



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

INGRID GRAZIELLE SOUSA

GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS APÓS A INDUÇÃO DA
HEMOGLOBINA FETAL PELA DECITABINA

CAMPINAS

2023

INGRID GRAZIELLE SOUSA

GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS APÓS A INDUÇÃO DA
HEMOGLOBINA FETAL PELA DECITABINA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em Ciências.

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA INGRID GRAZIELLE SOUSA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

So85g Sousa, Ingrid Grazielle, 1992-
Genes diferencialmente expressos após a indução da hemoglobina fetal pela decitabina / Ingrid Grazielle Sousa. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

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

1. Hemoglobina fetal. 2. Doença falciforme. 3. Edição de genes. 4. Sistemas CRISPR-Cas. 5. Fator 4 nuclear de hepatócito. I. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Genes differentially expressed after induction of fetal hemoglobin by decitabine

Palavras-chave em inglês:

Fetal hemoglobin

Sickle cell anemia

Gene editing

CRISPR-Cas systems

Hepatocyte nuclear factor 4

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Fernando Ferreira Costa [Orientador]

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Barbara da Costa Reis Monte Mor

Glaucia Elisete Barbosa Marcon

Magnun Nueldo Nunes dos Santos

Data de defesa: 29-11-2023

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5887-8228>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6544212134462208>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

INGRID GRAZIELLE SOUSA

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA**
- 2. PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO**
- 3. PROFA. DRA. BARBARA DA COSTA REIS MONTE MOR**
- 4. PROFA. DRA. GLAUCIA ELISETE BARBOSA MARCON**
- 5. PROF. DR. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS**

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 29/11/2023

À minha querida, Laura, obrigada por ter transformado os meus dias, você é e sempre será o meu melhor resultado.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Fernando Ferreira Costa, pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

À Dra. Dulcinéia Albuquerque, Dra. Carolina Lanaro e Dra. Priscila Martin pelo suporte técnico durante a execução dessa pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento dessa pesquisa (Código de Financiamento 001).

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento técnico desse trabalho (processo nº 2014/00984-3 e 2019/18886-1).

Às minhas queridas amigas cientistas: Dra. Marina Borges, Dra. Cristiane Souza, Dra. Flávia Peixoto e Ms. Daniela Leonardo. Ao meu “segundo” laboratório: Dra. Flávia Leonardo, Dra. Erika Gotardo, Dra. Lediane Teles, Dra. Hanan Chweih e Ms. Pâmela Lara. Vocês foram meu suporte e uma das minhas grandes alegrias e, talvez, sejam meu segundo melhor resultado, obrigada por momentos compartilhados. Adicionalmente, minhas inspirações acadêmicas: Dra. Nicola Coran e Dra. Renata Costi.

Aos meus professores (do ensino básico até a pós-graduação) que me guiaram ao longo da vida acadêmica, foram fontes de inspiração e despertaram em mim o desejo de sempre buscar conhecimento.

À Jackson Carvalho, não existe separação pessoal da acadêmica, elas estão entrelaçadas, sem ele, seria pouco provável que eu tivesse trilhado minha vida acadêmica em São Paulo, na UNICAMP. Obrigada pelo apoio e incentivo constante.

À minha mãe, Eufrosina Sousa, que sempre acreditou no poder da educação, e se esforçou descomunalmente para que eu tivesse a oportunidade de estudar.

À minha irmã, Adrienne Sousa, por todo incentivo e apoio, e por ser a pessoa que mais se orgulha de mim.

Às minhas amigas, Natália Odilon e Flávia Miura, obrigada por estarem sempre comigo.

Aos avaliadores da qualificação e da defesa da tese, pelo tempo dedicado e pelas contribuições feitas.

Ao programa de pós-graduação em Fisiopatologia Médica, à UNICAMP e seus funcionários, sempre me orgulharei de ter concluído minha pós-graduação nessa instituição.

“Seja sempre inquieto e vez por outra paciente, parece contraditório, soa meio diferente, mas às vezes pisar no freio também é andar pra frente.”

Bráulio Bressa

RESUMO

A anemia falciforme é uma doença hereditária recessiva, causada por uma alteração de base em um único nucleotídeo no gene da globina β , essa alteração estrutural do ácido glutâmico pela valina provoca falcização das hemácias quando desoxigenadas. As principais manifestações da anemia falciforme são resultantes do processo vaso-oclusivo e hemólise. A edição gênica emerge como uma nova alternativa para o tratamento de doenças genéticas em células hematopoiéticas. Alguns fármacos com ação hipometilante estão relacionados com a capacidade de indução da expressão da globina γ , inibindo a metilação no promotor desse gene. Entretanto, essa regulação permanece pouco esclarecida. Visando compreender esta regulação, culturas celulares CD34⁺ foram tratadas com Decitabina 1 μ M para indução da Hemoglobina Fetal (HbF), com expressões de fatores de transcrição e de genes modificadores da cromatina quantificadas por PCR Array (Qiagen™ Germany). Posteriormente, células HUDEP-2 foram tratadas com Decitabina 50 nM, com quantificação dos níveis da HbF por citometria de fluxo em triplicas biológicas. O percentual de células positivas para HbF em HUDEP-2, tratada com Decitabina, foi de $12,27 \pm 0,7\%$ $n=3$, enquanto nas células controle $1,0 \pm 0,06\%$ $N = 3$, $p < 0,0001$. O gene HNF4 α diferencialmente expresso nos ensaios de *PCR array* em CD34⁺ pós-tratamento, foi selecionado para silenciamento gênico em células HUDEP-2 utilizando o sistema CRISPR/Cas9. O silenciamento foi validado por Western Blot e qPCR. A relação entre o silenciamento do gene HNF4 α com a regulação do gene da globina γ , foi avaliada pela quantificação da HbF ao nível gênico e proteico. Os *pools* -HNF4 α -HUDEP-2 silenciados, embora não homogeneamente, expressaram significativamente mais HbF quando comparados aos níveis basais das células HUDEP-2. Os dados apresentados nesse estudo, sugerem que o fator de transcrição HNF4 α pode desempenhar um papel na regulação do gene da globina γ em células HUPEP-2, cujo mecanismo ainda não está esclarecido. Esse estudo abre caminho para mais pesquisas relacionadas a genes/fatores de transcrição usualmente não atribuídos à regulação gênica do gene HBG.

Palavras-Chave: Hemoglobina Fetal; Doença Falciforme; Edição de genes; Sistemas Crispr-Cas; Fator 4 Nuclear de Hepatócito.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is a recessive hereditary disease, caused by a base change in a single nucleotide in the β globin gene. This structural change of glutamic acid to valine leads to sickling of red blood cells when deoxygenated. The main manifestations of sickle cell anemia are the result of the vaso-occlusive process and hemolysis. Gene editing emerges as a new alternative for the treatment of genetic diseases in hematopoietic cells. Some drugs with hypomethylating action are related to the ability to induce the expression of γ globin, inhibiting methylation in the promoter of this gene. However, this regulation remains unclear. To understand this regulation, CD34+ cell cultures were treated with 1 μ M Decitabine to induce Fetal Hemoglobin (HbF), with expressions of transcription factors and chromatin-modifying genes quantified by PCR Array (Qiagen™ Germany). Subsequently, HUDEP-2 cells were treated with 50 nM Decitabine, with HbF levels quantified by flow cytometry in biological triplicates. The percentage of HbF-positive cells in HUDEP-2, treated with Decitabine, was $12.27 \pm 0.7\%$ N = 3, while in control cells $1.0 \pm 0.06\%$ N = 3, $p < 0.0001$. The HNF4 α gene, differentially expressed in PCR array assays in CD34+ post-treatment, was selected for gene silencing in HUDEP-2 cells using the CRISPR/Cas9 system. Silencing was validated by Western Blot and qPCR. The relationship between the silencing of the HNF4 α gene and the regulation of the γ globin gene was evaluated by quantifying HbF at the gene and protein level. Silenced -HNF4 α -HUDEP-2 pools, although not homogeneously, expressed significantly more HbF when compared to basal levels in HUDEP-2 cells. The data presented in this study suggest that the HNF4 α transcription factor may play a role in regulating the γ globin gene in HUPEP-2 cells, the mechanism of which is not yet clear. This study paves the way for more research related to genes/transcription factors not usually attributed to gene regulation of the HBG gene.

Keywords: Fetal Hemoglobin; Sickle Cell; Gene editing; Crispr-Cas Systems; Hepatocyte Nuclear Factor 4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ontologia das globinas.....	18
Figura 2. Principais reguladores transcricionais do gene da globina.....	20
Figura 3. Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF).....	21
Figura 4. Mutação no gene da globina β e suas implicações.....	22
Figura 5. Estrutura química dos análogos de citidina e incorporação intracelular.....	26
Figura 6. Metilação e desmetilação do DNA.....	27
Figura 7. Linha Temporal do CRISPR	29
Figura 8. Vias de reparo celular.....	30
Figura 9. Edição genética <i>ex vivo</i> para o tratamento de doenças falciformes.....	31
Figura 10. Cultura de células CD34 ⁺	37
Figura 11. Processo de nucleofecção e expansão em células HUDEP-2.....	40
Figura 12. Células CD34 ⁺ tratadas com decitabina.	43
Figura 13. Genes diferencialmente expressos após tratamento	44
Figura 14. Análise das células HUDEP-2 tratadas	46
Figura 15. Fator de hepatócitos nuclear 4 alpha.....	47
Figura 16. Alinhamento das isoformas do gene HNF4 α	48
Figura 17. Representação esquemática da técnica CRISPR/Cas9	49
Figura 18. Microscopia de Fluorescência invertida HUDEP-2 após nucleofecção.....	50
Figura 19. Eletroferograma da região referente ao HNF4 α	51
Figura 20. Intensidade de fluorescência para HbF após a nucleofecção.....	51
Figura 21. Sequenciamento do cromossomo 20, <i>locus</i> HNF4 α	52
Figura 22. Análise da eficiência de edição da Cas9	53
Figura 23. Alinhamento dos <i>pools</i> editados para o gene HNF4 α	53
Figura 24. Estrutura da Proteína HNF4 α	54
Figura 25. Expressão proteica HNF4 α	55
Figura 26. PCR quantitativo HNF4 α	55
Figura 27. <i>Pellets</i> de células HUDEP-2 editadas	56
Figura 28. Citometria de Fluxo para HbF nas células HUDEP-2.....	57
Figura 29. MIF dos <i>pools</i> editados para HNF4 α	57
Figura 30. Microscopia das células HUDEP-2, controle e editadas.....	58
Figura 31. AMNIS, em células controle e silenciadas para HNF4 α	59
Figura 32. Quantificação da proteína gama	60
Figura 33. PCR quantitativo do gene HBG1	60
Figura 34. Citometria de Fluxo <i>Pools</i> tratados com decitabina	61
Figura 35. Enriquecimento Funcional dos genes HBG1, HBG2 e HNF4 α	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais ensaios clínicos utilizando CRISPR-Cas para hemoglobinopatias-----	33
Tabela 2. Sequências dos RNAs Guias gerados pela IDT -----	39
Tabela 3. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para PCR e Sequenciamento -----	40
Tabela 4. Análise da expressão após tratamento com decitabina em células CD34 ⁺ -----	42

