da unidade formadora de colônia granulocítica-monocítica (CFU-GM)

Para medir o número de colônias CFU-GM da medula óssea do paciente III-16, foram separadas, as células mononucleares, a partir de 3ml de um aspirado de medula óssea por centrifugação a 400 g em um gradiente de concentração em *Ficoll Hypaque* (densidade 1,077g/ml; Pharmacia Biotech, Piscataway, USA).

As células mononucleares da interface foram lavadas três vezes com RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Chicago, USA-Aldrich, Chicago, USA) e contadas para a formação autônoma.

Uma análise, com a suspensão celular mononuclear foi preparada em 2 ml de cultura em ágar em placas de Petri de 35 mm utilizando 5×10^5 células/cultura. O meio utilizado foi o *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM - Sigma-Aldrich, Chicago, USA-Aldrich, Chicago, USA) contendo 20% de soro fetal bovino e 0,6% de ágar.

As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 100%. As colônias foram contadas após 14 dias em um microscópio para dissecação utilizando aumento de 35x (Robb, Lyons *et al.*, 1995).

6. Crescimento e diferenciação de progenitores eritróides do sangue periférico (BFU-E) em eritropoetina

Para medir o número de colônias BFU-E da medula óssea do paciente III-16 e do controle II-14, foram colhidos 20 ml de sangue periférico em heparina. Em seguida o sangue foi centrifugado em um gradiente de *Ficoll Hypaque* (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) a 20°C por 30 minutos a 1500 rpm. As células da interface entre o Ficoll e o plasma foram coletadas e lavadas três vezes em *IMDM* (Sigma-Aldrich, Chicago, USA-Aldrich, Chicago, USA) 1x concentrado e ressuspensas a uma concentração de 5×10^5 células/ placa.

A seguir foram adicionados os volumes apropriados de células ao meio mais ágar (Bacto-ágar, Difco, USA), o qual consiste de: 30% de meio *IMDM* 2x concentrado, 20% de soro fetal bovino (SFB) 50% de ágar (0,6 %).

As células ressuspensas foram distribuídas em volumes de 2 ml em cada placa de Petri (35mm, Corning, USA), a qual já continha o estímulo apropriado (meio condicionado de células 5637/365 U e Eritropoetina (Epo) recombinante humana em diferentes concentrações que variaram de 1 a 5 U, Cilag). Para o estudo da autoproliferação, concomitantemente crescemos duplicatas sem a adição de estímulo em placa de cultura. O conteúdo foi distribuído por toda a

superfície da placa e deixou-se gelificar. As culturas foram incubadas por 14 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂.

Após 14 dias contou-se o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40x (Croizat, Billett *et al.*, 1990; Robb, Lyons *et al.*, 1995).

7. Análise dos fatores de coagulação plasmática

Aproximadamente 25 ml de sangue periférico foram coletados em um uma seringa e colocados em tubo falcon de 15 ml contendo 3,2% (peso/volume) de citrato de sódio (anticoagulante sangüíneo, razão 9:1). O sangue foi centrifugado em temperatura ambiente, por 10 minutos a 800g obtendo-se desta maneira o plasma rico em plaquetas (PRP). O plasma pobre em plaqueta (PPP) foi recolhido a partir de outro tubo contendo o sangue periférico centrifugado por 15 minutos a 1500g em temperatura ambiente.

O plasma humano derivado do sangue anticoagulado com citrato foram submetidos aos testes de: coagulação (tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), tempo de trombina (TT) e ao teste dos fatores de coagulação parcialmente ativados VIII, IX, XI, XII de acordo com procedimentos de rotina previamente estabelecidos utilizando-se o rotor de coagulação analisador *Thrombolyzer Rack* (Organon Teknika).

O fator antigênico circulante de von Willebrand (vWF:Ag) foi medido pelo ensaio de imunoabsorção de ELISA, utilizando um anti-soro comercial de coelho contra o vWF humano (Dako) e o anti-soro policlonal anti-fator von Willebrand conjugado com peroxidase (Dako polyclonal P226) (Budde, Drewke *et al.*, 2002).

8. Análise das glicoproteínas de membrana plaquetária

A técnica de citometria de fluxo consiste no reconhecimento de proteínas *in situ* com um anticorpo marcado com um fluorocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocinato (FITC). Este fluorocromo ao ser estimulado por um feixe de laser emite um fóton que é captado por sensores do aparelho. O citômetro de fluxo faz análises tanto qualitativas (quanto certo produto é expresso por célula) como quantitativas (quantas células expressam esse produto) da mesma amostra (Koschmieder, Rosenbauer *et al.*, 2005).

Dois homens (II-8 e III-16) portadores de anemia, uma mulher (II-13) e um homem (II-14) normais tiveram as glicoproteínas plaquetárias analisadas, utilizando anticorpos monoclonais (mAb) conjugados com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC), contra GPIX (CD42a-FITC), GPIb α (CD42b-PE), GPIIb (CD41-FITC), and GPIIIa (CD61-FITC) (Beckman Coulter Inc), de acordo as instruções do fabricante e de acordo com as técnicas previamente descritas (Gawaz e Ward, 1991; Gao, Wu *et al.*, 1999; Pedrazzoli, Noris *et al.*, 2000).

Controles negativos foram preparados utilizando IgG1-PE e IgG2a-FITC (Beckman Coulter Inc) de camundongo. Os controles negativos foram preparados utilizando PRP (plasma rico em plaquetas) de camundongo que foi ajustado para 50×10^9 plaquetas/L e fixados com 0,2% de paraformaldeído por 10 minutos a temperatura ambiente. As plaquetas foram então lavadas com o tampão de fosfato e salina (PBS) contendo 3,0 mM de EDTA e 5% (peso/volume) de soro de albumina bovino (Sigma-Aldrich, Chicago, USA), ressuspendido em 45 μ l PBS-BSA sendo incubados por 20 minutos a temperatura ambiente com 10 μ l de uma solução de trabalho de cada mAb. Após uma lavagem adicional, as células foram ressuspendidas em 300 μ l de PBS-BSA e foram analisadas no citômetro *FACs scalibur* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

O sangue periférico dos pacientes e controles foi coletado em tubo Falcon contendo 3,2% de citrato de sódio. Em seguida o tubo foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, o

sobrenadante (plasma rico em plaquetas – PRP) foi separado e o número de plaquetas foi estimado no sistema automatizado de contagem de células do sangue *Cell Dyn* (Abbot Diagnostics, Illinois, USA). Em um tubo 5 µl do PRP foram adicionados em 200 µL de paraformaldeído (Sigma-Aldrich, Chicago, USA) à 1% e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, 2 ml de PBS foram adicionados, o tubo foi novamente centrifugado por 15 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados ao tubo 45 µl de PBS e 5 µl do anticorpo marcado com FITC. Os tubos foram incubados no escuro a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, 2 ml de PBS foram adicionados e os tubos centrifugados por 10 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1 ml de PBS, em seguida o material foi lido no citômetro.

As plaquetas foram então identificadas com base em seu tamanho e granulosidade, e um gate eletrônico foi desenhado em volta da sombra da plaqueta para excluir resíduos de eritrócitos e células brancas. Dez mil eventos de plaqueta foram coletados, e os valores da média da fluorescência expressos em unidades arbitrárias foram gravados. Uma amostra de um indivíduo saudável foi corrida junto com as amostras dos pacientes.

Os anticorpos utilizados foram: IgG2a-FITC/IgG1-PE, CD42a-FITC, CD42b-PE, CD41-FITC, CD61-FITC.

9. Análise da ultraestrutura plaquetária

A morfologia plaquetária do paciente (III-16) portador de anemia e de um controle saudável pertencente à mesma família (II-14) foi analisada por microscopia eletrônica. Uma pequena quantidade do PRP foi fixada por quatro horas em uma solução fixadora (2,5% de glutaraldeído e 0,1M de T-cacodilato de Sódio pH=7,2), em seguida o tubo foi centrifugado a temperatura ambiente por 10 minutos a 800g, formando um precipitado condensado de plaquetas

no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 2% de OsO_4 diluídos em 0,1M de T-cacodilato de sódio a pH 7,2, e desidratados em uma série de gradientes de etanol. O precipitado foi embebido em resina epóxi e deixado em estufa à temperatura ambiente para a resina endurecer.

Em seguida foi cortado, corado com acetato de uranila e coberto com citrato e examinado no microscópio eletrônico *Zeiss* (Oberkochen, Alemanha) (Stenberg, Barrie *et al.*, 1998; Nichols, Crispino *et al.*, 2000; Freson, Devriendt *et al.*, 2001).

Resultados

1. Avaliação molecular do gene *GATA1*

Em todos os pacientes avaliados foram feitas amplificações de cada um dos éxons codificantes para a proteína GATA-1 (Figura 7).

Não foram identificadas mutações, em nenhum dos éxons codificantes para a proteína GATA-1, nos pacientes com SMD adquirida. Entretanto, no paciente III-16 que apresenta um quadro clínico de SMD hipocelular familiar, foi identificada apenas uma mutação no último códon do éxon 2 na posição 332G>C (GI:32483408). Em razão destes achados a análise molecular foi conduzida em todos os outros indivíduos da família e a mesma mutação foi identificada em cinco pacientes adicionais (II-5, II-8, III-6, III-10, III-12). Cinco mulheres (I-1, II-9, II-13, III-11) mostraram-se heterozigotas para a mesma posição e o restante da família não apresentou nenhuma alteração genotípica (Figura 8). Os pacientes III-6 e III-10 tiveram o sangue periférico analisado antes e depois do transplante de medula óssea e verificou que antes do transplante a mesma mutação está presente. Após o transplante, como esperado, a mutação não foi identificada (Figura 9).

De acordo com os genótipos encontrados foi possível estabelecer o heredograma (Figura 10) que identifica os pacientes que apresentam a mutação, as mulheres heterozigotas clinicamente normais, os membros genotipicamente normais e aqueles que não foram analisados neste estudo.

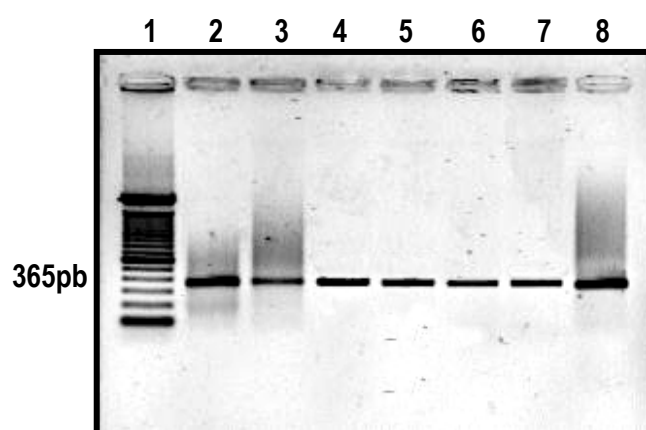


Figura 7. Gel de agarose 1,5% para a análise da amplificação do éxon 2 (365pb) do gene *GATA1* em pacientes com SMD adquirida, em pacientes da família analisada e nos controles. 1-Marcador de 100pb; 2-Paciente 1 com SMD adquirida; 3-Paciente 2 com SMD adquirida; 4-Paciente 16 com SMD adquirida; 5-Paciente familiar II-8; 6-Paciente familiar III-16; 7- Controle familiar II-13; 8-Controle família II-14.

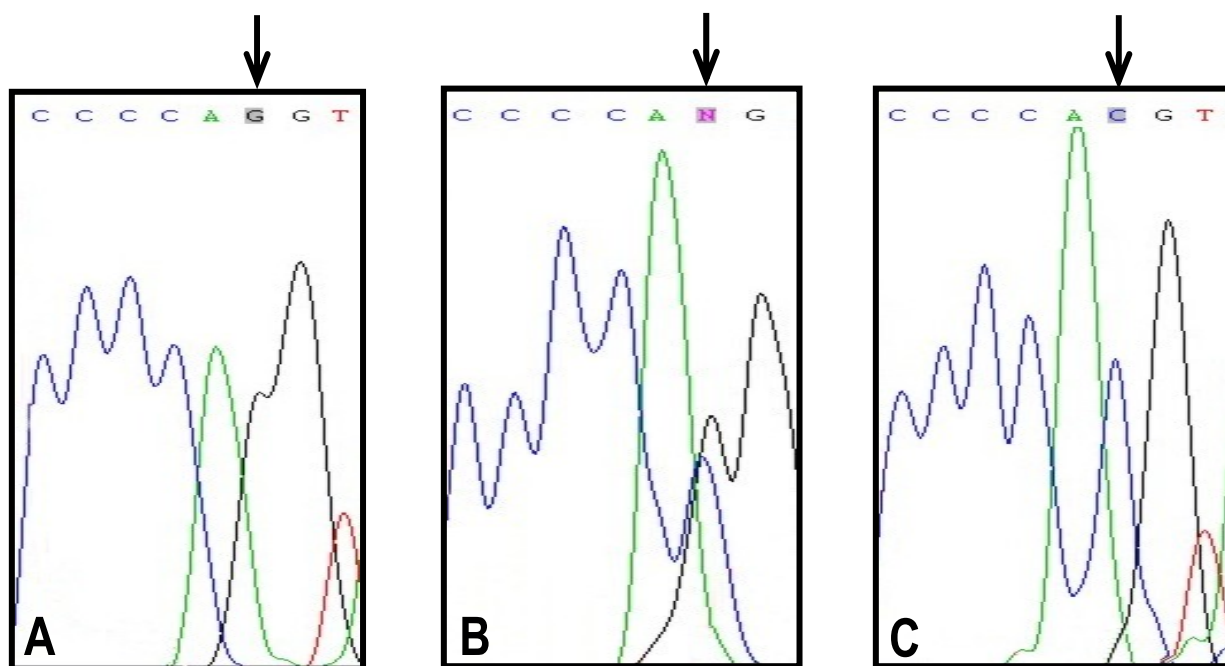


Figura 8. Eletroferogramas do seqüenciamento do éxon 2 do gene *GATA1*.

(A) Representação de indivíduo normal; a seta representa a base normal (G) na posição 332 (GI:32483408). (B) Representação da mulher heterozigótica pertencente à família analisada; a seta representa a base em heterozigose (N) na posição 332 (GI:32483408). (C) Representação do paciente com anemia e neutropenia; a seta representa a base que foi alterada (C) na posição 332 (GI:32483408)

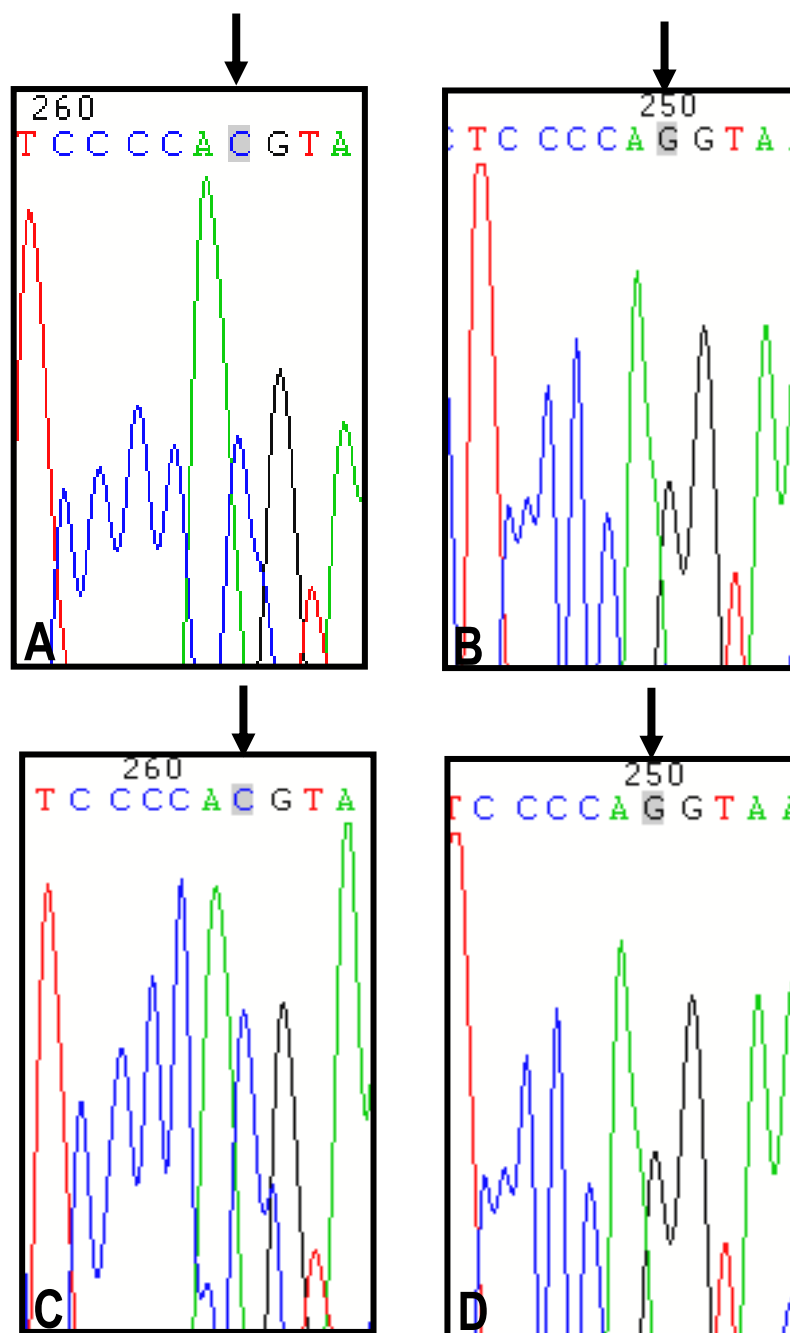


Figura 9. Eletroferogramas do seqüenciamento do éxon 2 do gene *GATA1*. (A) Eletroferograma do paciente III-6 antes do transplante de medula óssea apresentando a mutação 332 G>C. (B) Eletroferograma do paciente III-6 depois do transplante de medula óssea não apresentando a mutação 332 G>C. (C) Eletroferograma do paciente III-10 antes do transplante de medula óssea apresentando a mutação 332 G>C. (D) Eletroferograma do paciente III-10 depois do transplante de medula óssea não apresentando a mutação 332 G>C.

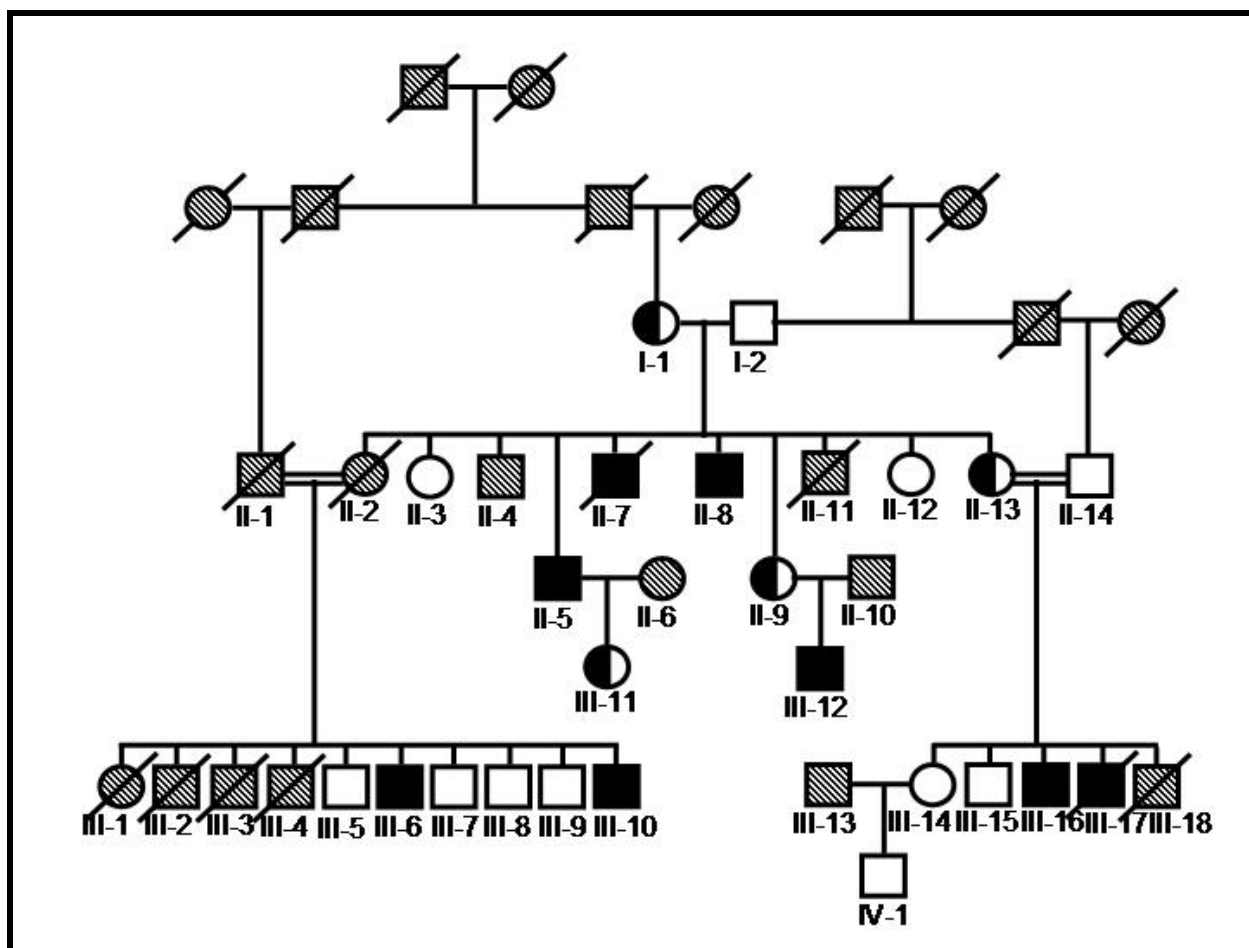


Figura 10. Heredograma da família analisada após a genotipagem. Os quadrados preenchidos representam os homens portadores de anemia e neutropenia com a mutação 332G>C. Os círculos semi-penchidos representam as mulheres heterozigotas sem alteração em seu quadro clínico. Os círculos e quadrados hachurados representam respectivamente as mulheres e homens que não foram avaliados. Os círculos e quadrados não preenchidos representam respectivamente os indivíduos normais.

2. Reação em cadeia polimerase (RT-PCR) para a detecção do mRNA GATA-1 e GATA-1s

Para verificar se a mutação 332G>C originou os mRNAs GATA-1 e GATA-1s, ou as duas isoformas, o RNA total de todos os pacientes e controles envolvidos no estudo familiar foram extraídos (Figura 11), transcritos para cDNA e submetidos à reação de RT-PCR.

O resultado do seqüenciamento dos fragmentos amplificados e purificados obtidos na reação de RT-PCR, mostra que os controles e as mulheres heterozigotas apresentaram as duas formas de mRNA (GATA-1 e GATA-1s) e que os pacientes apresentaram apenas a forma de mRNA GATA-1s (Figura 12).

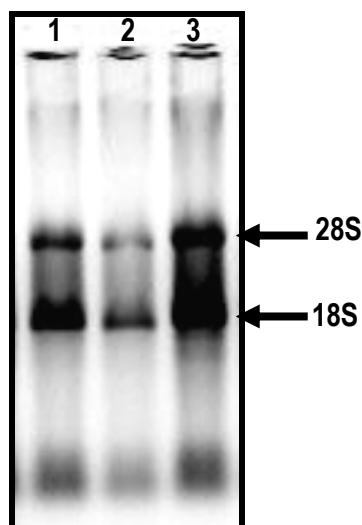


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% com formaldeído para avaliar a qualidade do RNA total. 1-Controle. 2-Mulher heterozigota. 3-Paciente hemizigótico. A seta superior indica à banda de 28S a seta inferior indica a banda de 18S do RNA total, mostrando com isso a integridade do RNA

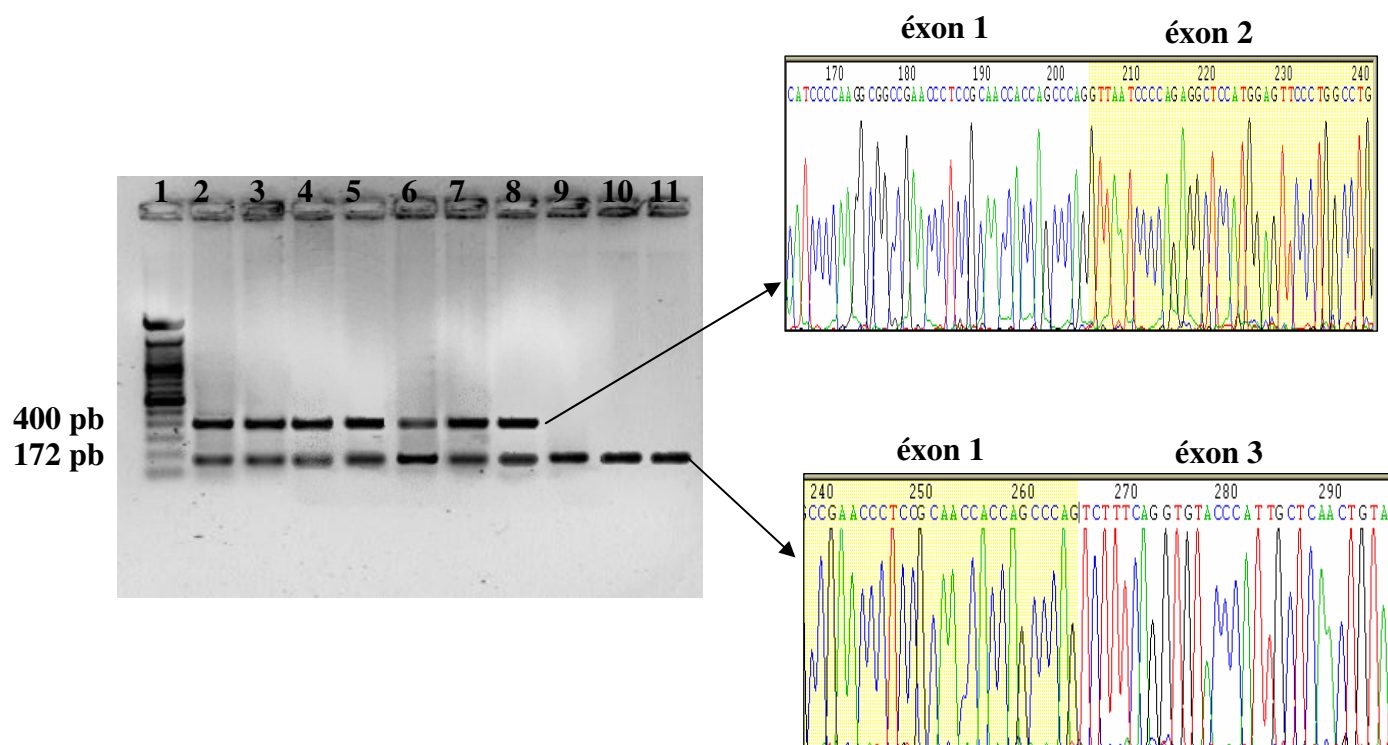


Figura 12. Formação do mRNA do GATA-1 e do GATA-1s. As bandas de 400pb e de 172pb mostram respectivamente os mRNA que dão origem as proteínas GATA-1 e GATA-1s. 1-Marcador de 100 pb; 2-Controle celular (K562); 3 to 5-Controles normais; 6 to 8-Mulheres heterozigotas; 9 to 10-Homens hemizigóticos com a mutação 332G>C. Ao lado os eletroferogramas mostrando os seqüenciamento entre os éxons 1 e éxon 2 (GATA-1) e o *splicing* alternativo entre os éxons 1 e 3 (GATA-1s).