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ε	Épsilon
ζ	Zeta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética e pesquisa
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DEG	<i>Differential Expressed Genes</i>
DF	Doença Falciforme
dL	Decilitro
<i>et al.</i>	E outros - do latim <i>et alii</i>
EVB	Vírus Epstein-Barr
g	Grama
GO	Ontologia gênica
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina do Adulto

HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HBV	Vírus da hepatite B
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Vírus Papiloma Humano
HU	Hidroxiureia
HUDEP-2	<i>Immortalized human erythroid progenitor- 2</i>
MIF	Intensidade Média de Fluorescência
mL	Mililitro
N	Tamanho da casuística
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
P-valor	Índice de Significância Estatística
qPCR	Reação em cadeia da PoL. Quantitativa
rpm	Rotação por minuto
T	Timina
UA	Unidade Arbitrária

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Hemoglobina.....	18
1.2 Alterações genéticas das Hemoglobinas.....	21
1.3. Hemoglobina Fetal.....	24
1.4 Ferramentas de edição genética - CRISPR/Cas9.....	27
2. OBJETIVOS	35
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
3.1 Aspectos Éticos.....	36
3.2. Cultura de células CD34+.....	36
3.2.1 Tratamento da Cultura de células CD34+ com Decitabina.....	36
3.2.2 PCR array.....	36
3.2.3 Análise dos dados e validação da PCR array.....	37
3.3 Seleção do tipo celular para edição genética.....	37
3.3.1 Tratamento da cultura HUDEP-2 com Decitabina.....	37
3.4 Citometria de Fluxo.....	38
3.4.1 Image Stream Amnis.....	38
3.5 Citospin.....	38
3.6 Silenciamento Gênico.....	38
3.6.1 Nucleofecção HUDEP-2.....	39
3.6.2 Sequenciamento.....	40
3.7 Extração de RNA.....	40
3.7.1 Síntese de cDNA.....	41
3.7.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	41
3.8 Western Blotting.....	41
3.10 Análise Estatística.....	42
3.11 Análise Bioinformática.....	42
4. RESULTADOS.....	43

4.1 Indução da Hemoglobina Fetal.....	43
4.2 Análise dos genes diferencialmente expressos.....	43
4.3 Seleção do fator de transcrição e linhagem celular para silenciamento.....	45
4.3.1 Tratamento das células HUDEP-2 com 5-aza-2' (decitabina).....	45
4.4 CRISPR/Cas9 em células HUDEP-2.....	47
4.5 Validação da edição gênica e análise da eficiência de corte.....	52
4.6 Validação do silenciamento do gene HNF4 α	54
4.7 Avaliação dos níveis da HbF após o silenciamento do HNF4 α	56
4.8 Análise morfológica das células silenciadas.....	58
4.9 Principais vias compartilhadas pelos genes HBG e HNF4 α	62
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	71
Anexo 1 - Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido.....	78
Anexo 2 - Aprovação Comitê de Ética	83

JUSTIFICATIVA DE ORIGINALIDADE DO TRABALHO

A regulação da globina γ ainda não está completamente elucidada. Dessa forma, a identificação de novos agentes regulatórios envolvidos nesse processo pode expandir as possibilidades para abordagens terapêuticas no tratamento das doenças falciformes.

Não há associação do fator de transcrição HNF4 α com a regulação do gene da globina γ na literatura, o que torna este trabalho extremamente promissor em relação à descoberta de um possível novo alvo na regulação gênica para síntese de HbF. Enfatiza-se que o aumento da hemoglobina fetal é o principal modificador na gravidade das doenças falciformes, portanto, estudos que gerem conhecimentos em relação à doença e o seu tratamento, poderão contribuir na qualidade e expectativa de vida desses indivíduos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobina (Hb)

A hemoglobina humana é genericamente descrita como uma molécula tetramérica constituída por quatro cadeias polipeptídicas, das quais, duas do tipo alfa (α) e duas do tipo não alfa (β , γ ou δ). Cada cadeia apresenta um grupo prostético heme com um íon ferro (Fe^{2+}) em seu centro, o qual se liga reversível e não covalentemente a uma molécula de oxigênio, realizando o transporte do oxigênio e do gás carbônico aos tecidos dos vertebrados (PERUTZ, 1983).

A expressão dos genes das globinas gama (γ) humana é temporalmente regulada durante o desenvolvimento, sendo gradualmente silenciada após o nascimento (Figura 1). Esse fenômeno é descrito como *switching* da hemoglobina, o primeiro *switching* é marcado pela substituição da hemoglobina embrionária pela hemoglobina fetal, entre a 6ª e 8ª semana de gestação, acompanhada pelo silenciamento dos genes das globinas embrionárias ϵ (HBE) e ζ (HBZ) no saco vitelínico e a ativação dos genes da globina fetal γ (HBG1 – globina- γ^A e HBG2 – globina- γ^G) no fígado.

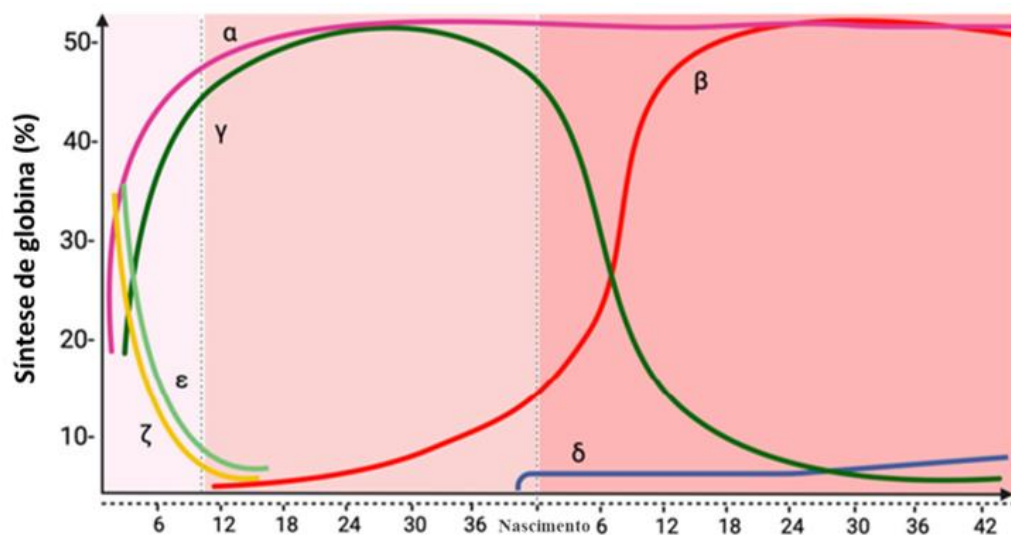


Figura 1. Ontologias das globinas. Nas primeiras semanas destaca-se a expressão da Hemoglobina Gower I (globina épsilon - ϵ e globina zeta - ζ). A partir da 10ª semana de gestação ocorre o aumento na síntese das cadeias α e γ , a globina α se mantém expressa no pós-natal, enquanto a cadeia γ é substituída pela cadeia β , acompanhada da baixa expressão da globina delta (δ). Adaptado SEGURA *et al.*, 2023.

O segundo *switching* é caracterizado pelo progressivo silenciamento dos genes da globina γ com a concomitante ativação da expressão do gene da globina β (*HBB*) na medula óssea após o nascimento (WILBER *et al.*, 2011; SEGURA *et al.*, 2023). A redução na expressão da globina γ e ativação da globina β é resultante do processo de regulação gênica orquestradas durante o desenvolvimento.

Mecanismos epigenéticos podem alterar a estrutura da cromatina, a organização nuclear e a estabilidade da transcrição, sem alterar a sequência do DNA, em resposta ao estágio de desenvolvimento, fatores ambientais e por patologias. Estas alterações, isoladamente ou em combinação, influenciam no processo de regulação gênica. Essa regulação pode envolver alterações conformacionais na cromatina e no nucleossomo, através de modificações em histonas, como: acetilação, deacetilação, fosforilação, desfosforilação, metilação, ubiquitilação, desubiquitilação, permite que as células alterem a expressão genética, modificando a capacidade de um fator de transcrição de acessar o DNA (STEPHENS *et al.*, 2013; KLEIN; HAINER, 2020).

A especificidade da transcrição é resultado da presença de sequências de nucleotídeos que determinam quais fatores podem se associar a esses sítios de ligação dentro e fora da região promotora. O processo de transcrição é predominantemente mediado por uma rede de fatores associados que interagem com regiões específicas do DNA, favorecendo a atuação da enzima RNA polimerase II e sua maquinaria (ALLISON; DYLAN, 2020).

A estrutura da cromatina nas regiões promotoras e nas sequências responsáveis pela regulação da transcrição está diretamente relacionada com status transcricional: ativo, reprimido ou equilibrado, e normalmente dependentes do estado de diferenciação celular (LIU *et al.*, 2019). O material genético está organizado em duas formas: eucromatina - classificada principalmente pela quantidade de acetilação ativa das histonas H3 e H4 e em heterocromatina – categorizada pela redução do grupo acetil nas histonas. Em geral, a acetilação das histonas centrais está associada à ativação transcricional, enquanto a metilação do DNA está associada ao silenciamento gênico (GRUNSTEIN, 1997; VENKATESH; WORKMAN, 2015).

A metilação do DNA é um processo dinamicamente regulado ao longo da vida, durante o processo de proliferação celular, na fase M (Mitose) o DNA hemimetilado

nas células-filhas é metilado ao estado da célula-mãe, pela ação da DNA metiltransferase 1 (DNMT1) (GAO *et al.*, 2020). A estrutura da cromatina nas regiões promotoras e nas sequências responsáveis pela regulação da transcrição está diretamente relacionada com status transcricional: ativo, reprimido ou equilibrado, e normalmente dependentes do estado de diferenciação celular (LIU *et al.*, 2019).

A expressão da hemoglobina fetal (HbF) é reduzida para cerca de 1% da Hb total, acompanhada pela diminuição na proporção das células F (células com HbF em níveis quantificáveis) após o primeiro ano de vida. O gene da globina γ é metilado durante o desenvolvimento biológico, estando silenciado em progenitores eritroides adultos (SEGURA *et al.*, 2023; VAN DER PLOEG; FLAVELL, 1980).

BCL11A (*B-cell CLL/lymphoma 11A*) é o principal e mais estudado modulador da transcrição do gene da globina γ , diversos estudos demonstraram o aumento da síntese da HbF após o nocaute desse gene. BCL11A se liga a região promotora do gene HBG1 em células adultas eritroides, em regiões conhecidas como *motifs* TGACCA preferencialmente nas posições distais (-118 a -113), mas, pode interagir com regiões proximais (-91 a -86) associando-se a outros fatores dentro do *locus* da globina β , regulando a repressão do gene HBG (Figura 2) (SANKARAN *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2018).