3. Quantificação da expressão dos genes *GATA1* e *GATA1s*

A quantificação da expressão dos genes *GATA1* e *GATA1s* foram estudadas na medula óssea do paciente III-16, na medula óssea de 3 controles e na linhagem celular de K562.

A análise da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos está apresentada na Figura 13. As reações foram otimizadas para que tivessem de 95-100% de eficiência de amplificação e o coeficiente da reta entre 3,1 e 3,6. Na curva de dissociação, a *TM* corresponde à temperatura na qual se observa um pico (Figura 14). As concentrações, as eficiências, as correlações, e as temperaturas de dissociação (*TM*) dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes *GATA-1* e *GATA-1s* pelo método qRT-PCR, estão apresentados na Tabela 13. Os genes calibradores, *β -actina* e *GAPDH*, já haviam sido padronizados no Laboratório de Genética Molecular do Hemocentro da UNICAMP.

Os números de cópias dos transcritos para as amostras de K562, da medula óssea do paciente III-16 e do conjunto de medulas ósseas dos controles, foram normalizados de acordo com os dados obtidos pelo método *geNorm* para os controles endógenos, *β -actina* e *GAPDH*. Os resultados são expressos como diferença de expressão em relação à amostra referência, que é a amostra que obteve o menor valor de *Ct* (K562), conseqüentemente apresentou a maior expressão, portanto o seu valor é convencionalmente estabelecido como 1.

Portanto, podemos observar na Figura 15 que a amostra K562 apresentou os mesmos valores para a expressão dos genes *GATA1* e *GATA1s*, o paciente III-16 apresentou somente a expressão do gene *GATA1s* que foi semelhante à expressão deste mesmo gene para o controle normal.

Tabela 13. Concentrações, eficiências e temperaturas de dissociação dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes *GATA1* e *GATA1s* por qRT-PCR

Oligonucleotídeos	[] (nM)	Slope	Correlation	Efficiency ($10^{-1/\text{slope}}$)	(TM)	Amplicon
<i>β-actina</i>	150 nM	-3,300186	0,994640	100%	82°C	79 pb
<i>GAPDH</i>	300 nM	-3,302031	0,995569	100%	81°C	89 pb
<i>GATA1</i>	150 nM	-3,308477	0,997474	100%	84.5°C	124 pb
<i>GATA1s</i>	150 nM	-3,317341	0,996410	100%	84°C	95pb

[] nM = Concentração em Namomolar

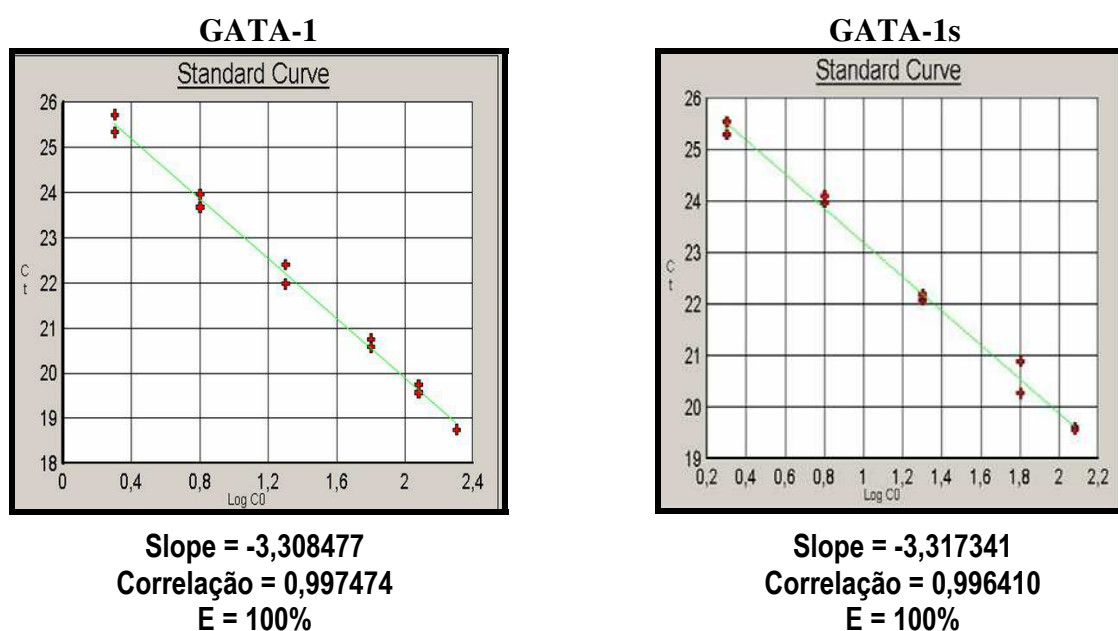


Figura 13. Gráficos das análises da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos utilizados no método da reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qRT-PCR). As reações foram otimizadas para que tivessem de 95-100% de eficiência (E) de amplificação e coeficiente da reta ou Slope entre 3,1 e 3,6. No eixo “x” encontra-se a fase exponencial (log) das concentrações de cDNA utilizadas para fazer a curva de diluição em duplicata e, no eixo “y” encontra-se o ciclo onde foi detectada fluorescência na fase exponencial (CT).

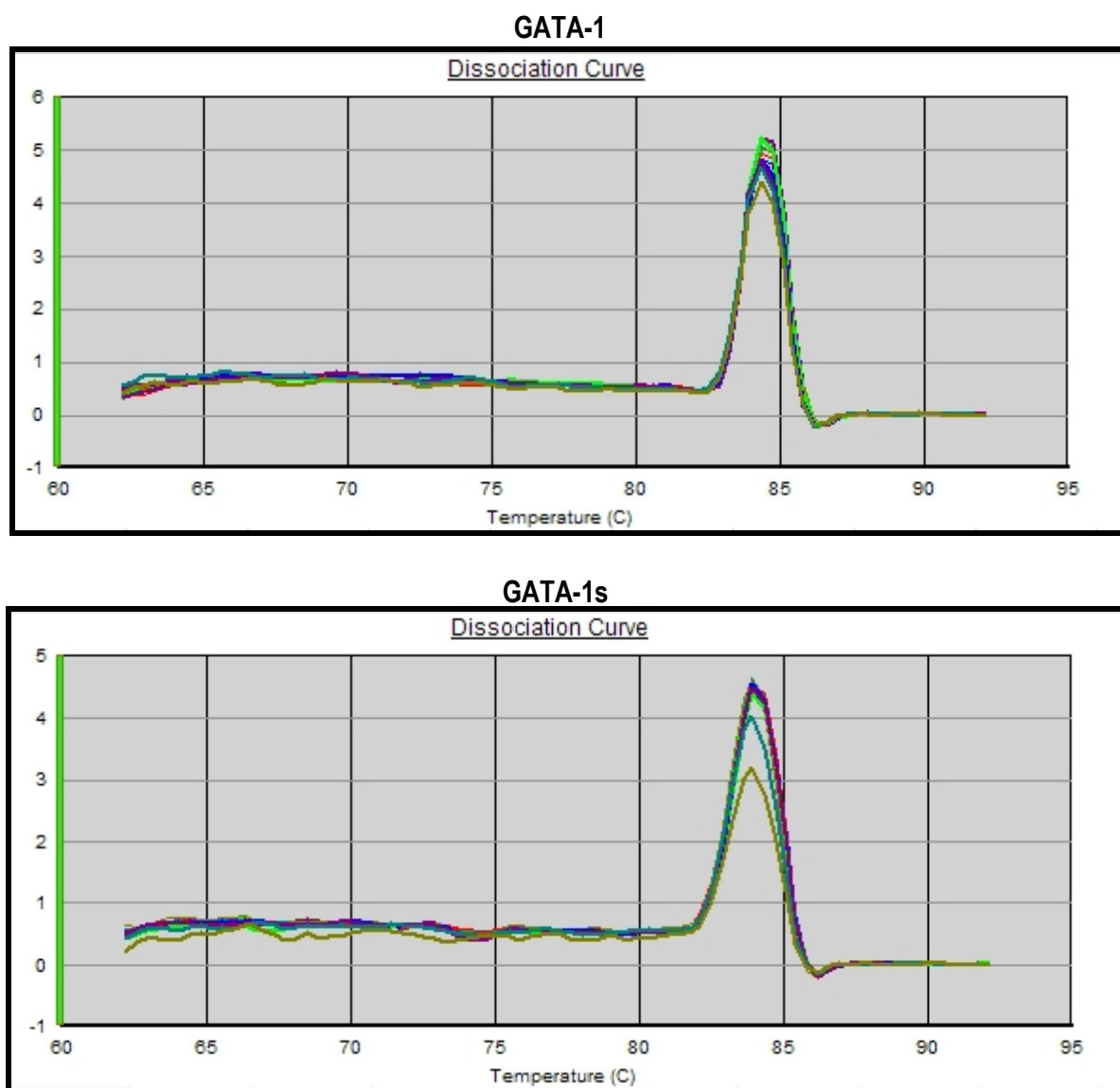


Figura 14. Gráficos das curvas de dissociação utilizada para analisar a ausência de contaminantes ou geração de produtos inespecíficos. A curva de dissociação ocorre quando em determinada temperatura, o produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) separa as fitas de DNA e ocorre a queda de fluorescência gerada pelo corante *SYBRGreen*, já que o mesmo intercala somente dupla fita de DNA. A temperatura de dissociação (T_m) é demonstrada como um pico nos gráficos. O eixo “x” representa as temperaturas, e o eixo “y”, a derivativa negativa da emissão da fluorescência.

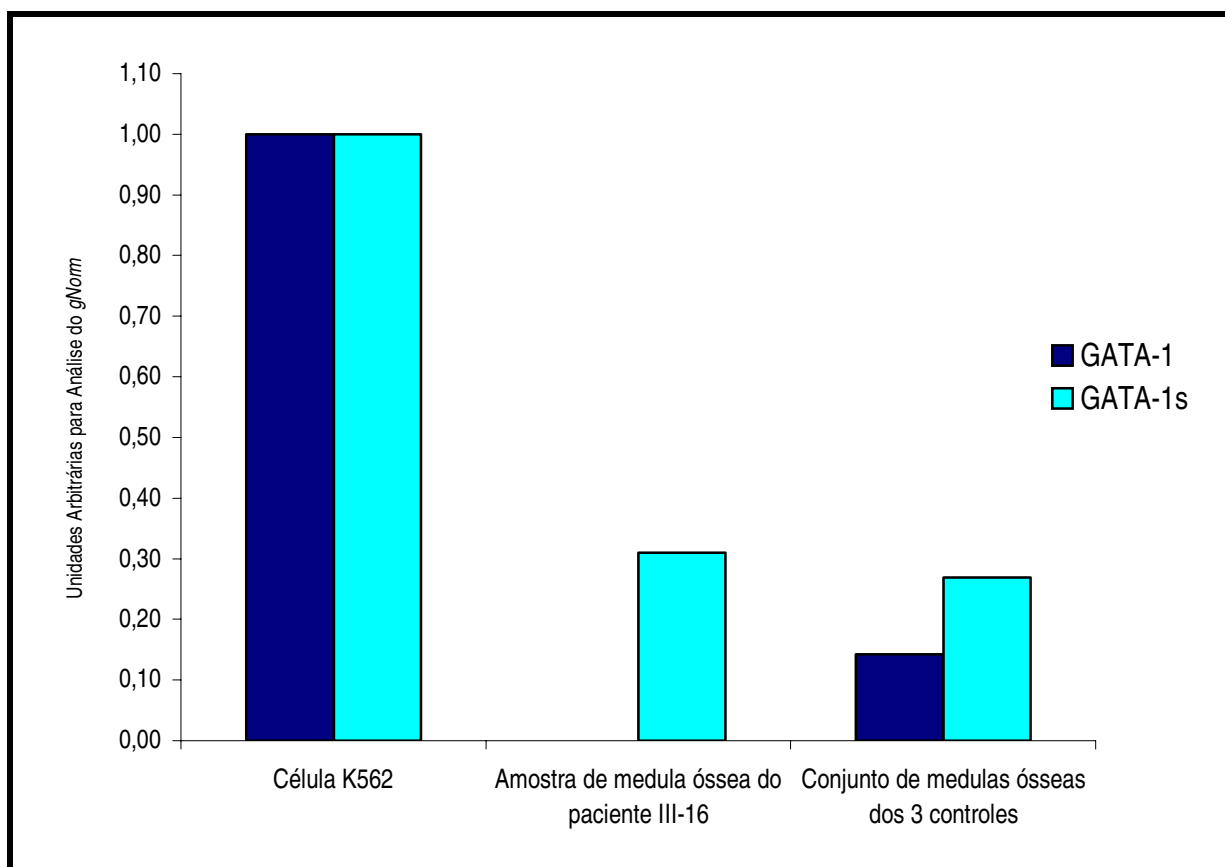


Figura 15. Gráfico com a comparação da expressão dos genes *GATA1* e *GATA1s* por qRT-PCR. A quantificação da expressão dos genes *GATA1* e *GATA1s* foram estudadas na medula óssea do paciente III-16, na medula óssea de 3 controles e na linhagem celular de K562. Os números de cópias dos transcritos para todas as amostras foram normalizados pelo método *geNorm*. Os resultados são expressos como diferença de expressão em relação à amostra de referência K562 (que obteve o menor valor de Ct, maior expressão do gene) que assumiu valor igual a 1. O eixo “y” mostra a diferença nos níveis de expressão de K562, da medula óssea do paciente III-16 e do conjunto de medulas ósseas dos 3 controles.

4. Resultado de imunohistoquímica para os pacientes familiares analisados

Os pacientes II-5, III-6, III-10, III-16 e III-17 e mais cinco controles tiveram suas biópsias de medula óssea analisadas por imunohistoquímica. Como demonstrado na Figura 16 e Figura 17, os controles apresentaram, como esperado, imunoreatividade positiva, para ambos os anticorpos indicando a presença ou de GATA-1 ou de ambas as isoformas desta proteína. Por outro lado os pacientes apresentaram imunoreatividade negativa para o anticorpo N-6, indicando ausência da proteína GATA-1.

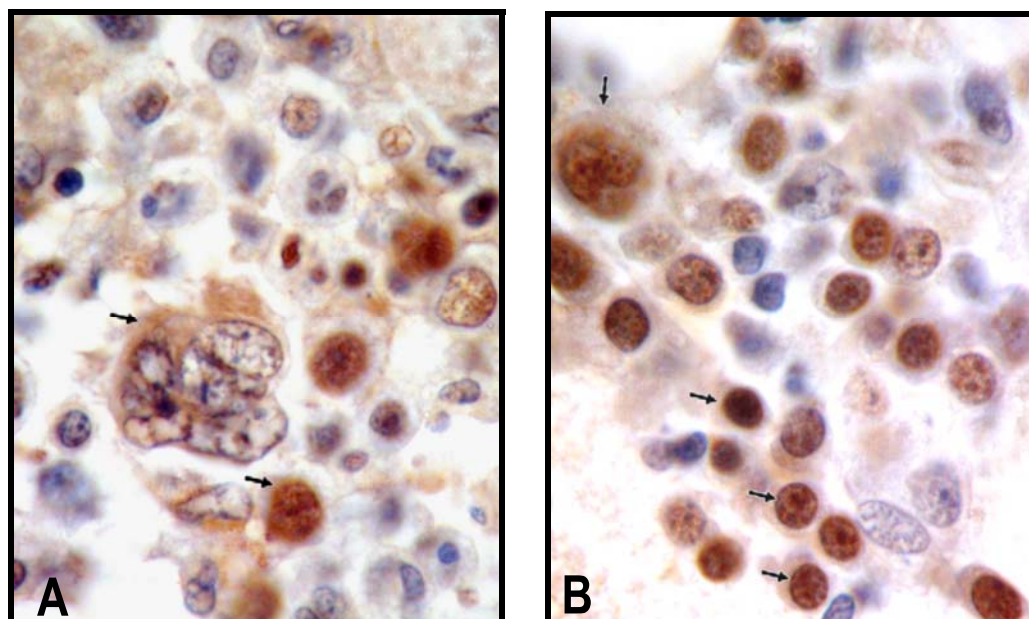


Figura 16. Estudo de imunohistoquímica para o controle (Aumento 640x). (A) Estudo de imunohistoquímica da biópsia de medula óssea do controle utilizando o anticorpo de cabra policlonal GATA-1 (C20). Este anticorpo marca o domínio dedo de zinco N-terminal que está presente tanto na proteína GATA-1 quanto na proteína GATA-1s. A positividade nuclear foi observada nos eritroblastos e megacariócitos (setas), mostrando a presença de ambas as proteínas. (B) Estudo de Imunohistoquímica da biópsia de medula óssea do controle utilizando o anticorpo monoclonal de rato GATA-1 (N6) que marca a região peptídica do domínio de transativação N-terminal que corresponde ao éxon 2, que é a região perdida pela proteína GATA-1s, sendo encontrada apenas na proteína GATA-1. A positividade nuclear foi observada em eritroblastos e megacariócitos (setas), mostrando a presença da proteína GATA-1.

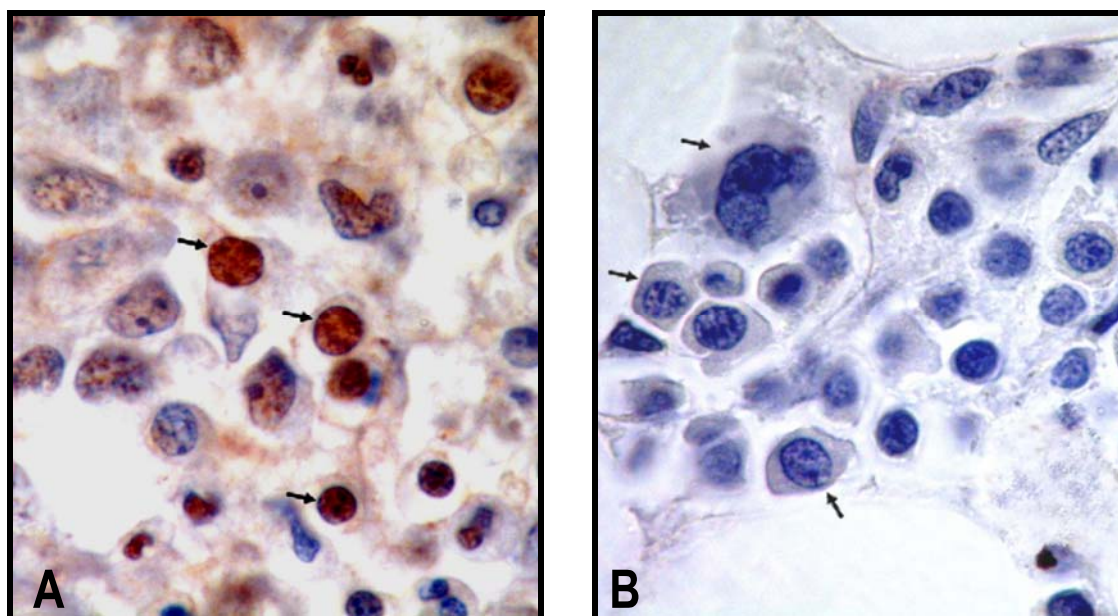


Figura 17. Estudo de imunohistoquímica para o paciente III-16 (Aumento 640x).

(A) A biópsia de medula óssea do paciente III-16 foi incubada com o anticorpo de cabra policlonal GATA-1 (C20) que identifica ambas as proteínas GATA-1 e GATA-1s. A positividade nuclear é observada nos eritroblastos. (B) A biópsia de medula óssea do paciente III-16 foi incubada com o anticorpo monoclonal de rato GATA-1 (N6) contra o domínio de transativação N-terminal. A negatividade nuclear foi observada demonstrando desta maneira que o paciente perdeu essa região, apresentando desta maneira apenas a proteína GATA-1s.

5. Análise das unidades formadoras de colônia CFU-GM.

O teste de CFU-GM para o paciente III-16 apresentou uma baixa quantidade de linhagens celulares (54 colônias/ml) quando comparadas ao controle normal, que pode variar de $0,5 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^4$ colônias/ml.

6. Análise das unidades formadoras de colônia BFU-E.

O paciente III-16 apresentou redução no número de colônias BFU-E em relação ao controle como podemos observar na Tabela 14 abaixo. Além disso, as colônias celulares de BFU-E deste paciente apresentaram redução de tamanho quando comparadas ao controle II-14 (Figura 18).

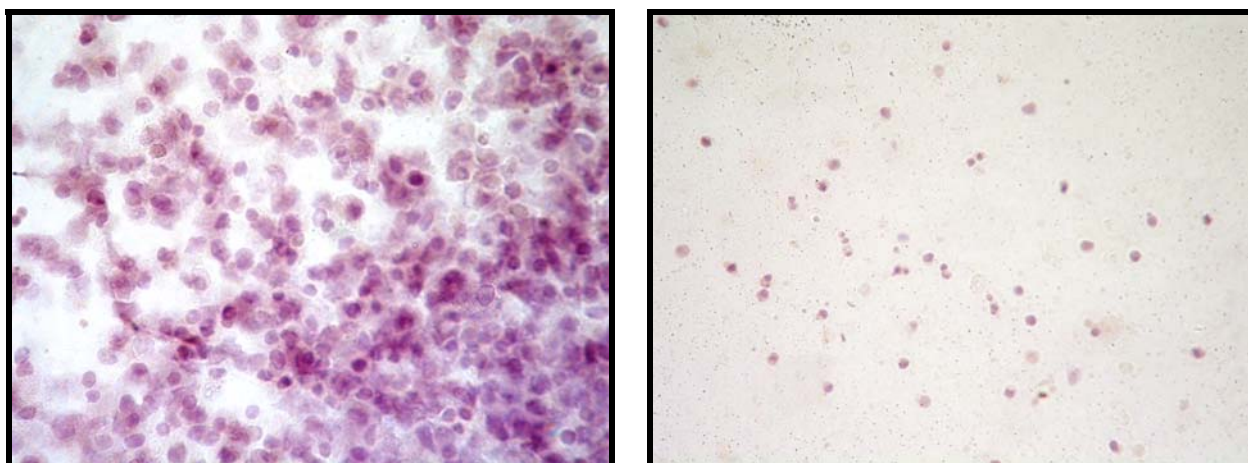


Figura 18. Células BFU-E de uma colônia com 3U de eritropoetina (Aumento 256x). (A) Controle II-14, as células da colônia ficam mais unidas e possui um maior número do que as células do paciente III-16. (B) Paciente III-16, as células além de serem de menor tamanho ficam mais dispersas dentro da colônia quando comparada ao controle II-14

Tabela 14. Número de colônias BFU-E em diferentes concentrações de eritropoetina.

Concentração de Eritropoetina	Colônias BFU-E	
	Controle (II-14) (colonias/ml)	Paciente (III-16) (colonias/ml)
1 U Epo	26	4
2 U Epo	21	6
3 U Epo	33	14
4 U Epo	16	5
5 U Epo	27	4

U = Unidade

7. Resultado dos testes de coagulação e função plaquetária

Os resultados dos testes de coagulação e da análise de função plaquetária de dois pacientes (II-8 and III-16), uma mulher heterozigota (III-13) e um homem (II-14), estão apresentados nas Tabelas 15 e 16.

O teste de sangramento de Ivy e, a atividade do fator de Von Willebrand foi normal em todos os indivíduos analisados. A mulher heterozigota (II-13), apresentou ausência de primeira e segunda onda para epinefrina 3 μ M com diminuição da agregação plaquetária para este agonista. O paciente II-8 apresentou diminuição de agregação plaquetária para os três agonistas utilizados neste estudo (adenosina difosfato, epinefrina e colágeno) com presença de primeira onda e ausência de segunda onda para adenosina difosfato e colágeno e ausência das duas ondas para epinefrina. O paciente III-16 apresentou diminuição da agregação plaquetária para adenosina difosfato e epinefrina, com presença de primeira onda e ausência de segunda onda para adenosina difosfato e ausência de primeira e segunda onda para a epinefrina.

O número absoluto de glicoproteínas plaquetárias expressando GPIX, GPIb, GPIIb, e GPIIIa, assim como o índice de fluorescência de Geomen obtidos em plaquetas de indivíduos da família em questão foram similares aos obtidos em plaquetas de controles (Tabela 16).