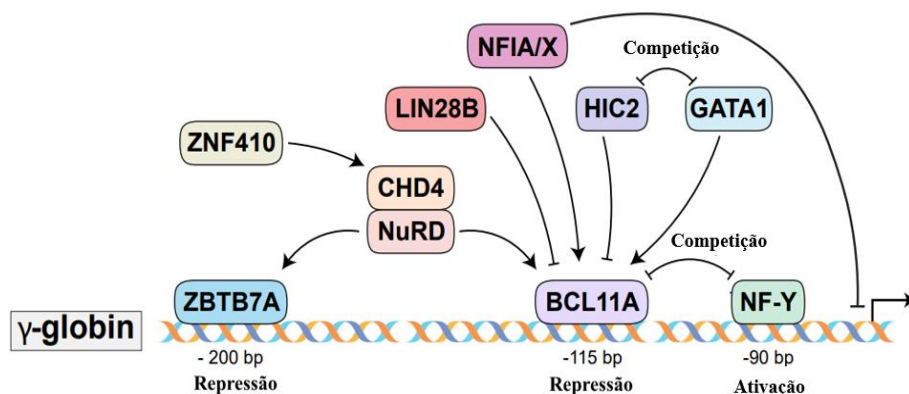


Figura 2. Principais reguladores transcricionais na região promotora do gene da globina γ . Os repressores BCL11A e ZBTB7A interagem com os fatores NuRD, HIC2, LIN28B durante a ligação na região promotora da globina γ , regulando o silenciamento da expressão da globina γ (LIU *et al.*, 2023).

1.2 Alterações genéticas das Hemoglobinas

A expressão elevada do gene da globina γ pode ser observada em indivíduos que apresentam uma condição categorizada como persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) com maiores níveis da HbF durante a vida adulta, sem alterações clínicas significativas. A PHHF pode ser classificada em duas categorias (Figura 3): deletional – caracterizada por grandes deleções (~ 13–85 kb) na região intergênica da globina da β e γ e a não deletional – gerada por trocas de nucleotídeos ou pequena deleção em regiões regulatórias (WOOD, 1993; STEINBERG, 2020).

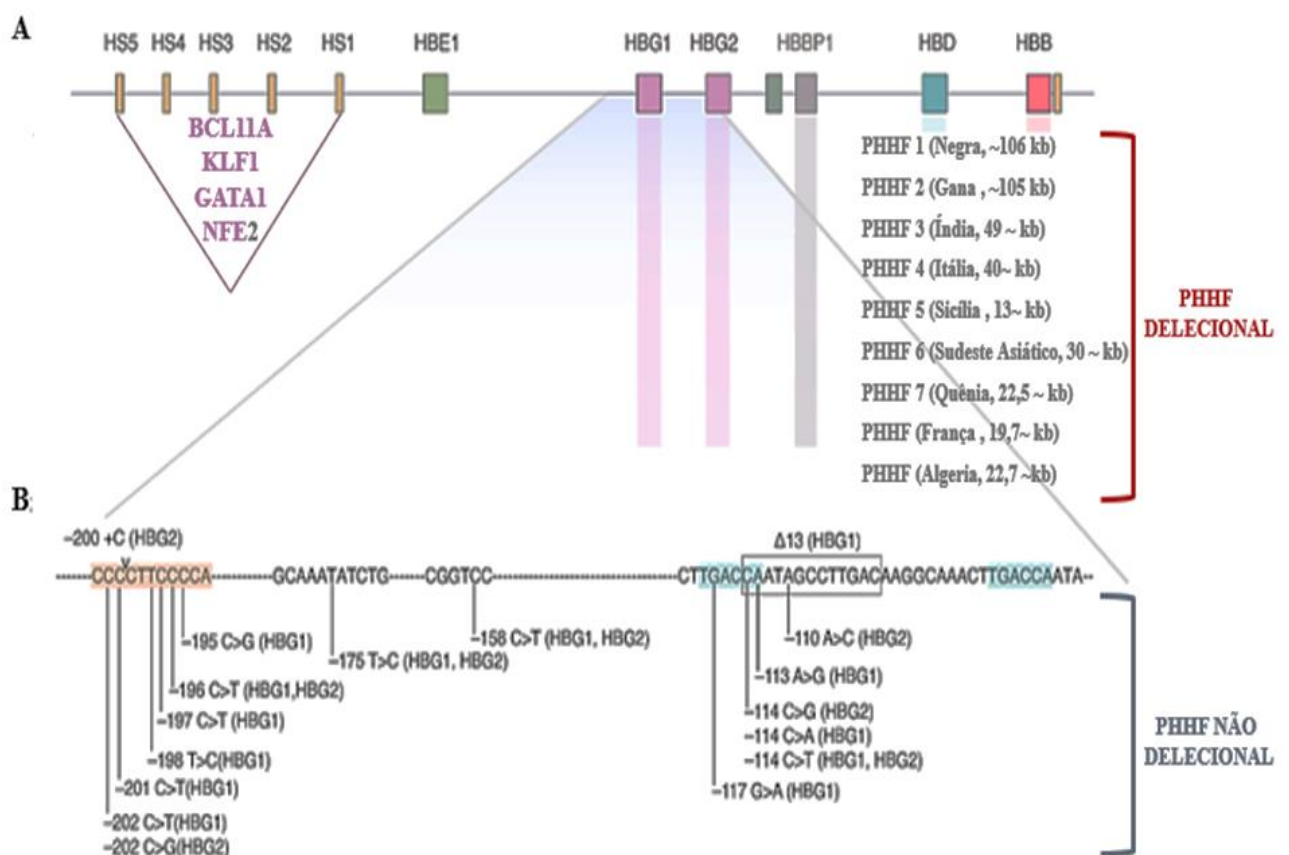


Figura 3. Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF). **A.** LCR - região de controle do *locus* β , sítios de hipersensibilidade (HS1-HS5) – ligação à reguladores (em roxo). Principais deleções de grandes sequencias relacionadas à PHHF, o número de bases perdidas nomeadas de acordo com a região da descrição inicial. **B.** Mutações não deletionais (substituições de nucleotídeos ou pequena deleção) na região dos promotores de HBG1 e/ou HBG2, regiões de ligação a fatores regulatórios em laranja (ZBTB7A) e azul (BCL11A). Adaptado PASCHOUDI *et al.*, 2023.

Os distúrbios hereditários da hemoglobina correspondem as doenças monogênicas mais comuns, a DF caracteriza-se como uma condição autossômica recessiva, associada a alterações estruturais da hemoglobina, alterando ou não sua síntese e ritmo. A presença de mutações no gene HBB, responsável pela produção da HbA, pode gerar hemoglobinas mutantes (SC, SD, SE, S beta-talassemia, S alfa-talassemia). Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial apresenta genes de hemoglobina anormais, resultando nas hemoglobinopatias mais comuns e graves: doença falciforme (DF) e talassemia (PIEL *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2024)

A anemia falciforme (AF) (HbSS) é uma doença hereditária recessiva causada por uma mutação em um único nucleotídeo no códon 7 do gene β -globina, onde uma adenina (A) é substituída por uma timina (T), resultando na troca do ácido glutâmico por uma valina hidrofóbica, responsável pela formação da hemoglobina S (HbS). Após a desoxigenação, a desoxiHbS, pode polimerizar formando túbulos rígidos que causam lesão da hemácia, alterando sua forma (células falcizadas) e com apoptose precoce (Figura 4) (HENRY *et al.*, 2020).

A AF é caracterizada como uma doença multissistêmica, com manifestações clínicas e gravidade variável, diversos órgãos podem ser afetados. As principais alterações incluem: anemia hemolítica e crises vaso-oclusivas, processos fundamentais na fisiopatologia dessa doença, que podem ser acompanhados por uma série de eventos, como a disfunção no endotélio vascular, isquemia e maior suscetibilidade para infecções sistêmicas ou locais (BUNN, 1997; STEINBERG, 2020; PIEL *et al.*, 2017).

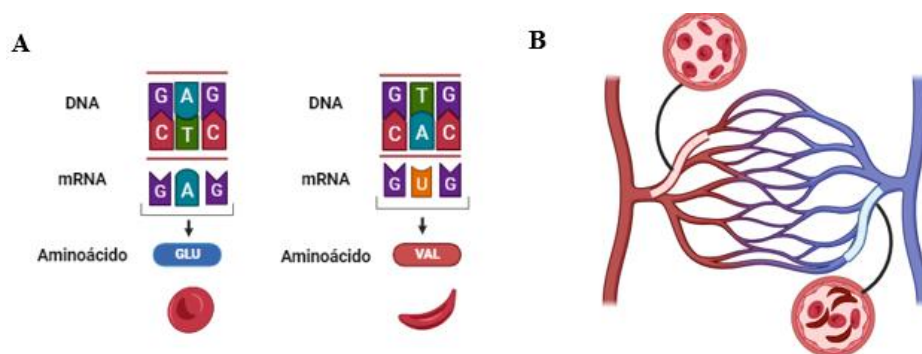


Figura 4. Representação esquemática da mutação no 7º códon do gene da globina β e suas implicações. A. Sequência normal (GAG- GLU) – HbA. Sequência mutada (GTG-Val) – HbS. B. Processo esquemático da oxigenação e desoxigenação na circulação sanguínea na anemia falciforme. Em baixas concentrações de oxigênio a estrutura da hemácia assume a forma falcizada. Elaborado pela autora, 2023 – BioRender.

Estimativas globais sugerem o nascimento de cerca de 300.000 bebês com doenças falciformes por ano, dos quais 95% ocorrem na África subsaariana e na Índia. O Brasil apresenta alta prevalência de doenças falciformes, com estimativas entre 1.500 a 3.200 recém-nascidos com essa condição (PIEL *et al.*, 2013). A população brasileira apresenta grande heterogeneidade em sua distribuição, com proporções de casos variável a depender do estado analisado, o Ministério da Saúde (2017) estimou 1:650 nascimentos no estado da Bahia, no estado de São Paulo por volta de 1:4.000 nascimentos, com menor incidência a região sul do país, em Santa Catarina e Paraná com cerca de 1 caso a cada 13.050 nascimentos.

As talassemias são o resultado do desequilíbrio na síntese das globinas, categorizadas pela ausência ou diminuição de uma, ou mais cadeias de globina (α , β , γ , δ), as apresentações mais comuns são do tipo α ou β . Dependendo do comprometimento podem ocorrer danos à membrana celular, apoptose precoce e eritropoiese ineficaz. A condição mais grave ocorre no indivíduo homozigoto, definida como talassemia maior, enquanto a talassemia menor ou o traço talassêmico é resultante da herança de um único gene mutante. Os aspectos clínicos podem envolver anemia, hematopoiese extramedular, esplenomegalia e acúmulo de ferro (LEY *et al.*, 1982; FRANGOUL *et al.*, 2021). Estimativas de nascimento anual em torno de 50.000 indivíduos sintomáticos com talassemia beta por ano, dessa população, metade necessitará de transfusão sanguínea para sobreviver (WEATHERALL; 2018).

A hemoglobina fetal (HbF) é o principal modificador na gravidade clínica das principais hemoglobinopatias descritas. A expressão elevada das cadeias da globina γ no adulto aumenta os níveis da HbF e células F, diminuindo a concentração da hemoglobina S (HbS) na doença falciforme, minimizando o desequilíbrio na produção de cadeias α e não- α nas talassemias β , e reduzindo a quantidade de cadeias α livres (XU *et al.*, 2013; STEINBERG *et al.*, 2020).

Os mecanismos envolvidos na regulação da globina γ têm sido alvo de pesquisas, que buscam a compreensão dos mecanismos que possam estar envolvidos nesse controle regulatório. Com significativa relevância clínica, pelo potencial de tratamento de hemoglobinopatias, possível ao reativar a síntese dos genes γ (HBG1 e HBG2).