Tabela 15. Teste de coagulação e quantificação dos fatores da coagulação

Indivíduos (Sexo, Idade em anos)	Testes de Coagulação			Fatores de Coagulação				
	TP (INR<1,2)	TTPA (R<1,2)	TT (VR:10,6'')	vWF (40,0-232,0U/dl)	VIII (60,0-250,0%)	IX (50,0-290,0%)	XI (60,0-240,0%)	XII (60,0-150,0%)
II-8 (H, 38a)	1,2	1,6	9,1	56,02	128,6	63,0	65,5	48,2
II-13 (M, 29a)	1,0	1,0	9,4	147,74	249,1	281,6	215,6	144,6
II-14 (H, 40a)	0,97	1,1	10,0	135,02	182,4	189,8	156,8	101,6
III-16 (H, 12a)	1,10	1,6	11,4	95,90	229,0	104,2	84,4	93,8

Análise do teste de coagulação e quantificação dos fatores de coagulação para os pacientes hemizigóticos II-8 e III-16, para a mulher heterozigota II-13, e para o controle II-14. Valores normais são mostrados em parêntese, TP, tempo de trombina; TTPA, tempo de tromboplastina parcialmente ativado; TT, tempo de trombina; vWF:Ag, antígeno para o fator de von Willebrand; Fatores de Coagulação Plaquetária analisados: FVIII:C; FIX:C; FXI:C; FXII:C. H, homem; M, mulher; RNI, raio normalizado internacionalmente; R, razão

Tabela 16. Estudo da função plaquetária em indivíduos da família analisada

Indivíduos (Sexo, Idade em anos)	TS	RIPA (mg/mL)	vWF:Rcof (%)	Teste de agregação plaquetária a vários agonistas			Glicoproteínas de membrana plaquetária			
				3µM ADP (60,4%-94,2%)	3µM Epn (67,7%-91,3%)	1µg/ml Col (74,9%-89,1%)	Ibα (CD 42b)	IX (CD 42a)	IIb (CD 41)	IIIa (CD 61)
II-8 (H, 38a)	6'42" (2'15"-9'30")	0,92 (0,7-1,2)	76,2 (50,0-150,0)	41,4 1 Onda - Pres 2 Onda - Aus	11,8 1 Onda - Aus 2 Onda - Aus	39,1 1 Onda - Pres 2 Onda - Aus	166,08 (51,0-234,0)	1212,03 (679,0-1472,0)	102,70 (52,0-167,0)	1464,55 (1069,0-2492,0)
II-13 (M, 29a)	7'00" (2'15"-9'30")	0,88 (0,7-1,2)	131,1 (50,0-150,0)	80,0 1 Onda - Pres 2 Onda - Pres	16,4 1 Onda - Aus 2 Onda - Aus	88,6 1 Onda - Pres 2 Onda - Pres	233,59 (51,0-234,0)	1238,84 (679,0-1472,0)	166,49 (52,0-167,0)	1555,50 (1069,0-2492,0)
II-14 (H, 40a)	8'04" (2'15"-9'30")	0,93 (0,7-1,2)	126,2 (50,0-150,0)	74,5 1 Onda - Pres 2 Onda - Pres	93,2 1 Onda - Pres 2 Onda - Pres	86,4 1 Onda - Pres 2 Onda - Pres	111,10 (51,0-234,0)	1005,22 (679,0-1472,0)	93,94 (52,0-167,0)	1890,26 (1069,0-2492,0)
III-16 (H, 12a)	9'20" (2'15"-9'30")	0,82 (0,7-1,2)	144,79 (50,0-150,0)	45,9 1 Onda - Pres 2 Onda - Aus	10,9 1 Onda - Aus 2 Onda - Aus	76,4 1 Onda - Pres 2 Onda - Pres	132,65 (51,0-234,0)	973,42 (679,0-1472,0)	156,32 (52,0-167,0)	1099,82 (1069,0-2492,0)

Análise do estudo funcional plaquetário para os pacientes hemizigóticos II-8 e III-16, para a mulher heterozigota II-13 e para o controle II-14. Os valores normais estão marcados entre parênteses. TS, teste de Ivy para o tempo de sangramento; RIPA, agregação plaquetária induzida pela ristocetina; vWF:Rcof, atividade do cofator de ristocetina von Willebrand; Teste de agregação plaquetária a vários agonistas ADP, adenosina difosfato; Epn, epinefrina; Col, colágeno. Valores para as 1 e 2 ondas são mostrados. Pres, presente; Aus, ausente. Média da fluorescência das glicoproteínas de membrana plaquetária obtidas contra os anticorpos GPIIb/IIIa, GPIIb, GPIIb, GPIIb. H, homem; M, mulher

8. Resultado da microscopia eletrônica de plaquetas

Nas plaquetas normais os α -grânulos são numerosos e contêm dois grupos de proteínas. O primeiro grupo consiste de proteínas que são similares a proteínas hemostáticas encontradas no plasma, como o fator de von Willebrand e o fator V, que são sintetizados no megacariócito com o desenvolvimento plaquetário. Outras, como o fibrinogênio, imunoglobulinas, albumina, são absorvidas do plasma pelo megacariócito e empacotadas nos α -grânulos durante a megacariopoese. O segundo grupo inclui proteínas com uma variedade de funções. Muitas são encontradas exclusivamente nas plaquetas como o fator plaquetário 4 e a β -tromboglobulina. Também contêm um número de proteínas de adesão incluindo fibronectina, fator de von Willebrand, vitronectina e trombospondina.

Quando as plaquetas são ativadas “*in vitro*” pelos diferentes agonistas (ADP, Epi, Coll) ocorre a liberação do conteúdo dos α -grânulos. Portanto alterações em sua estrutura fazem com que os testes de agregação plaquetária apresentem valores alterados.

Os corpos densos recebem este nome porque eles parecem mais densos do que os outros grânulos em preparados de microscopia eletrônica. Esses corpos contêm mediadores da função plaquetária e hemostasia que não são proteínas: ADP, ATP e outros nucleotídeos, assim como, compostos de fosfato, íons de cálcio e serotonina.

A análise ultraestrutural da morfologia plaquetária através da técnica de microscopia eletrônica, mostrou que o paciente III-16 apresenta plaquetas com uma diminuição dos α -grânulos (Figuras 18 e 20) e corpos densos em relação ao controle normal II-14 (Figuras 19 e 21).

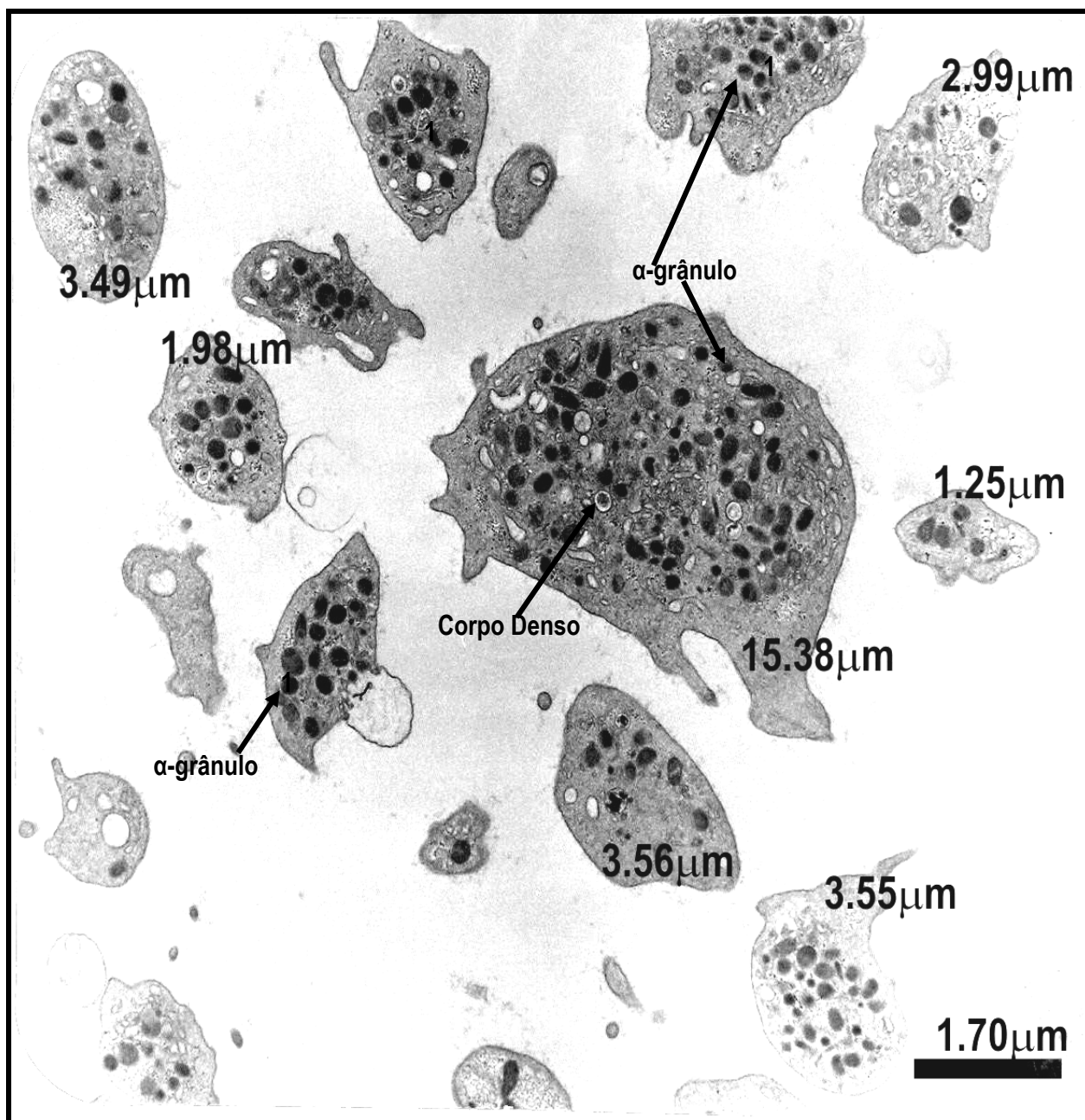


Figura 19. Microscopia eletrônica do controle II-14 (Aumento de 6000x). Os números correspondem ao tamanho da área da plaqueta.

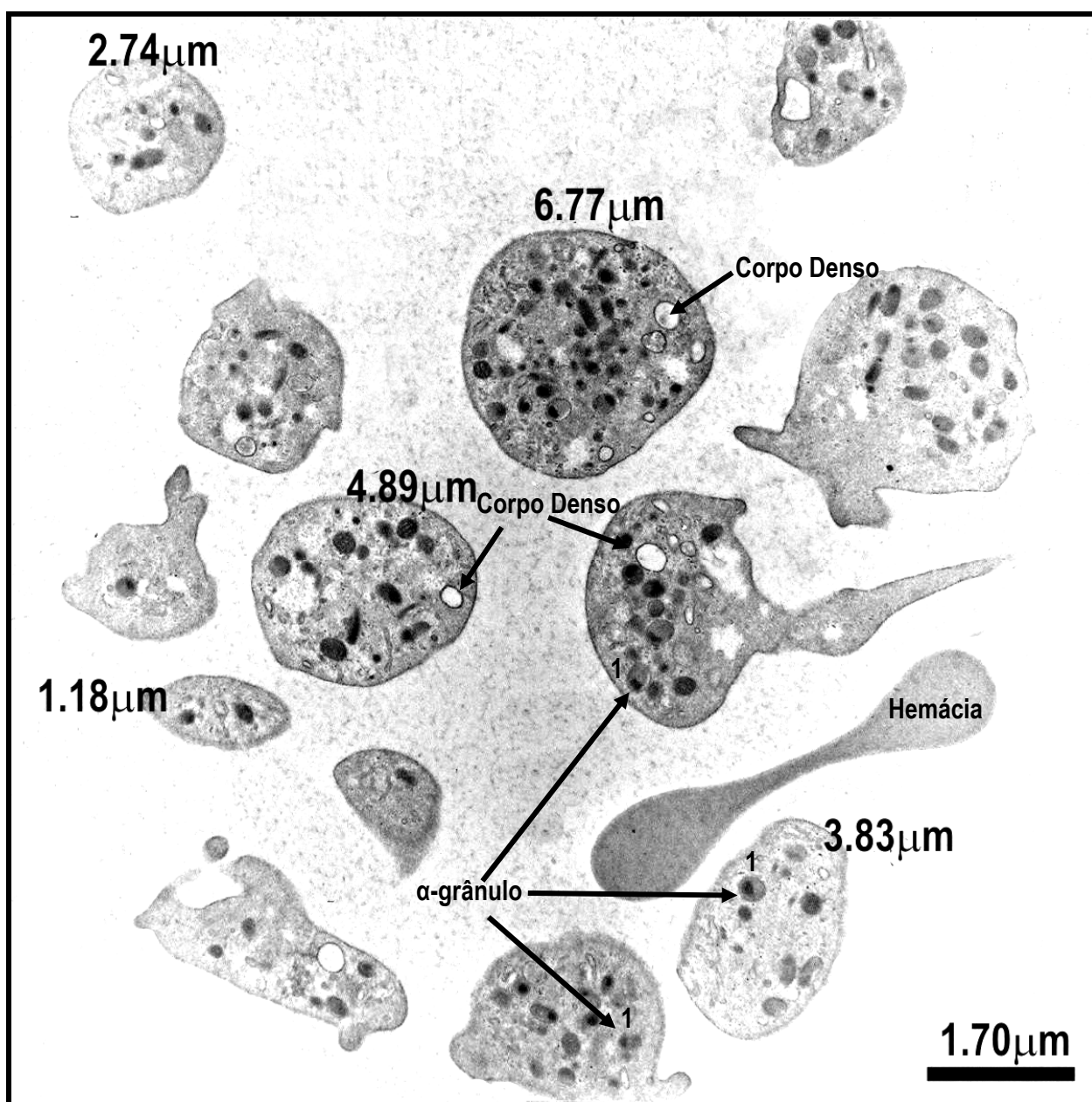


Figura 20. Microscopia eletrônica do paciente III-16 (Aumento de 6000x). Os números correspondem ao tamanho da área da plaqueta. Em relação à figura anterior note a diminuição dos grânulos dos α -grânulos. Nos α -grânulos deste paciente os grânulos estão mais concentrados na região periférica, enquanto no controle anterior eles ficam mais distribuídos por todo o grânulo ou concentrados na região periférica só que com um citoplasma mais eletrondenso (1).

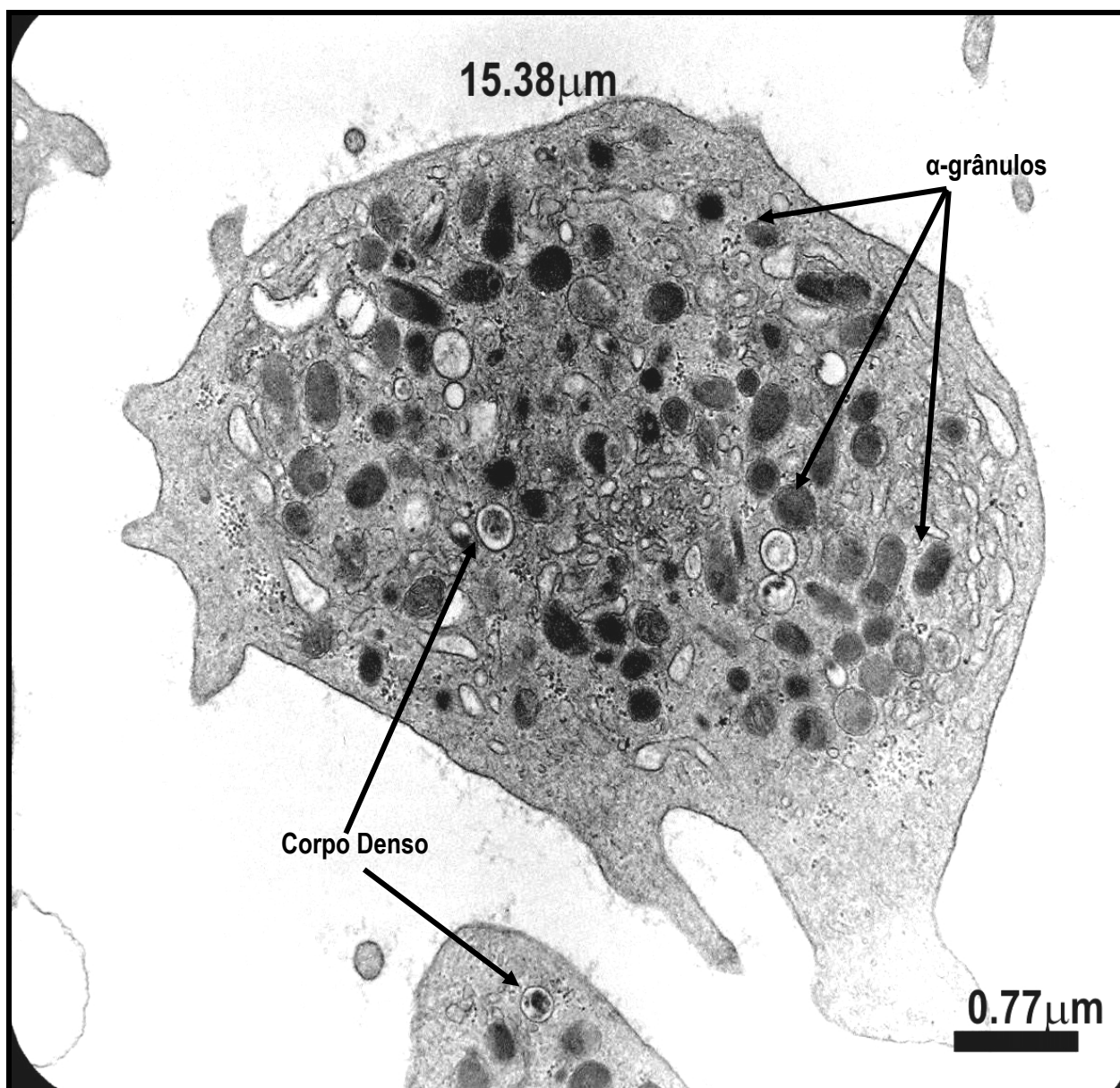


Figura 21. Microscopia eletrônica do controle II-14 (Aumento de 12930x). Os números correspondem ao tamanho da área da plaqueta.

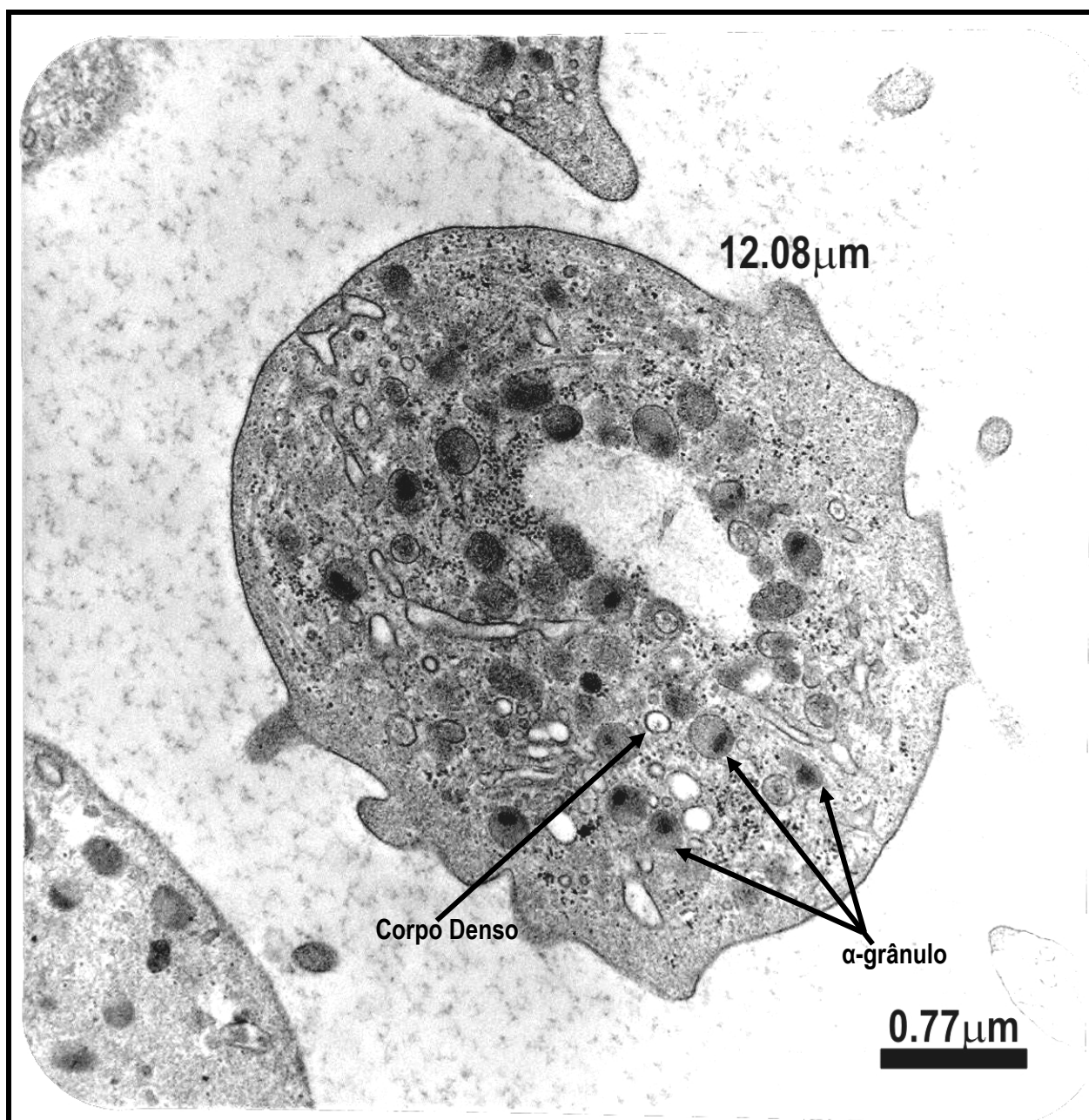


Figura 22. Microscopia eletrônica do paciente III-16 (Aumento de 12930x). Os números correspondem ao tamanho da área da plaqueta. Em relação à figura anterior note a diminuição dos grânulos dos α -grânulos. Nos α -grânulos deste paciente os grânulos estão mais concentrados na região periférica, enquanto no controle anterior eles ficam mais distribuídos por todo o grânulo ou concentrados na região periférica só que com um citoplasma mais eletrondenso.

Discussão

Neste trabalho não foram identificadas mutações no gene *GATA1* em 20 pacientes portadores de SMD. Estes dados parecem sugerir que a expressão gênica diminuída deste gene observado em uma série de pacientes com SMD (Fadilah, Cheong *et al.*, 2002) provavelmente tenha origem em outros mecanismos que não mutações nos éxons do gene *GATA1*. No entanto é importante relatar que, neste estudo não foram levadas a efeito as análises das regiões promotoras ou intrônicas do gene *GATA1*.

Por outro lado, o estudo do paciente III-16 com suspeita clínica e laboratorial de SMD possibilitou a descoberta de uma nova mutação (332G→C) no gene *GATA1*. Esta nova mutação localiza-se no último códon do éxon 2 e interfere com o mecanismo normal de “splicing”, provocando a exclusão do éxon 2 com consequente união dos éxons 1 e 3. Desta maneira, a única proteína produzida é a de menor peso molecular GATA-1s. Esta alteração é única porque foi descoberta em um paciente sem leucemia megacarioblástica aguda (AMKL) ou doença mieloproliferativa transitória (TMD) e na ausência de síndrome de Down.

Como consequência do estudo do paciente III-16 todos os membros disponíveis desta família foram analisados. Isto possibilitou a detecção dos homens II-5, II-8, III-6, III-10, III-12, III-16 e III-17 que apresentaram diferentes graus de anemia e/ou neutropenia e número plaquetas normais. Todos esses pacientes apresentaram a mesma mutação. As mulheres I-1, II-9, II-13, III-11 sem alterações clínicas foram heterozigóticos para a mutação encontrada e produziram as duas isoformas da proteína.

Todos os outros membros disponíveis da família que foram analisados eram normais dos pontos de vista clínicos e laboratoriais e não apresentaram a mutação. O cálculo de Lod Score nessa família mostra um valor igual a 2.7. Como veremos a seguir os dados obtidos a partir do estudo desta família são únicos na literatura e permitem esclarecer pontos importantes das possíveis funções das proteínas GATA-1 e GATA-1s na hematopoese.

Células hematopoéticas humanas normais expressam ambas as isoformas GATA-1 e GATA-1s (Calligaris, Bottardi *et al.*, 1995). A proteína de maior peso molecular GATA-1 contém dois domínios dedos de zinco C e N-terminal e um domínio de transativação N-terminal (Ferreira, Ohneda *et al.*, 2005). A isoforma de menor tamanho, GATA-1s, através de um mecanismo de *splicing* alternativo retém ambos os domínios dedos de zinco, mas perde o domínio de transativação N-terminal (Calligaris, Bottardi *et al.*, 1995). Camundongos expressando apenas GATA-1s a partir de um locus endógeno apresentam durante o período embrionário e fetal proliferação anormal de uma linhagem celular que regride após esta fase de desenvolvimento, sugerindo que a produção única GATA-1s é suficiente para compensar a ausência da proteína completa (Li, Godinho *et al.*, 2005).

Neste trabalho os homens hemizigóticos apresentam anemia de gravidade variável e em cinco casos neutropenia na ausência de plaquetopenia. Os pacientes III-6 e III-10 foram submetidos a transplante de medula em razão de anemia e neutropenia graves. O paciente III-16 recebe transfusões sanguíneas mensais devido à anemia e neutropenia. A gravidade clínica encontrada entre os pacientes da família avaliada provavelmente pode estar relacionada com a diferença de penetrância encontrada para este gene. Este conjunto de dados indica fortemente que a proteína GATA-1 seria essencial para a eritropoese normal e que sua ausência não é completamente compensada pela proteína GATA-1s. A consequência óbvia desses dados é que em humanos ou pelo menos nos pacientes aqui estudados o efeito observado em camundongos não se reproduz completamente (Shimizu, Takahashi *et al.*, 2001; Li, Godinho *et al.*, 2005).

As razões desta discrepância entre o modelo observado em camundongos e os dados obtidos nesta família não são inteiramente claros, mas derivaria do nível de expressão do gene GATA-1s nos dois casos. Em suporte a esta possibilidade, estudos em camundongos transgênicos mostram que níveis reduzidos de expressão de GATA-1s não são suficientes para suportar a

eritropoese normal, que, no entanto, é restaurada aos seus níveis normais quando o gene *GATA1s* é hiperexpresso (Shimizu, Takahashi *et al.*, 2001). Nossos dados indicam que a produção de GATA-1s em células da medula óssea de pacientes seria semelhante aos controles normais. Dessa forma, o conjunto de dados indica que os níveis normais ou reduzidos na expressão de GATA-1s, como parece acontecer nesta família, não seriam suficientes para que ocorra a eritropoese normal.

A diminuição dos α -grânulos encontrada nesses pacientes é semelhante àquelas observadas nas plaquetas descritas por Freson e colaboradores (Freson, Devriendt *et al.*, 2001) em pacientes com mutação no éxon 4 que interrompe a ligação da GATA-1 com o seu principal cofator FOG-1. Portanto, esses dados poderiam sugerir que de alguma maneira a perda do domínio de transativação N-terminal afetaria, embora de maneira aparentemente não fundamental, a interação entre as proteínas GATA-1 e FOG-1. Em conjunto, estas anormalidades e as alterações morfológicas observado nos megacariócitos aqui estudados, indicam que mesmo em relação à diferenciação megacariocítica a proteína GATA-1s não seria suficiente para promover a diferenciação completamente normal.