1.3 Hemoglobina Fetal

A hemoglobina fetal apresenta maior afinidade ao oxigênio em comparação com as demais hemoglobinas, atuando de forma significativa na fisiopatologia da doença falciforme. Níveis elevados de HbF estão associados a uma redução nos episódios dolorosos agudos, diminuindo o aparecimento de lesões ulceradas nos membros inferiores e no aumento da longevidade nesses indivíduos (STEINBERG, 2020).

A potencial “cura” das doenças falciformes, é tecnicamente possível a partir do transplante de medula, entretanto, a maioria dos pacientes não consegue doador compatível; ou através do incremento da HbF suficiente para impedir a polimerização da HbS, inibindo a sequência de eventos que levam à oclusão vascular e eventos hemolíticos (KATO *et al.*, 2018).

Agentes farmacológicos como 5-azacitidina e 5-aza-2' (decitabina) (LEY *et al.*, 1982), a hidroxiureia (CHARACHE *et al.*, 1987), metformina (ZHANG *et al.*, 2018) e talidomida (MOUTOUH-DE *et al.*, 2008) são efetivos na indução da HbF *in vitro* e *in vivo*.

A hidroxiureia (HU), inicialmente aprovada para tratamento de doenças neoplásicas, atua no bloqueio da síntese do DNA pela inibição da ribonucleotídeo redutase, mantendo as células no ciclo celular na fase S (síntese). A HU é a principal droga de uso clínico em pacientes com DF, este tratamento aumenta o número e concentração de células F e HbF respectivamente, reduzindo a síntese da HbA, diminuindo a polimerização da HbS, atenuando as crises dolorosas, minimizando lesão aos órgãos, atuando na qualidade de vida e no aumento da sobrevida destes pacientes (RANKINE-MULLINGS *et al.*, 2022). No entanto, os efeitos da utilização desse fármaco a longo prazo como o impacto na carcinogênese, embora pareçam ser reduzidos, ainda não são totalmente elucidados. Em 2002, o Ministério da Saúde do Brasil aprovou o uso da HU para pacientes com DF, com distribuição desse medicamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Os análogos de citidina: 5-azacitidina e 5-azacitidina-2' foram desenvolvidos há cerca de 60 anos para combater células cancerígenas (SORM *et al.*, 1964), posteriormente, observou-se a atuação dessas moléculas na redução dos níveis de

metilação do DNA, exercendo um importante papel na regulação gênica e consequentemente no processo de diferenciação celular. A metilação do DNA é um mecanismo de silenciamento gênico quando grupos metil se ligam covalentemente ao carbono 5 do resíduo da citosina no sítio “CpG” (RIGGS, 1975).

Em relação à regulação no processo de síntese da HbF, esses compostos atuam inibindo a metilação em ilhas CpG na região promotora dos genes HBG1 e HBG2, permitindo a transcrição gênica, com consequentemente aumento da síntese da HbF (LEY *et al.*, 1983). Durante a fase adulta do desenvolvimento humano, a metilação nos promotores dos genes HBG está relacionada ao silenciamento, enquanto, a hipometilação, presente no desenvolvimento fetal, correlaciona-se com expressão da globina γ .

A relação entre o uso dos análogos de citidina e o aumento na síntese da HbF foi primeiramente demonstrada em células eritroides de primatas, com níveis de HbF aumentados em 70 a 80% quando comparadas a Hb total após tratamento (DESIMONE *et al.*, 1982). Essas observações possibilitaram a hipótese que a produção das cadeias de globina gama poderia ser farmacologicamente induzida *in vivo* através da hipometilação do DNA nos promotores dos genes da globina γ .

Fármacos inibidores da DNA metiltransferase (DNMTs) como 5-azacitidina e 5-azacitidina-2' (Figura 5) pertencem ao grupo de drogas que podem ser utilizadas em processos epigenéticos desregulados durante o desenvolvimento e na progressão do câncer. Essas drogas incorporam ao RNA ou DNA recém-sintetizado, formando uma ligação covalente com as DNMTs, levando à degradação destas enzimas, durante a síntese do DNA, a ausência destas enzimas resulta em hipometilação nas células filhas e, eventualmente, na reativação da expressão de genes previamente silenciados (LOWDER; ISSA, 2015). Ensaios clínicos utilizando a decitabina (5-azacitidina-2') induziram HbF em pacientes com doença falciforme intolerantes à hidroxiureia e na talassemia β (OLIVIERI *et al.*, 2011; MOLOKIE *et al.*, 2017).

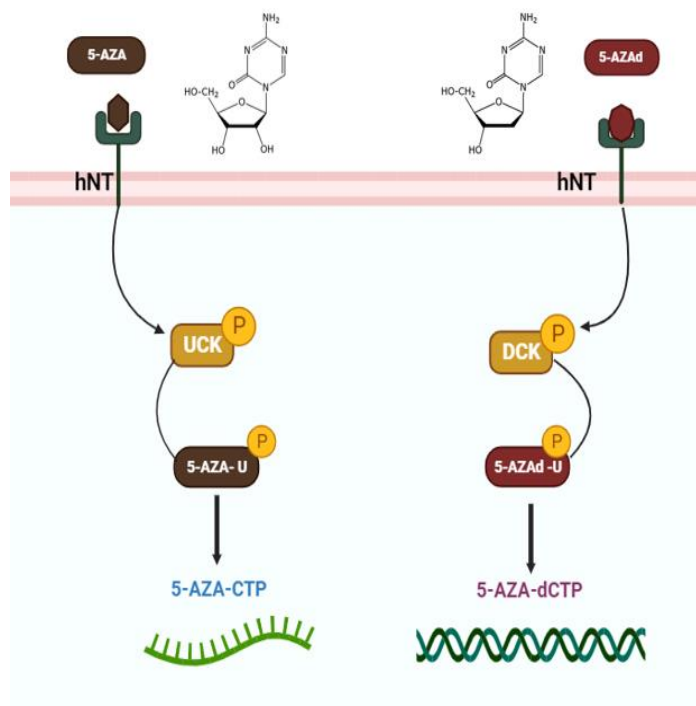


Figura 5. Estrutura química dos análogos de citidina: 5-aza e 5-aza-2' e o processo da incorporação intracelular simplificado. As moléculas 5-aza e 5-aza-2' são transportadas para o meio intracelular através do canal de transporte de nucleosídeos humanos (hNT), 5-AZA é fosforilada pela Uridina Citidina Quinase (UCK), seguido por sucessivas fosforilações através das quinases NMPK (5-aza-CDP) e DPK (5-aza-CTP). Enquanto a decitabina (5-AZAd) é fosforilada pela Desoxicitidina Quinase (DCK) para formar o análogo 5-aza-dCMP, fosforilado pela NMPK (5-aza-dCDP) e NDPK (5-aza-dCTP). Nos seus estados, ativos 5-aza-CTP e 5-aza-dCTP podem substituir as citosinas no RNA e no DNA, respectivamente. Elaborado pela autora, 2023 – BioRender, baseado em SORRENTINO *et al.*, 2021.

A decitabina foi primeiramente utilizada, nos Estados Unidos, durante os anos 1970 como tratamento antileucêmico e, posteriormente, nos anos 1980, como um indutor da HbF em pacientes com hemoglobinopatias. A incorporação de 5-aza-2' no genoma faz com que ele seja reconhecido pela enzima DNMT1, ligando-se irreversivelmente ao nucleosídeo, comprometendo suas funções catalíticas e levando à sua degradação (PARKER; THOTTASSERY, 2021)

Estudos utilizando a decitabina como agente hipometilante do DNA para indução da HbF em pacientes com anemia falciforme, demonstraram aumento significativo na síntese do gene da globina γ , com consequente aumento nos níveis da HbF e células F. Adicionalmente, 100% dos pacientes com DF apresentaram aumento na produção de HbF em resposta à decitabina, incluindo aqueles que não responderam à hidroxiureia previamente (LEY *et al.*, 1983; DESIMONE *et al.*, 2002; MOLOKIE *et al.*, 2017).

A metilação do DNA desempenha um papel crítico na modulação da expressão gênica da globina β humana (Figura 6) com uma relação inversa entre a expressão do gene da globina γ e metilação do DNA na região promotora desse gene. Todavia, não há a relação dos genes diferencialmente expressos após o processo de indução da HbF utilizando decitabina na eritropoiese *in vitro*. A investigação e compreensão das principais modificações ao nível celular, pode adicionar maior elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na durante a regulação da HbF.

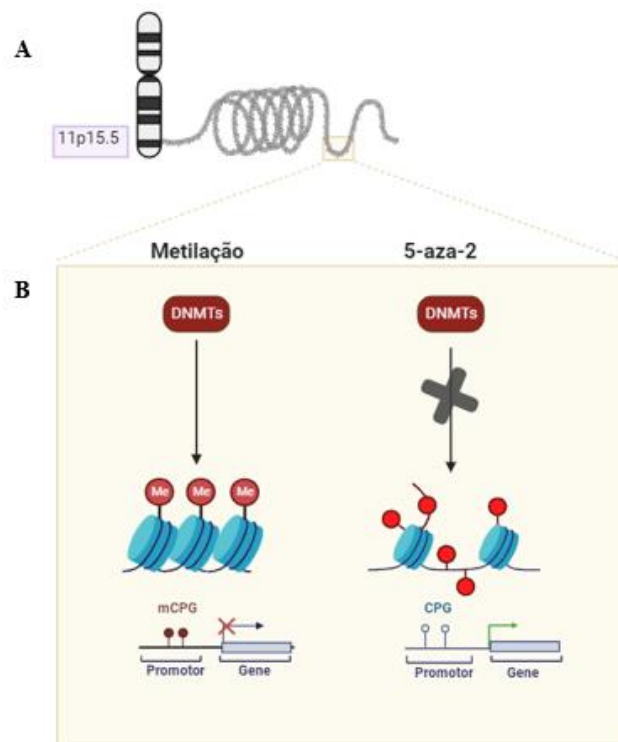


Figura 6. Metilação e desmetilação do DNA **A.** Braço mais curto do cromossomo 11 na posição 15.5 do *cluster* da globina β . **B.** região selecionada (tracejada) referente o gene da globina γ na vida adulta estão hipermetilados pela ação das enzimas DNMTs, impedindo a transcrição. Na presença da molécula 5-Aza-2', ocorre a incorporação ao DNA durante a divisão celular, “sequestrando” as DNMTs, impedindo que essa enzima adicione o grupo metil nos sítios CpG no promotor do gene, favorecendo a reativação do gene. Elaborado pela autora, 2023 – BioRender.

1.4 Ferramentas de edição genética - CRISPR/Cas9

Ferramentas de edição como ZFN (*Zinc finger nucleases*) TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*), RNAi (RNA de Interferência) e a mais recente técnica: CRISPR/Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regulamente Interespaçadas – endonuclease cas 9) podem ser utilizadas para avaliação funcional da regulação gênica (HOBAN *et al.*, 2016).

A avaliação funcional de um determinado gene pode ser observada a partir da sua inativação ou superexpressão, com abordagens distintas para esses efeitos como: farmacológicas - utilizando drogas que bloqueiam a ativação/expressão desse gene ou através de técnicas de edição genética. A terapia genética para hemoglobinopatias pode ser dividida atualmente em quatro categorias: (1) adição de genes, (2) silenciamento de genes, (3) edição do gene da globina, e (4) edição de elementos reguladores do gene da globina (GOODMAN; MALIK, 2016).

CRISPR é um sistema procariótico de defesa antiviral, que utiliza nucleases guiadas por RNA, capazes de inativar genes por meio da clivagem do DNA-alvo, descrito em 1987 como uma região peculiar no genoma da *Escherichia coli*, constituída por sequências repetidas (29 nucleotídeos) e sequências espaçadas (32 nucleotídeos) de função desconhecida, pelo pesquisador Yoshizumi Ishino, da Universidade de Osaka- Japão (ISHINO *et al.*, 1987). Em 2000, essas sequências foram identificadas no genoma de diferentes bactérias *Archea*. No ano de 2002, essa região recebeu o nome de CRISPR (Figura 7) (MOJICA *et al.*, 2000; JANSEN *et al.*, 2002; ISHINO *et al.*, 2018).

O Sistema CRISPR emerge como uma técnica de edição genética revolucionária, com ampla aplicabilidade e precisão na edição do DNA. Esse sistema é composto por uma matriz de RNA guia (gRNA), constituído por uma sequência de 20 nucleotídeos que se liga ao alvo específico no DNA através do emparelhamento das bases Watson-Crick. O sistema CRISPR associado a nuclease Cas9 induz uma ruptura na sequência alvo, três pares de bases adjacentes à sequência xGG (PAM) (RAN *et al.*, 2013).

Possibilidades de adição, remoção, troca de nucleotídeo ou sequências dentro do genoma, com vasta aplicação em comparação às técnicas anteriores, e mais precisa, expande as possibilidades de estudos para a compreensão da regulação gênica, ampliando o conhecimento sobre processos regulatórios de diversos alvos. Sua utilização apresenta possibilidade de aplicação em diversas áreas de conhecimento: biológicas (tratamento de doenças genéticas, estudo funcional de genes), no melhoramento genético de plantas e animais, com amplo potencial para diversas áreas.

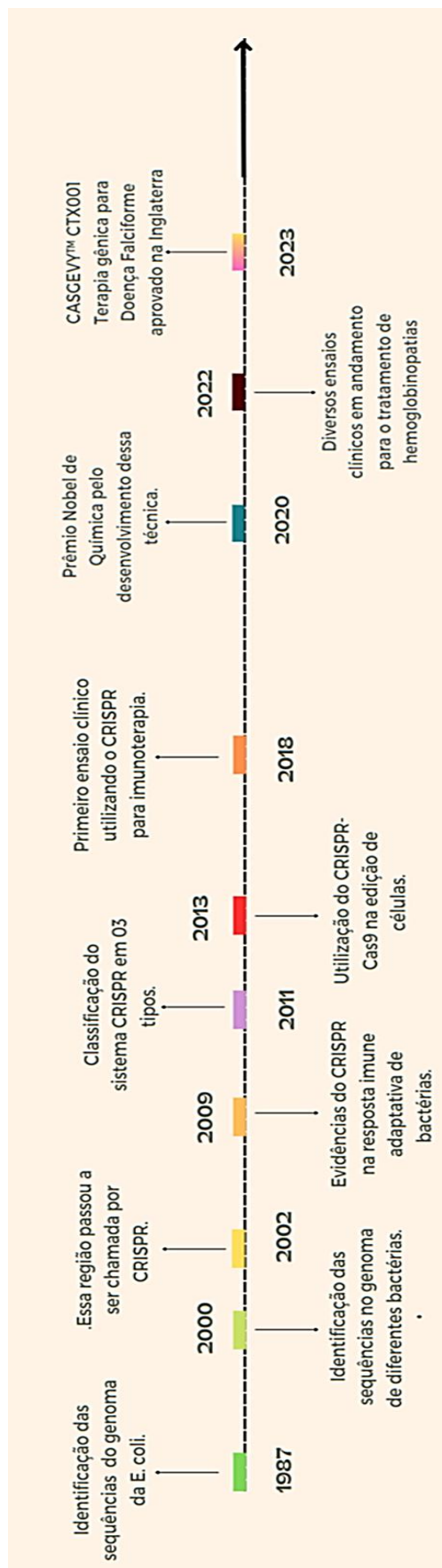


Figura 7. Linha Temporal do CRISPR. Principais eventos entre a identificação das Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas. Identificação das sequências no genoma da *E. Coli* em 1987 até a utilização do sistema CRISPR/Cas em terapias genéticas avançadas nos dias atuais. Elaborado pela autora, 2023.

A clivagem do DNA gerada pela enzima Cas9, gera extremidades abruptas (cortes em ambas as fitas) ou *nicks* (em uma única fita), essa ruptura da dupla fita do DNA provoca um dano importante nas células e esse processo pode levar a ativação de vias de reparo celular (Figura 8), como a via de junção de pontas não homóloga (*NHEJ- non-homologous end joining*). Essa via pode ser acionada em qualquer etapa do ciclo celular, ao unir as pontas do DNA, comumente resulta em mutações do tipo *indels* (inserção ou deleção de um ou poucas bases) na região da junção ou próximas a ela, provocando modificações na sequência dessa região do DNA, processo que pode alterar nucleotídeos, levando à substituição de aminoácidos, alterando processos de transcrição e tradução, culminando em proteínas truncadas ou não funcionais. Quando as extremidades oriundas da clivagem apresentarem homologia entre si ou com um DNA doador, a via de reparo direcionado por homologia (*HDR- homology directed repair*) poderá ser acionada. Em processos de edição genética a via HDR é utilizada principalmente quando se busca substituições alélicas específicas em uma determinada região do genoma (JINEK *et al.*, 2012).

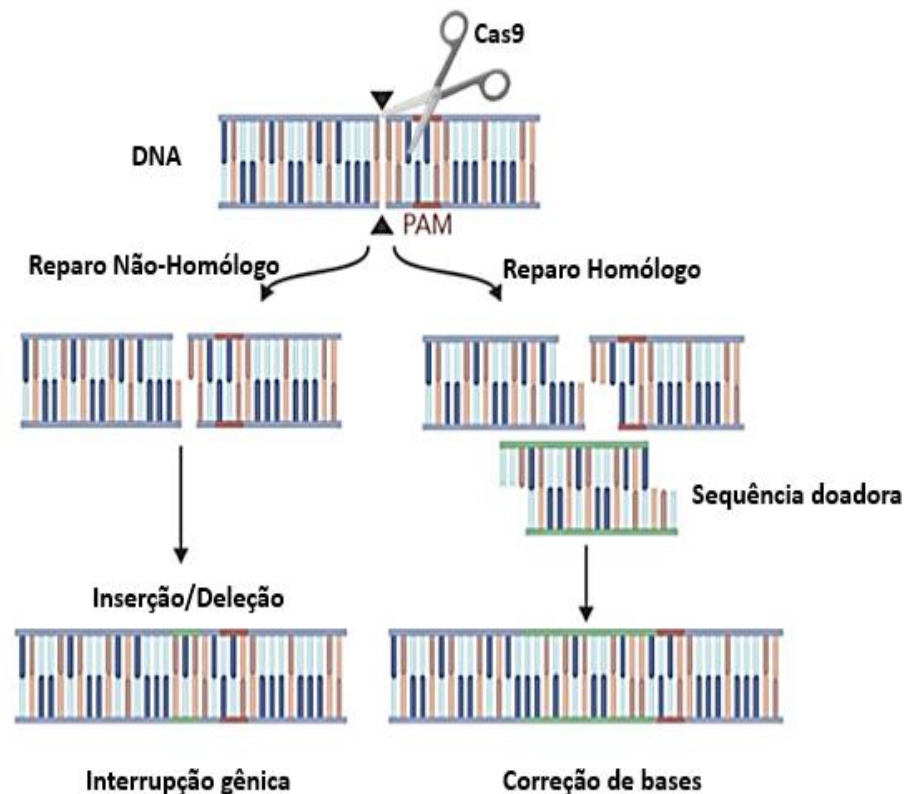


Figura 8. Vias de reparo celular. A quebra na fita do DNA pela enzima Cas9, ativa a reparação celular, pela via do Reparo Não homólogo, onde nucleotídeos podem ser colocados removidos de forma aleatória ou pela via do Reparo Homólogo, apresenta mais precisão, porém é necessário a utilização de uma sequência doadora para unir as extremidades da fita. Adaptado ABRAHAM; TISDALE, 2019.

O CRISPR-Cas domina o campo da edição genética, utilizando RNAs guia que direcionam o complexo CRISPR para sequências específicas no DNA, com possibilidade de ser utilizada em diversos locais do genoma. (DOUDNA, 2020) A ferramenta CRISPR-Cas9, vem sendo utilizada em estudos da doença falciforme (Figura 9), para a edição de regiões codificantes de genes repressores, potencializadores ou sítios de interações de proteínas que possam estar relacionadas a regulação da HbF e na correção genética da troca do nucleotídeo nessa patologia $T \rightarrow A$, pela via de reparo não homologa e via de reparo direcionado por homologia, respectivamente. No entanto, a edição genética pela via de reparo homólogo direcionado apresenta menos eficiência, pela dificuldade de provocar a quebra na ligação das bases e na inserção integral da sequência de bases doadora durante o processo.

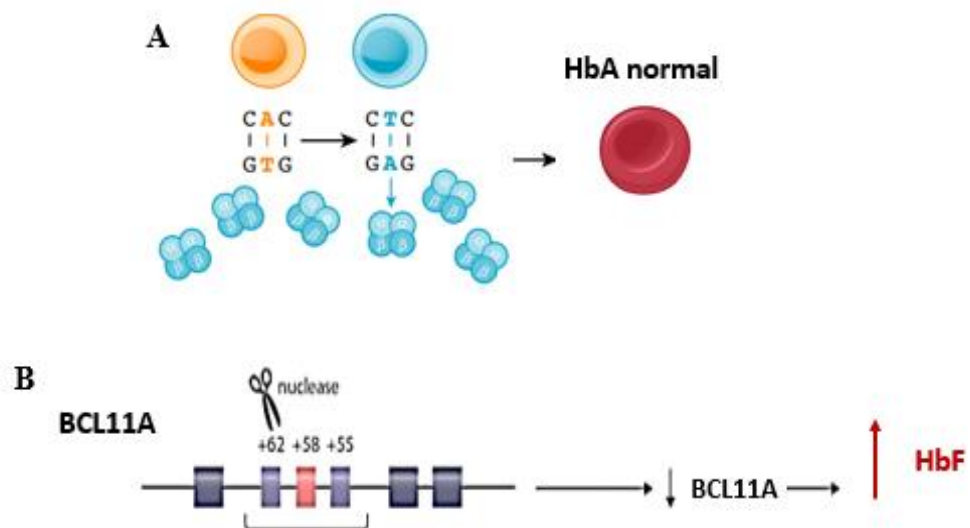


Figura 9. Aplicações da edição do genoma ex vivo no tratamento de doenças falciformes. A terapia gênica pode ser realizada removendo as células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras (HSPCs) do paciente com edição *in vitro*, com aplicação dessas células geneticamente modificadas no paciente (*in vivo*). **A.** Anemia falciforme pode ser tratada pela correção da mutação que altera o aminoácido e provoca a falcização da hemácia, resultando em glóbulos vermelhos normais. **B.** Edição na sequência do *enhancer* do gene BCL11A, principal repressor da regulação do gene da globina gama, o silenciamento do BCL11A está inversamente proporcional à síntese de HbF. Adaptado de DOUDNA, 2020; FRANGOUL *et al.*, 2021.