O gene *GATA1* é expresso nas células progenitoras multipotenciais, mas não em neutrófilos (Mundschau e Crispino, 2006). Vários pacientes neste estudo apresentaram neutropenia e possivelmente diminuição de CFU-GM. É possível, portanto especular que a neutropenia poderia estar relacionada à ausência da proteína GATA-1. Um possível mecanismo que provavelmente contribuiria com a neutropenia apresentada por mais de uma paciente seria a emperipoese patológica de neutrófilos no interior de megacariócitos associados com a mielofibrose em camundongos *Gata1^{low}*. A neutropenia nesses animais, com baixos níveis de GATA-1 resultam na interferência da proliferação granulocítica (Centurione, Di Baldassarre *et*

al., 2004). Outra possibilidade seria alterações na interação entre PU.1 e GATA-1 (Graf, 2002; Rhodes, Hagen *et al.*, 2005).

É importante notar que vários estudos mostraram que de 20 a 62% de todos os casos de AMKL são precedidos por síndrome mielodisplásica em crianças com síndrome de Down, e estes indivíduos, mostram características clínicas e laboratoriais que mostram certa semelhança com os pacientes aqui estudados embora estes não desenvolvam leucemia ou TMD (Zipursky, Poon *et al.*, 1992). Estes dados são consistentes com um modelo nos quais as mutações no éxon 2 do gene *GATA1* seriam insuficientes para causar TMD ou leucemia na ausência de outros eventos cooperativos, como mutações genéticas adicionais e trissomia do cromossomo 21. Mutações adquiridas no éxon 2 foram encontradas em pacientes com doença mieloproliferativa transitória (TMD) e leucemia megacarioblástica aguda (AMKL) em crianças com síndrome Down. Essas mutações interrompem a síntese da proteína de maior peso molecular, mas não interrompem a síntese da proteína de menor peso molecular ou GATA-1s exatamente como nos pacientes descritos neste trabalho. Desta forma, os mecanismos que conduziriam a AMKL ou TMD provavelmente se devem a trissomia do cromossomo 21, associada às outras mutações ainda desconhecidas.

Portanto, esta é a primeira descrição de uma mutação herdada no éxon 2 do gene *GATA1*, que dá origem à produção apenas da proteína GATA-1s. A mutação nesta família está associada com anemia e displasia trilinear nas células da medula óssea, que em conjunto sugerem que quando a proteína GATA-1s é produzida em baixos níveis ou em níveis normais, não seria suficiente para suportar a eritropoese normal.

O estudo desta família permitiu a elaboração de um novo modelo (Figura 23), proposto por Mundschau e colaboradores (Mundschau e Crispino, 2006), de interações das proteínas GATA-1 e GATA-1s em condições normais e na síndrome de Down em contraposição ao modelo descrito por Li e colaboradores (Figura 3).

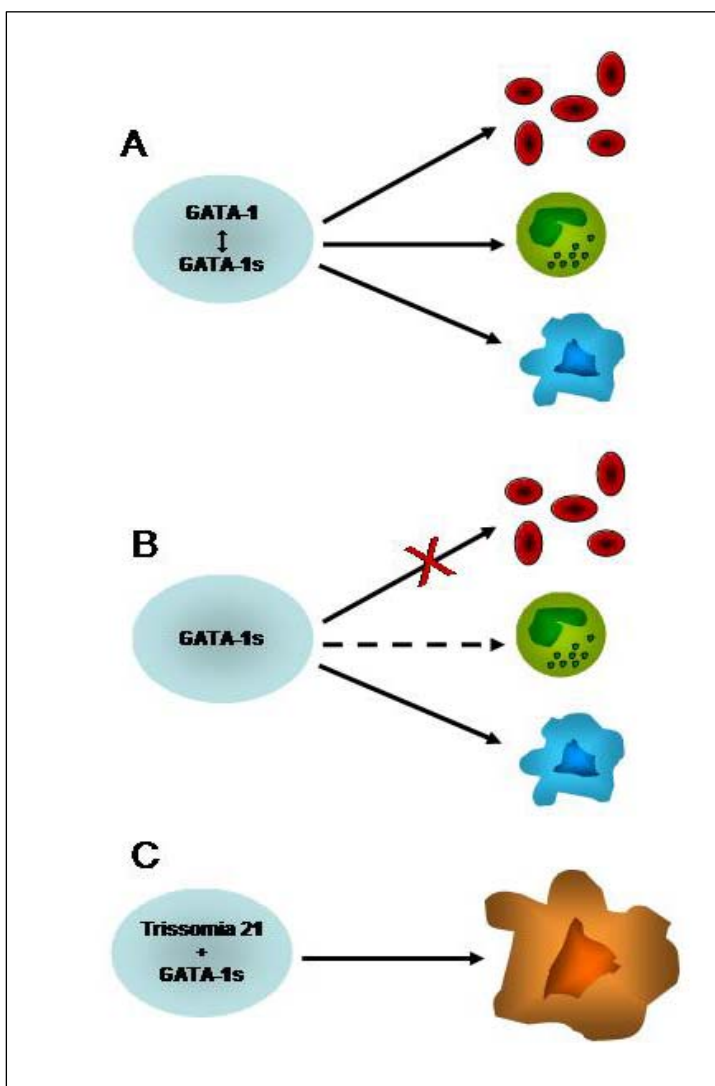


Figura 23. Modelo da função do gene *GATA1* na hematopoiese e leucemia. (A) Progenitores hematopoéticos normais expressam ambas as isoformas da proteína GATA-1 levando ao desenvolvimento de eritrócitos, granulócitos e megacariócitos. (B) Na ausência da proteína GATA-1, a proteína GATA-1s não pode suportar o desenvolvimento sanguíneo normal. Os eritrócitos são bloqueados na maturação e os megacariócitos são displásicos e hiperproliferam discretamente. Em muitos indivíduos, a granulopoese é também afetada. (C) Na ausência de GATA-1, e com o sinergismo entre GATA-1s e a trissomia do cromossomo 21, ocorre um comprometimento da linhagem megacariocítica que hiperprolifera e evolui para a via leucêmica (Mundschau e Crispino, 2006).

Conclusões

Não foram encontradas mutações no gene *GATA1* em pacientes com SMD adquirida.

Foi encontrada apenas uma mutação no éxon 2 do gene *GATA1* nos pacientes com SMD hipocelular familiar. As mulheres pertencentes a esta mesma família apresentaram a mesma mutação em heterozigose e os controles não apresentaram a mutação. Os indivíduos hemizigóticos apresentaram apenas o mRNA GATA-1s, enquanto as mulheres heterozigotas e os indivíduos controles apresentaram ambos os mRNAs (GATA-1 e GATA-1s). A expressão dos genes *GATA1* e *GATA1s* medidos através da técnica de qRT-PCR mostrou que o paciente hemizigótico apresenta apenas a expressão do gene *GATA1s* que é semelhante ao controle. Pela técnica de imunohistoquímica pudemos observar que os pacientes hemizigóticos apresentam apenas a proteína GATA-1s enquanto os controles apresentam as duas isoformas da proteína (GATA-1 e GATA-1s). Os pacientes apresentam um baixo número de colônias CFU-GM e BFU-E quando comparados ao controle, desta forma provavelmente podemos sugerir que a ausência de GATA-1 é que estaria originando este baixo número de colônias. Os pacientes apresentaram disfunção plaquetária, com baixo número de α -grânulos e corpos densos quando comparados ao controle, isto provavelmente está relacionado com a ausência da proteína GATA-1.

Este é o primeiro trabalho que descreve uma mutação herdada no éxon 2 do gene *GATA1*, que origina apenas a produção da proteína GATA-1s. A mutação nesta família está associada com anemia e displasia trilinear nas células da medula óssea. Esses dados em conjunto, sugerem que quando a proteína GATA-1s é produzida em baixos níveis ou em níveis normais, não seria suficiente para suportar a eritropoese normal.

Referências Bibliográficas

Anguita, E., Hughes, J., Heyworth, C., Blobel, G. A., Wood, W. G. e Higgs, D. R. Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *Embo J*, (2004) 23, 2841-52.

Beaudoing, E. e Gautheret, D. Identification of alternate polyadenylation sites and analysis of their tissue distribution using EST data. *Genome Res*, (2001) 11, 1520-6.

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. e Sultan, C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, (1982) 51, 189-99.

Blobel, G. A., Simon, M. C. e Orkin, S. H. Rescue of GATA-1-deficient embryonic stem cells by heterologous GATA-binding proteins. *Mol Cell Biol*, (1995) 15, 626-33.

Budde, U., Drewke, E., Mainush, K. e R, S. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*, (2002) 28, 173-190.

Caiulo, A., Nicolis, S., Bianchi, P., Zuffardi, O., Bardoni, B., Maraschio, P., Ottolenghi, S., Camerino, G. e Giglioni, B. Mapping the gene encoding the human erythroid transcriptional factor NFE1-GF1 to Xp11.23. *Hum Genet*, (1991) 86, 388-90.

Calligaris, R., Bottardi, S., Cogoi, S., Apezteguia, I. e Santoro, C. Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1995) 92, 11598-602.

Campbell, L. The Myelodysplastic Syndromes. *Leukaemia Research Foundation*, (2001), 1-20.

Cantor, A. B., Katz, S. G. e Orkin, S. H. Distinct domains of the GATA-1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. *Mol Cell Biol*, (2002) 22, 4268-79.

Cantor, A. B. e Orkin, S. H. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*, (2002) 21, 3368-76.

Centurione, L., Di Baldassarre, A., Zingariello, M., Bosco, D., Gatta, V., Rana, R. A., Langella, V., Di Virgilio, A., Vannucchi, A. M. e Migliaccio, A. R. Increased and pathologic emperipoiesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1(low) mice. *Blood*, (2004) 104, 3573-80.

Chang, A. N., Cantor, A. B., Fujiwara, Y., Lodish, M. B., Droho, S., Crispino, J. D. e Orkin, S. H. GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2002) 99, 9237-42.

Chapman, V. M., Stephenson, D. A., Mullins, L. J., Keitz, B. T., Disteche, C. e Orkin, S. H. Linkage of the erythroid transcription factor gene (Gf-1) to the proximal region of the X chromosome of mice. *Genomics*, (1991) 9, 309-13.

Croizat, H., Billett, H. H. e Nagel, R. L. Heterogeneity in the properties of burst-forming units of erythroid lineage in sickle cell anemia: DNA synthesis and burst-promoting activity production is related to peripheral hemoglobin F levels. *Blood*, (1990) 75, 1006-10.

Crotta, S., Nicolis, S., Ronchi, A., Ottolenghi, S., Ruzzi, L., Shimada, Y., Migliaccio, A. R. e Migliaccio, G. Progressive inactivation of the expression of an erythroid transcriptional factor in GM- and G-CSF-dependent myeloid cell lines. *Nucleic Acids Res*, (1990) 18, 6863-9.

Down, T. A. e Hubbard, T. J. Computational detection and location of transcription start sites in mammalian genomic DNA. *Genome Res*, (2002) 12, 458-61.

Elefanty, A. G., Antoniou, M., Custodio, N., Carmo-Fonseca, M. e Grosveld, F. G. GATA transcription factors associate with a novel class of nuclear bodies in erythroblasts and megakaryocytes. *Embo J*, (1996) 15, 319-33.

Evans, T. e Felsenfeld, G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*, (1989) 58, 877-85.

Evans, T., Reitman, M. e Felsenfeld, G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1988) 85, 5976-80.

Fadilah, S. A., Cheong, S. K., Roslan, H., Rozie-Hanisa, M. e Yen, G. K. GATA-1 and GATA-2 gene expression is related to the severity of dysplasia in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, (2002) 16, 1563-5.

Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. e Philipsen, S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*, (2005) 25, 1215-27.

Freson, K., Devriendt, K., Matthijs, G., Van Hoof, A., De Vos, R., Thys, C., Minner, K., Hoylaerts, M. F., Vermynen, J. e Van Geet, C. Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood*, (2001) 98, 85-92.

Freson, K., Matthijs, G., Thys, C., Marien, P., Hoylaerts, M. F., Vermynen, J. e Van Geet, C. Different substitutions at residue D218 of the X-linked transcription factor GATA1 lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation. *Hum Mol Genet*, (2002) 11, 147-52.

Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C. e Orkin, S. H. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1996) 93, 12355-8.

Galloway, J. L., Wingert, R. A., Thisse, C., Thisse, B. e Zon, L. I. Loss of gata1 but not gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos. *Dev Cell*, (2005) 8, 109-16.

Gao, R., Wu, C. e Chong, B. H. [The intracellular signaling pathway initiated by ginsenosides in hematopoietic cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, (1999) 20, 292-5.

Gawaz, M. e Ward, R. Effects of hemodialysis on platelet-derived thrombospondin. *Kid Inter.*, (1991) 40.

Graf, T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*, (2002) 99, 3089-101.

Graveley, B. R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.*, (2001) 17, 100-7.

Greene, M. E., Mundschau, G., Wechsler, J., Mcdevitt, M., Gamis, A., Karp, J., Gurbuxani, S., Arceci, R. e Crispino, J. D. Mutations in GATA1 in both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood Cells Mol Dis*, (2003) 31, 351-6.

Groet, J., Mcelwaine, S., Spinelli, M., Rinaldi, A., Burtcher, I., Mulligan, C., Mensah, A., Cavani, S., Dagna-Bicarelli, F., Basso, G., Cotter, F. E. e Nizetic, D. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet*, (2003) 361, 1617-20.

Gurbuxani, S., Vyas, P. e Crispino, J. D. Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*, (2004) 103, 399-406.

Harigae, H., Xu, G., Sugawara, T., Ishikawa, I., Toki, T. e Ito, E. The GATA1 mutation in an adult patient with acute megakaryoblastic leukemia not accompanying Down syndrome. *Blood*, (2004) 103, 3242-3.

Heaney, M. L. e Golde, D. W. Myelodysplasia. *N Engl J Med*, (1999) 340, 1649-60.