Ensaio clínico utilizando edição genética já são aplicados (Tabela 1), a pesquisa CTX001 (NCT03745287) utiliza células CD34⁺ autólogas editadas com CRISPR-Cas9 com um RNA guia específico para a região promotora do gene HBG, em sequências de ligação do BCL11A, em pacientes com anemia falciforme e talassemia β , os resultados demonstraram aumento nos níveis da HbF basal inicial de

9,1% para 25,9% após 2 meses do tratamento, com estabilização entre 46% e 48% durante o 4º e 9º mês após aplicação, concomitantemente, as células F aumentaram de 33,9% para 99,7%; com níveis de hemoglobina entre 11 a 12 g/dL, sem crise vaso-oclusiva no paciente com doença falciforme, e na β talassemia, houve aumento dos níveis da HbF >97%, acompanhado do aumento na concentração da hemoglobina aos 15 meses com quantificação de 14 g/dL (FRANGOUL *et al.*, 2021).

Tabela 1. Principais ensaios clínicos utilizando CRISPR-Cas para hemoglobinopatias.

Nome	Ensaio Clínico	Fase	Patologia	Intervenção	Status
Gene Correction in Autologous CD34+ Hematopoietic Stem Cells (HbS to HbA) to Treat Severe SCD	NCT04819841	I/II	Doença Falciforme	GPH101	Finalizado
A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Severe SCD	NCT03745287	II/III	Doença Falciforme	CTX001	Ativo
Evaluation of Efficacy and Safety of a Single Dose of CTX001 in Participants With Transfusion-Dependent β -Thalassemia and Severe SCD	NCT05477563	III	Thalassemia Beta	CTX001	Recrutando
Evaluation of Efficacy and Safety of a Single Dose of Exa-cel in Participants With Severe SCD, β S/ β C Genotype	NCT05951205	III	Doença Falciforme	Exa-cel	Não iniciado
Transplantation of CRISPR Repeats Modified Hematopoietic Progenitor Stem Cells in Patients With Severe SCD	NCT04774536	I/II	Doença Falciforme	SCD001	Não iniciado
A Long-term Follow-up Study in Subjects Who Received CTX001	NCT04208529	Observacional	Hemoglobinopatias	CTX001	Convidados
Evaluation of Safety and Efficacy of CTX001 in Pediatric Participants With SCD	NCT05329649	III	Doença Falciforme	CTX001	Recrutando

A edição genética desponta como o futuro das abordagens terapêuticas, com potencial aplicabilidade para o tratamento de diversas desordens genéticas: hematológicas (Doença Falciforme; Talassemias; Anemia de Falconi) neurológicas (Doença de Huntington; Alzheimer), cardíaca (Aterosclerose), muscular (Síndrome de Duchenne), oftalmológica (Catarata), alérgica (Asma), infecções virais (HIV, HBV, HPB e EPV) e em processos de desenvolvimento descontrolado, como observado em determinados cânceres (SHARMA *et al.*, 2021).

Correções de bases em regiões do DNA, inativação ou reativação de genes poderá favorecer maior individualização, aumentando a especificidade para determinados tratamentos de patologias quando comparadas aos métodos farmacológicos tradicionais. Espera-se uma expressiva evolução a partir da utilização de terapias genéticas personalizadas, com fácil aplicação, por vias de administração intravenosa ou oral de um vector terapêutico constituído por células geneticamente “corrigidas” ou com sequências de nucleotídeos para serem transcritos, favorecendo ou impossibilitando ativação/inativação de vias e respostas celulares, buscando segurança, minimização de *off targets* e eficiência desses processos, que exigirão um acompanhamento cuidadoso e longo prazo desses pacientes.

A regulação da globina γ ainda não está completamente elucidada. Dessa forma, a identificação de novos agentes regulatórios envolvidos nesse processo pode expandir as possibilidades para abordagens terapêuticas no tratamento das doenças falciformes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar novos alvos envolvidos no aumento da síntese da HbF secundários ao uso da decitabina, a partir da geração de uma biblioteca de genes e fatores de transcrição encontrados diferencialmente expressos após o tratamento com decitabina em células CD34⁺.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Verificar se há indução de HbF pelo tratamento com o composto decitabina em células HUDEP-2.
- 2- Relacionar novos possíveis alvos com a síntese de HbF.
- 3- Após a identificação dos possíveis novos alvos terapêuticos - estudar suas expressões gênicas e proteicas e avaliar pormenorizadamente a produção de HbF após o silenciamento gênico dos possíveis alvos encontrados.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE encontra-se nos anexos), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob número 61602416.5.0000.5404.

3.2. Cultura de células CD34⁺

Para obtenção de células CD34⁺ foram coletadas amostras de indivíduos saudáveis com idade entre 18-50 anos (n=3), com normalidade do padrão eletroforético para as cadeias de globinas confirmadas por HPLC. Após isolamento com *beads* magnéticas, as células foram cultivadas por 7 dias com 10% de soro fetal bovino, fator de célula-tronco (SCF), IL-3, Eritropoetina (EPO) em meio MSSe, sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C. Após 7 dias, as células foram centrifugadas e cultivadas com os mesmos fatores e meio de cultura da primeira fase, com o aumento da concentração de soro fetal para 30%.

3.2.1 Tratamento da Cultura de células CD34⁺ com Decitabina

Células CD34⁺ (5x10⁶) foram tratadas com o composto decitabina (5-Aza-2'-deoxycytidine-Sigma-Aldrich) na concentração de 1μM no 9º dia de cultura, no 13º dia as células foram coletadas para quantificação da expressão do gene HBG por qPCR e da HbF por citometria de fluxo. O controle recebeu água estéril (n=3) (Figura 10).

3.2.2 PCR array

A *RT2 profiler PCR array* (Qiagen) associa duas técnicas: a reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) e expressão de múltiplos genes simultaneamente com alta sensibilidade e reprodutibilidade. Foram utilizadas as placas específicas para Fatores de Transcrição *RT² Profiler™* e Enzimas Epigenéticas Modificadoras de Cromatina *RT² Profiler™ PCR Array* (Qiagen). As reações e procedimentos foram realizadas seguindo as instruções do fabricante. Em cada placa foi possível analisar simultaneamente 84 genes que codificam proteínas modificadoras de DNA genômico, 05 genes endógenos, 01 controle de DNA genômico, 03 controles de transcrição reversa e 03 controles positivos da PCR. A detecção de expressão gênica por PCR array foi realizada no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems).

3.2.3 Análise dos dados e validação da PCR array

A análise dos dados foi realizada no site do fabricante: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. A análise dos dados é baseada Ct (threshold cycle) utilizando o método ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Todos os dados foram normalizados com relação à expressão dos controles endógenos ACTB e B2M.

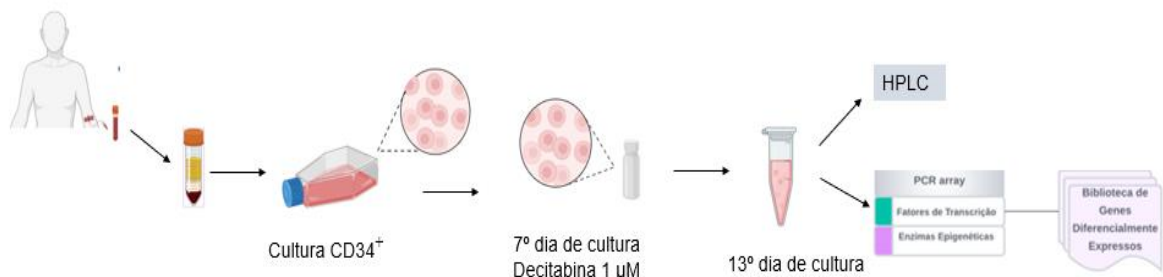


Figura 10. Cultura de células CD34⁺. Coleta, expansão e diferenciação das células, com adição da droga no 7º dia da cultura e posterior coleta. Elaborado pela autora, 2023 – BioRender.

3.3 Seleção do tipo celular para edição genética

A linhagem celular HUDEP-2 (*human umbilical cord blood derived erythroid progenitor 2*) foi utilizada como modelo celular para o processo de edição genética, por ser uma linhagem celular precursora eritróide derivada de células progenitoras hematopoiéticas com expressão predominantemente da globina β , com baixa expressão da globina γ . Essas células foram cultivadas em meio StemSpan™ SFEM (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá), suplementado com fatores específicos: como SCF, Dexametasona, Doxiciclina, EPO, Penicilina e Estreptomicina, em atmosfera umidificada a 5% de CO₂, a temperatura de 37 °C.

3.3.1 Tratamento da cultura HUDEP-2 com Decitabina

As células HUDEP-2, $1 \cdot 10^6$ (n=3) foram tratadas com o composto decitabina (5-Aza-2'-deoxycytidine-Sigma-Aldrich) nas concentrações de 1, 10, 50 e 100nM, e coletadas após, 24, 48, 72 e 96 horas após para mensuração dos níveis de hemoglobina fetal por citometria de fluxo e quantificação da expressão de γ -globina por qPCR. O grupo controle recebeu água estéril.

3.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para acompanhar o processo de diferenciação eritróide, utilizando os seguintes anticorpos Anti-receptor de Transferrina – CD71 (conjugado com FITC): marcador de células eritróide jovens; Anti- Glicoforina A-CD235 (conjugado com PE): marcador de células eritroides maduras. Para a análise dos níveis de hemoglobina fetal, utilizou-se o anticorpo Anti-Hemoglobina Fetal (conjugado com FITC): marcação citoplasmática. Para essa marcação faz-se necessário um processo de permeabilização e fixação das células (Kit Fix & Perm - *Cell Permeabilization* – Caltag). A concentração de células utilizadas para esta técnica foi de 1×10^5 células para um volume final de 100 μ L em PBS. As células são incubadas com 3-5 μ L do anticorpo durante 30 minutos, a 4 °C, na ausência de luz. Foram adquiridos 10000 eventos para análise no *FACS Scalibur SSC/FSC* utilizando o software *Cell Quest* (Becton Dickinson). Para análise utilizou-se o software Flow JO (BD).

3.5 Image Stream Amnis

Amostras de células HUDEP-2 controle, e dos clones -HNF4a fixadas e marcadas para o anticorpo Anti-HbF, foram isoladas e adquiridas utilizando o citômetro de fluxo de imagem ImageStream IS100 (AMNIS Seattle, EUA) constituído por um laser de estado sólido de 488 nm (40 mW) com a versão do software inspire (v 4.1.434.0). Imagens foram obtidas para análise morfológica e visualização das diferenças dos níveis intracelulares de HbF em comparação ao controle e aos clones editados. Os dados foram analisados usando o software IDEAS v 5.0 (AMNIS).

3.6 Citospin

A análise morfológica das células foi realizada a partir de lâminas de *citospin* coradas com Leishman, 2×10^4 células ressuspensas em 100 μ L de PBS 1%, e centrifugadas a 3000 rpm durante 3 minutos em citocentrífuga (CT-2000; Cientec, BRA), com posterior coloração. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Olympus IX81 (Olympus Optical, JPN).

3.7 Silenciamento Gênico

O fator de transcrição encontrado mais diferencialmente expressos nos ensaios de *PCR array* e confirmados pela validação por qPCR, foi selecionado para silenciamento em cultura de células HUDEP-2. Os (*gRNA*) RNAs guia (Tabela 2)

foram desenhados utilizando a ferramenta disponível da IDT idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_PREDESIGN_1 que fornece sequências em diferentes regiões disponíveis dentro da *ORF* (Open Reading Frame) do gene, ranqueando as sequências por pontuação, segundo as maiores eficiências e menores possibilidades de ocorrência de *offtargets*.

Tabela 2. Sequências dos RNAs Guias gerados pela IDT.

RNA guia	Posição	Sequência	PA M	On- target score	Off- target score
Hs. Cas9.HNF4A. AA	4441452 3	CGGGATCAACGGCGACA TTC	GG G	54	95
Hs. Cas9.HNF4A. AB	4441370 8	GGGACCGGATCAGCACT CGA	AG G	55	92

3.7.1 Nucleofecção HUDEP-2

Para a entrega do complexo (*gRNA*, *tracrRNA* e proteína Cas9), 1.10^6 células foram electroporadas com 100 μ L do kit P3 *Primary Cell* 4D- Nucleofector X kit (Lonza), juntamente com a proteína Cas9 *high fidelity ribonucleoprotein* (104 pmol), *crRNA: tracrRNA* (120 pmol) e 1 μ M do *gRNA*, utilizando o programa E0-100 (AMAXA, LONZA). Após a nucleofecção, as células foram armazenadas em poços contendo 2 ml de meio, com troca de meio 24 horas após a nucleofecção. As células HUDEP-2 nucleofectadas após 48 horas foram condicionadas em placas de 96 poços, com concentração aproximada de 50 células por poço em 100 μ L de meio de cultura, com trocas regulares de meio, até atingirem um número suficiente de células para extração de DNA (1.10^5), aproximadamente 4 semanas. Após a extração do DNA, quantifica-se o DNA genômico utilizando o espectrofotômetro (NanoDrop Thermo Fisher™ USA) (Figura 11). Posteriormente, ocorre a amplificação da região selecionada, utilizando *primers* específicos para a região alvo do *gRNA* utilizado na nucleofecção. Os produtos das reações de PCR foram confirmados pelo tamanho do *amplicom* na eletroforese em gel de agarose 1,5%.

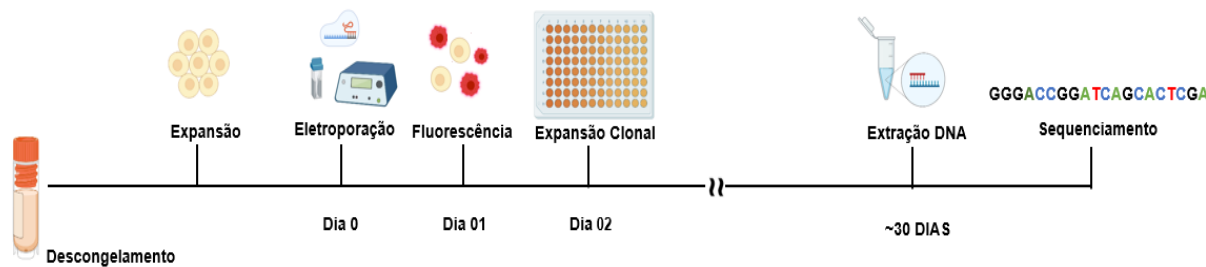


Figura 11. Etapas do processo de nucleofecção e expansão em células HUDEP-2. Etapas desde o descongelamento das células HUDEP-2, seguida pela expansão e nucleofecção, com posterior expansão clonal, validação da edição das sequências alvo. Elaborado pela autora, 2023 – BioRender.

3.7.2 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante e otimizado no laboratório, utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. Utilizamos os mesmos *primers* que foram sintetizados para amplificação dos sítios alvos do fator de transcrição. Foi utilizado cerca de 100ng do produto purificado da PCR, 1,0 µL de *Big Dye*; 2,0 µM de *primer forward* ou *reverse* (Tabela 3). Após a eletroforese, o *software* do equipamento gera as sequências e as amostras foram alinhadas e comparadas com a sequência controle. Os eletroferogramas foram analisados para confirmação da edição genética, como deleções ou inserções (*indels*) de nucleotídeos na sequência alvo.

Tabela 3. Sequências dos *primers* utilizados para PCR e Sequenciamento.

5'- 3'	Sequência dos Primers HNF4α
Forward	CACCAGCTGAGTTAGAGGCC
Reverse	CACTACTGCCCAACCATCCAC
Forward	CCGAGAGAACAGAGCAGTGG
Reverse	TGAAGACTCTGCTTGGCCTG

3.8 Extração de RNA

As amostras de RNA foram extraídas utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen™ Germany) segundo o protocolo do fabricante. E as quantificações realizadas através da utilização do espectrofotômetro (NanoDrop Thermo Fisher™ USA).

3.8.1 Síntese de cDNA

Para a obtenção da fita-molde de cDNA, todas as amostras foram tratadas com DNase. Para a reação da transcrição reversa, 1µg de RNA total foi transcrito utilizando o kit *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas™ Thermo Fisher™ USA).

3.8.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para análise de expressão gênica utilizou-se o intercalante de DNA, *SYBR® Green* (Applied Biosystems™ EUA) e para a detecção da amplificação em tempo real, o equipamento *StepOne Plus®* (Applied Biosystems™ EUA). As amostras foram amplificadas em duplicata, com o uso de controles negativos (água estéril em substituição da amostra), o volume final da reação foi de 12uL (6uL *Syber Green*, 3 uL Primers, 3 uL cDNA). Para o cálculo da expressão relativa dos genes alvos, foi empregado o método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$, normalizado pela expressão do gene *RPLP0* (*Ribosomalprotein lateral stalksubunit P0*).

3.9 Western Blot

Para validar a alteração na síntese proteica, utilizou-se o sobrenadante resultado da lise de 1×10^6 células com tampão RIPA/+Inibidor de protease. A concentração proteica foi mensurada utilizando o método de Bradford. Após a quantificação proteica total, adicionou-se *2x Laemmli Sample Buffer* (Bio-Rad, EUA) com incubação a 95 °C, durante 5 minutos, sendo conservadas a -80°C. Para a eletroforese utilizou-se 50 µg por amostra em gel de poliacrilamida 4-20% SDS-PAGE utilizando o aparelho *Mini-Protean* (Bio-Rad, EUA). Foram utilizados os anticorpos anti-HNF4a (Santa Cruz) 1:1000, anti-gama globina (Santa Cruz) 1:3000, e o endógeno GAPDH (Santa Cruz) 1:5000, ambos produzidos em camundongo. O reagente ECL™ Western Blot Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, GBR) foi utilizado para revelação da membrana por quimioluminescência, detectada pelo aparelho Alliance 9.7 Chroma UVIPuro (UVIttec Limited, GBR). Análises quantitativas da intensidade das bandas foram determinadas utilizando-se o software ImageJ (NIH, EUA). A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão GAPDH.

3.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism versão 8 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre dois grupos independentes, utilizou-se o teste T de Student para dados não pareados, e para a análise entre mais de dois grupos, a análise de variância (ANOVA) foi empregada.

3.11 Análise Bioinformática

Para as análises de bioinformática, os genes HBG1/2 e HNF4 α genes que foram utilizados, para a avaliação das vias e funções celulares compartilhadas entre esses genes, foi realizada utilizando a plataforma ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>), com dados fornecidos pelo Gene Ontology (<http://geneontology.org/>).

4. RESULTADOS

4.1 Indução da Hemoglobina Fetal

O aumento significativo da expressão de cadeias γ -globinas foi mensurado por HPLC (Figura 12) nas culturas celulares $CD34^+$ tratadas com decitabina no 9º dia de cultura em comparação com as culturas controle.

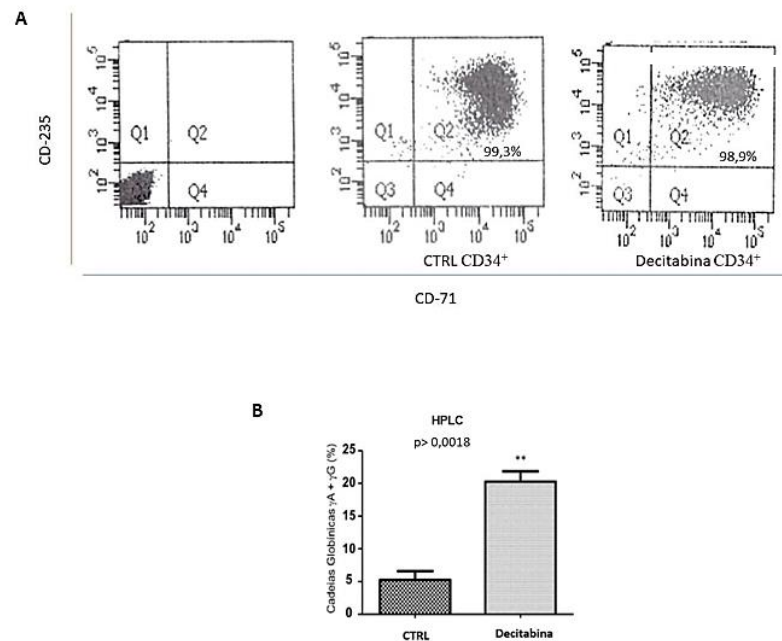


Figura 12. Células $CD34^+$ tratadas com decitabina. A. Citometria de fluxo do 7º dia de cultura, no eixo x visualiza-se células positivas à marcação anti-receptor de transferrina CD-71 (marcador de células eritroides jovens) e no eixo y, células marcadas para anti-glicoforina A- CD235 (marcador de células eritroides maduras). B. Quantificação das cadeias globínicas por HPLC das células $CD34^+$ γ^A e γ^G controle e tratadas com decitabina 1 μ M. (n=3)

4.2 Análise dos genes diferencialmente expressos

Na análise da expressão gênica relativa (log2 da razão de intensidade de luz emitida pelos genes do grupo tratado e do grupo controle) (Tabela 4), os valores considerados foram subexpressão (fold change < -2), superexpressão (fold change > 2) ou sem diferença significativa ($-2 < \text{fold change} < 2$). Das 84 enzimas epigenéticas modificadoras de cromatina, avaliadas, 24 (28,5%) estavam diferencialmente expressas após o tratamento com decitabina (5-AZA-2), no gráfico de dispersão (Figura 13) visualiza-se os 05 genes superexpressos e o percentual de subexpressão. Dos fatores de transcrição avaliados: 21 (25%) mostraram diferenças de expressão.