Hitzler, J. K., Cheung, J., Li, Y., Scherer, S. W. e Zipursky, A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*, (2003) 101, 4301-4.

Hofmann, W. K., De Vos, S., Komor, M., Hoelzer, D., Wachsman, W. e Koeffler, H. P. Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood*, (2002) 100, 3553-60.

Hofmann, W. K. e Koeffler, H. P. Myelodysplastic syndrome. *Annu Rev Med*, (2005) 56, 1-16.

Keegan, L. P., Gallo, A. e O'connell, M. A. The many roles of an RNA editor. *Nat Rev Genet*, (2001) 2, 869-78.

Koschmieder, S., Rosenbauer, F., Steidl, U., Owens, B. M. e Tenen, D. G. Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia. *Int J Hematol*, (2005) 81, 368-77.

Kowalski, K., Czolij, R., King, G. F., Crossley, M. e Mackay, J. P. The solution structure of the N-terminal zinc finger of GATA-1 reveals a specific binding face for the transcriptional co-factor FOG. *J Biomol NMR*, (1999) 13, 249-62.

Krawczak, M., Reiss, J. e Cooper, D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*, (1992) 90, 41-54.

Lavoie, H. A. The role of GATA in mammalian reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)*, (2003) 228, 1282-90.

Lee, C., Atanelov, L., Modrek, B. e Xing, Y. ASAP: the Alternative Splicing Annotation Project. *Nucleic Acids Res*, (2003) 31, 101-5.

Leonard, M., Brice, M., Engel, J. D. e Papayannopoulou, T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood*, (1993) 82, 1071-9.

Letting, D. L., Chen, Y. Y., Rakowski, C., Reedy, S. e Blobel, G. A. Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2004) 101, 476-81.

- Li, Z., Godinho, F. J., Klusmann, J. H., Garriga-Canut, M., Yu, C. e Orkin, S. H. Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet*, (2005) 37, 613-9.
- Lorand-Metze, I. Síndromes Mielodisplásicas. Conceito e Classificação. Diagnóstico. Evolução e Complicações. Tratamento. In: M. A. Zago, R. P. Falcão e R. Pasquini (Ed.). Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Editora Atheneu, v.1, 2005. Síndromes Mielodisplásicas. Conceito e Classificação. Diagnóstico. Evolução e Complicações. Tratamento., p.519-536
- Lowry, J. A. e Atchley, W. R. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol*, (2000) 50, 103-15.
- Lowry, J. A. e Mackay, J. P. GATA-1: one protein, many partners. *Int J Biochem Cell Biol*, (2006) 38, 6-11.
- Martin, D. I., Zon, L. I., Mutter, G. e Orkin, S. H. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*, (1990) 344, 444-7.
- Mckenzie, S. B. Clinical Laboratory Hematology. New Jersey: Alexander, J. L., v.1. 2004. 967 p. (Myelodysplastic Syndromes)
- Mehaffey, M. G., Newton, A. L., Gandhi, M. J., Crossley, M. e Drachman, J. G. X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. *Blood*, (2001) 98, 2681-8.
- Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K. e Mano, H. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood*, (2001) 98, 422-7.
- Modrek, B., Resch, A., Grasso, C. e Lee, C. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res*, (2001) 29, 2850-9.
-

Mouthon, M. A., Bernard, O., Mitjavila, M. T., Romeo, P. H., Vainchenker, W. e Mathieu-Mahul, D. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood*, (1993) 81, 647-55.

Mundschau, G. e Crispino, J. GATA1s goes germline. *Nat Genet*, (2006) 38, 741-2.

Mundschau, G., Gurbuxani, S., Gamis, A. S., Greene, M. E., Arceci, R. J. e Crispino, J. D. Mutagenesis of GATA1 is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. *Blood*, (2003) 101, 4298-300.

Newton, A., Mackay, J. e Crossley, M. The N-terminal zinc finger of the erythroid transcription factor GATA-1 binds GATC motifs in DNA. *J Biol Chem*, (2001) 276, 35794-801.

Nichols, K. E., Crispino, J. D., Poncz, M., White, J. G., Orkin, S. H., Maris, J. M. e Weiss, M. J. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*, (2000) 24, 266-70.

Olney, H. J. e Le Beau, M. M. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol*, (2001) 14, 479-95.

Orkin, S. H. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*, (1992) 80, 575-81.

Pal, S., Cantor, A. B., Johnson, K. D., Moran, T. B., Boyer, M. E., Orkin, S. H. e Bresnick, E. H. Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2004) 101, 980-5.

Parker, J. e Mufti, G. J. Ras and myelodysplasia: lessons from the last decade. *Semin Hematol*, (1996) 33, 206-24.

Pedrazzoli, P., Noris, P., Perotti, C., Schiavo, R., Ponchio, L., Belletti, S. e Al., E. Transfusion of platelet concentrates cryopreserved with thrombosol plus low-dose dimethylsulphoxide in patients with severe thrombocytopenia: a pilot study. *Br. Jour. Haemathol*, (2000) 108, 653-659.

Rainis, L., Bercovich, D., Strehl, S., Teigler-Schlegel, A., Stark, B., Trka, J., Amariglio, N., Biondi, A., Muler, I., Rechavi, G., Kempinski, H., Haas, O. A. e Izraeli, S. Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood*, (2003) 102, 981-6.

Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T. X., Look, A. T. e Kanki, J. P. Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell*, (2005) 8, 97-108.

Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R. P., Metcalf, D. e Begley, C. G. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1995) 92, 7075-9.

Secco, P., Cotella, D. e Santoro, C. Selection of peptides with affinity for the N-terminal domain of GATA-1: Identification of a potential interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun*, (2003) 305, 1061-6.

Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J. D. e Yamamoto, M. In vivo requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. *Embo J*, (2001) 20, 5250-60.

Shivdasani, R. A., Fujiwara, Y., Mcdevitt, M. A. e Orkin, S. H. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *Embo J*, (1997) 16, 3965-73.

Sposi, N. M., Zon, L. I., Care, A., Valtieri, M., Testa, U., Gabbianelli, M., Mariani, G., Bottero, L., Mather, C., Orkin, S. H. e Et Al. Cell cycle-dependent initiation and lineage-dependent

abrogation of GATA-1 expression in pure differentiating hematopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1992) 89, 6353-7.

Stenberg, P. E., Barrie, R. J., Pestina, T. I., Steward, S. A., Arnold, J. T., Murti, A. K., Hutson, N. K. e Jackson, C. W. Prolonged bleeding time with defective platelet filopodia formation in the Wistar Furth rat. *Blood*, (1998) 91, 1599-608.

Ueda, M., Ota, J., Yamashita, Y., Choi, Y. L., Ohki, R., Wada, T., Koinuma, K., Kano, Y., Ozawa, K. e Mano, H. DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, (2003) 123, 288-96.

Vandesompele, J., De Paepe, A. e Speleman, F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem*, (2002) 303, 95-8.

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

Visvader, J. E., Crossley, M., Hill, J., Orkin, S. H. e Adams, J. M. The C-terminal zinc finger of GATA-1 or GATA-2 is sufficient to induce megakaryocytic differentiation of an early myeloid cell line. *Mol Cell Biol*, (1995) 15, 634-41.

Wall, L., Deboer, E. e Grosveld, F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev*, (1988) 2, 1089-100.

Wechsler, J., Greene, M., Mcdevitt, M. A., Anastasi, J., Karp, J. E., Le Beau, M. M. e Crispino, J. D. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*, (2002) 32, 148-52.

Weiss, M. J., Yu, C. e Orkin, S. H. Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol*, (1997) 17, 1642-51.

Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J. D. e Yamamoto, M. Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development*, (1994) 120, 1759-66.

Yu, C., Niakan, K. K., Matsushita, M., Stamatoyannopoulos, G., Orkin, S. H. e Raskind, W. H. X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*, (2002) 100, 2040-5.

Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K. A., Mueller, B. U., Narravula, S., Torbett, B. E., Orkin, S. H. e Tenen, D. G. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood*, (2000) 96, 2641-8.

Zipursky, A., Poon, A. e Doyle, J. Leukemia in Down syndrome: a review. *Pediatr Hematol Oncol*, (1992) 9, 139-49.

Zon, L. I., Gurish, M. F., Stevens, R. L., Mather, C., Reynolds, D. S., Austen, K. F. e Orkin, S. H. GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene. *J Biol Chem*, (1991) 266, 22948-53.

Zon, L. I., Yamaguchi, Y., Yee, K., Albee, E. A., Kimura, A., Bennett, J. C., Orkin, S. H. e Ackerman, S. J. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*, (1993) 81, 3234-41.

Apêndices

O artigo referente a esta tese intitulado “*An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis*” foi publicado na revista *Nature Genetics* em **julho** de **2006**, no Volume **38**, Issue: **7**, páginas **807-812**.

Abstract: Acquired somatic mutations in exon 2 of the hematopoietic transcription factor GATA-1 have been found in individuals with Down syndrome with both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia. These mutations prevent the synthesis of the full-length protein but allow the synthesis of its short isoform, GATA-1s. Experiments in mice suggest that GATA-1s supports normal adult megakaryopoiesis, platelet formation and erythropoiesis. Here we report a mutation, 332G --> C, in exon 2 of GATA1, leading to the synthesis of only the short isoform in seven affected males from two generations of a family. Hematological profiles of affected males demonstrate macrocytic anemia, normal platelet counts and neutropenia in most cases. Altogether, data suggest that GATA-1s alone, produced in low or normal levels, is not sufficient to support normal erythropoiesis. Moreover, this is the first study to indicate that a germline splicing mutation does not lead to leukemia in the absence of other cooperating events, such as Down syndrome.



Anexo 1



Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido de pacientes para a participação no projeto de estudo intitulado

“FUNÇÕES DO GENE *GATA1*: CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO DE MUTAÇÕES EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS”

Nome do paciente

Idade:..... anos **RG:** **HC:**.....

Endereço:.....

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

RG:..... **Grau de Parentesco:**.....

Endereço:.....

Estou ciente de que para realizar o diagnóstico da minha doença necessito ser submetido à retirada de sangue periférico. Este procedimento é realizado por meio de punção venosa por agulha em um dos braços, quando forem colhidos os exames de rotina do Hemocentro, não havendo necessidade de punções adicionais. Trata-se de um procedimento de rápida duração, cujo único efeito indesejável a ser considerado é a dor no local de punção e hematoma. Estou ciente que parte da amostra de sangue, colhida para o diagnóstico da minha doença, será utilizada para a avaliação do gene da proteína GATA-1. Estou ciente de que para realizar o diagnóstico da minha doença necessito ser submetido à punção de medula óssea. Este procedimento é realizado por meio de punção por agulha no osso esterno ou em osso da bacia. Trata-se de um procedimento de rápida duração (cerca de 5 minutos), cujo único efeito indesejável a ser considerado é a dor no local de punção, que é tratada com analgésicos comuns. Estou ciente que

parte da amostra de medula óssea, colhida para o diagnóstico da minha doença, será utilizada para a avaliação dos principais genes envolvidos na minha doença. Desta forma, estarei participando do estudo intitulado **“FUNÇÕES DO GENE *GATA1*: CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO DE MUTAÇÕES EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS”**. Estou ciente de que o material biológico (DNA e RNA) obtido será armazenado a -80°C e que só será utilizado para futuros estudos frente à aprovação de um novo projeto pelo CEP/FCM/UNICAMP. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver quaisquer dúvidas sobre o estudo poderei procurar a Dr. Fernando Ferreira Costa no Hemocentro da UNICAMP, a Rua Carlos Chagas no. 480, Campus da Cidade Universitária. CEP: 13081-970; Tel: 3788 8729 e 3788 8613; Fax: 3788 8600.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel: 3788 8936; Fax: 3788 8925.

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

.....
Assinatura do paciente

.....
Assinatura do responsável legal

.....
Assinatura do pesquisador legal

Dr. Fernando Ferreira Costa

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

Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido dos indivíduos controle, para participação no projeto de estudo intitulado

“FUNÇÕES DO GENE *GATA1*: CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO DE MUTAÇÕES EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS”

Nome:

RG: **Idade:** anos

Endereço residencial:

.....

Endereço comercial:

.....

Estou ciente de que para fazer exames sanguíneos, necessito ser submetido à punção sanguínea. Estou ciente que este procedimento é realizado por meio de punção venosa por agulha em um dos braços, quando forem colhidos os exames de rotina do Hemocentro, não havendo necessidade de punções adicionais. Trata-se de um procedimento de rápida duração, cujo único efeito indesejável a ser considerado é a dor no local de punção e hematoma. Desta forma, estarei participando do estudo intitulado **“FUNÇÕES DO GENE *GATA1*: CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO DE MUTAÇÕES EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS”**. Estou ciente de que o material biológico (DNA e RNA) obtido será armazenado a -80°C e que só será utilizado para futuros estudos frente à aprovação de um novo projeto pelo CEP/FCM/UNICAMP. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei

ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver quaisquer dúvidas sobre o estudo poderei procurar a Dr. Fernando Ferreira Costa no Hemocentro da UNICAMP, a rua Carlos Chagas no. 480, Campus da Cidade Universitária. CEP: 13081-970; Tel: 3788 8729 e 3788 8613; Fax: 3788 8600.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel: 3788 8936; Fax: 3788 8925.

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

.....
Assinatura do controle

.....
Assinatura do responsável legal

.....
Assinatura do pesquisador legal

Dr. Fernando Ferreira Costa

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