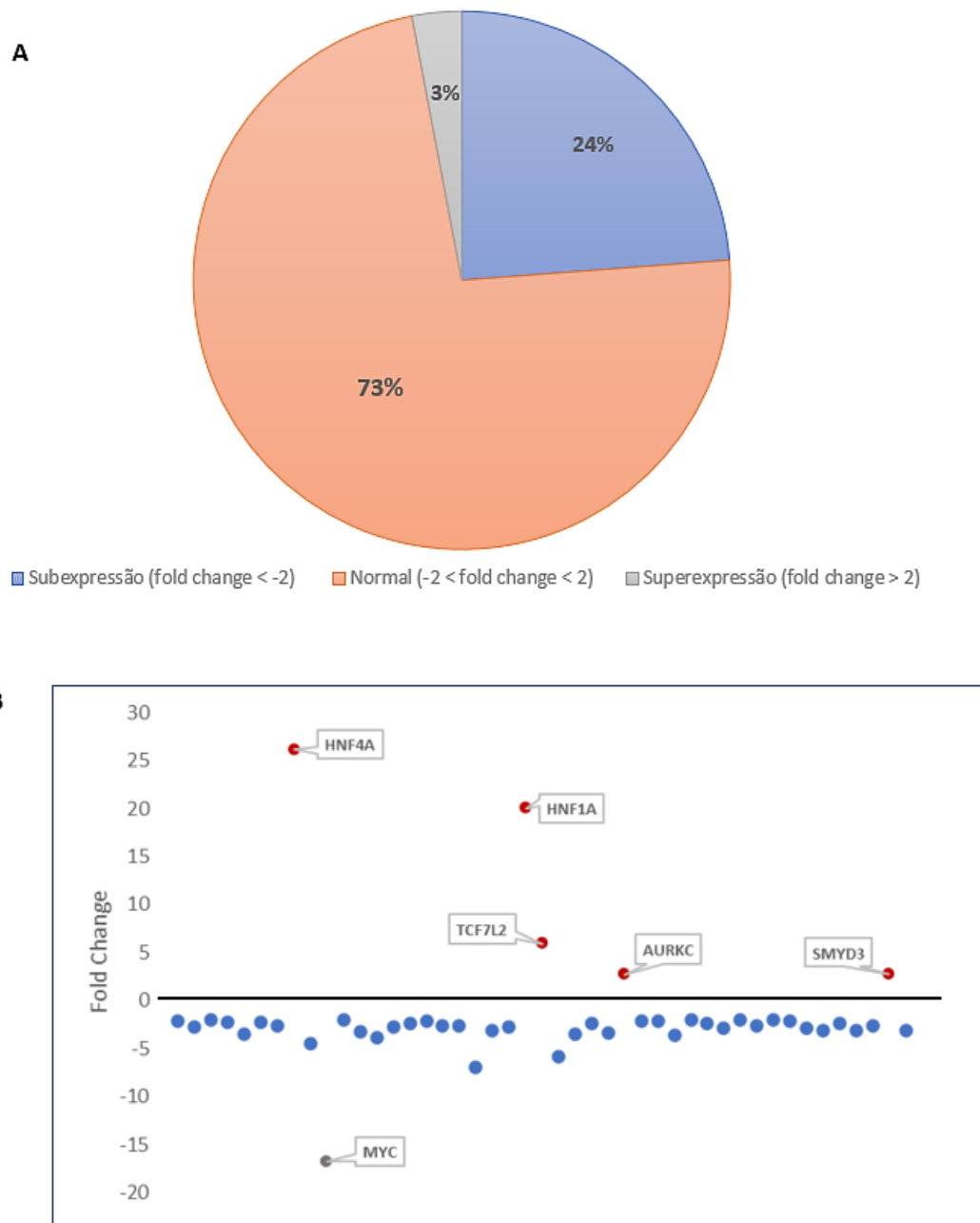


Figura 13. Genes diferencialmente expressos após o tratamento com decitabina em células CD34⁺. Dos 168 genes analisados, aproximadamente 3% estavam superexpressos, sendo 3 fatores de transcrição (HNF4 α , HNF1 α e TCF7L2) e 2 enzimas relacionadas a conformação da cromatina (AURKC e SMYD3). Destaca-se o fator de transcrição MYC com maior hipoeexpressão após tratamento.

Tabela 4. Análise da expressão após tratamento com decitabina em células CD34⁺.

A	Gene	Fold Change
	<i>ATF1</i>	-2,1774
	<i>CREB1</i>	-2,7129
	<i>CTNNA1</i>	-2,0374
	<i>DR1</i>	-2,2516
	<i>ETS2</i>	-3,5217
	<i>GTF2F1</i>	-2,2377
	<i>HIF1A</i>	-2,6233
	<i>HNF4A</i>	26,181
	<i>MYB</i>	-4,5003
	<i>MYC</i>	-16,7418
	<i>NFATC3</i>	-2,0206
	<i>NFYB</i>	-3,2417
	<i>PAX6</i>	-3,8147
	<i>PPARA</i>	-2,7688
	<i>RB1</i>	-2,3532
	<i>REL</i>	-2,1065
	<i>SP1</i>	-2,5802
	<i>SP3</i>	-2,6144
	<i>STAT5A</i>	-7,0249
	<i>STAT5B</i>	-3,0741
	<i>TBP</i>	-2,8089
	<i>HNF1A</i>	20,0219
	<i>TCF7L2</i>	5,9206
	<i>TP53</i>	-5,9048

B	Gene	Fold Change
	<i>KDM1A</i>	-3,5037
	<i>AURKA</i>	-2,413
	<i>AURKB</i>	-3,4336
	<i>AURKC</i>	2,7535
	<i>CARM1</i>	-2,129
	<i>CSRP2BP</i>	-2,1851
	<i>DNMT1</i>	-3,6793
	<i>DOT1L</i>	-2,0575
	<i>EHMT2</i>	-2,4332
	<i>ESCO2</i>	-2,8261
	<i>HDAC1</i>	-2,0115
	<i>HDAC2</i>	-2,604
	<i>HDAC3</i>	-2,0542
	<i>HDAC4</i>	-2,1128
	<i>KAT2A</i>	-2,8428
	<i>PRMT1</i>	-3,1622
	<i>RNF20</i>	-2,3712
	<i>SETD6</i>	-3,129
	<i>SETD8</i>	-2,6531
	<i>SMYD3</i>	2,6875
	<i>WHSC1</i>	-3,0877

4.3 Seleção do fator de transcrição e linhagem celular para silenciamento utilizando a ferramenta de edição CRISPR/Cas9

4.3.1 Tratamento das células HUDEP-2 com 5-aza-2' (decitabina)

Células HUDEP-2 foram tratadas com diferentes concentrações de decitabina (1nM, 10nM, 50nM e 100nM), e coletadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h após a adição da droga, o grupo controle recebeu água estéril em substituição a droga. A avaliação da indução de HbF, foi realizada a partir da quantificação dessa expressão, por imunofluorescência, expressão gênica e proteica (Figura 14).

A concentração preconizada foi 50nM pelo período de 72 h, pelo melhor perfil em relação ao aumento na síntese de HbF/viabilidade. As células HUDEP-2 apresentam um padrão de indução da HbF, semelhante ao observado nas células CD34⁺, tornando possível a utilização dessa linhagem para a avaliação da expressão dos genes encontrados diferencialmente expressos nesse estudo.

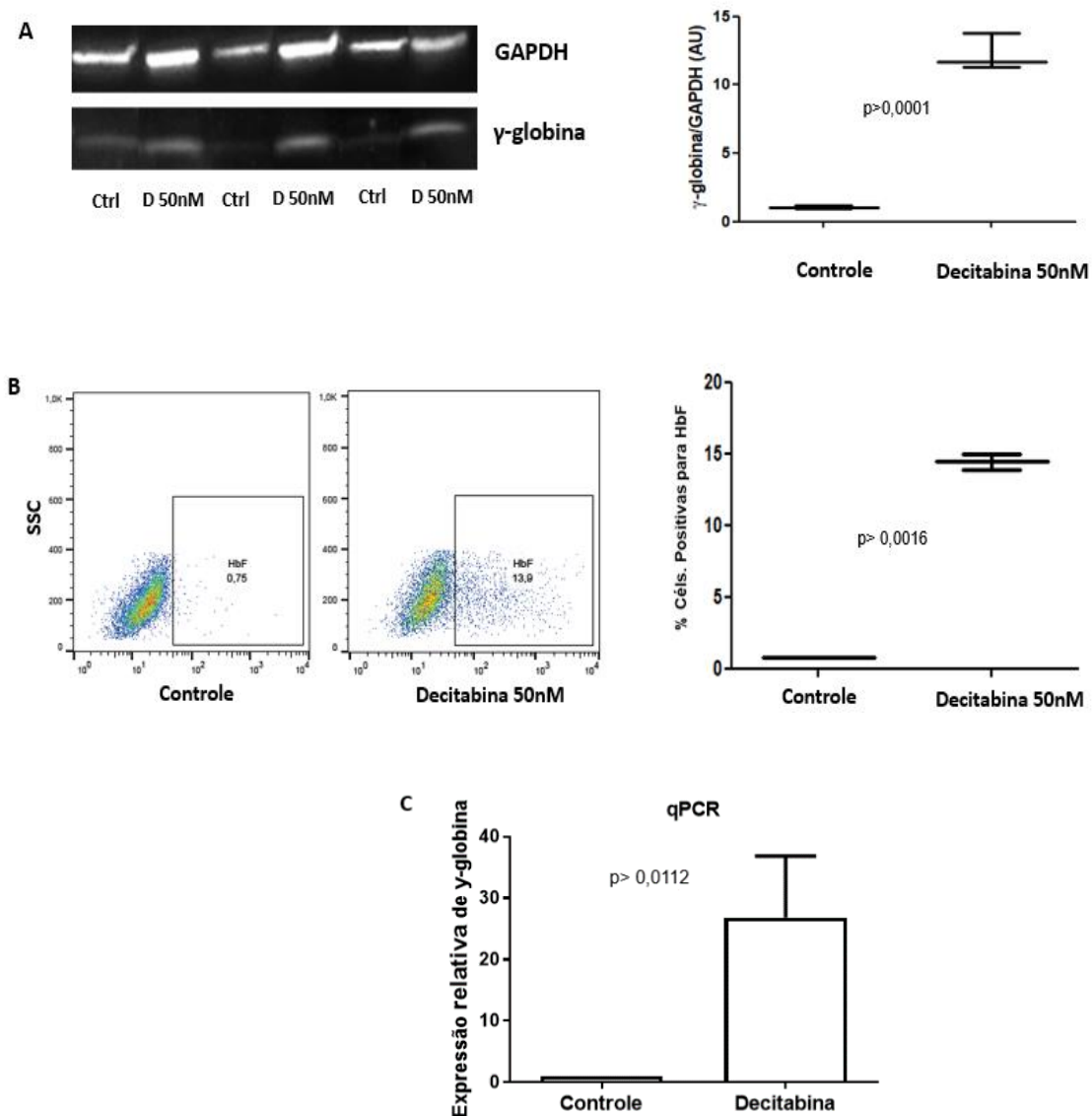


Figura 14. Análise das células HUDEP-2 tratadas com decitabina. A. Quantificação da expressão de globina γ normalizadas por GAPDH, maior expressão proteica nas amostras tratadas com decitabina. **B.** Citometria de células positivas para hemoglobina fetal grupo controle (HbF 0,75%) e tratado (HbF 13,9%). **C.** Expressão gênica de globina γ superexpressa nas células tratadas (n=3).

4.4 CRISPR/Cas9 em células HUDEP-2

O fator de transcrição HNF4 α (fator de hepatócitos nuclear 4 alpha) (Figura 15) foi o candidato para silenciamento em células HUDEP-2, por apresentar o maior diferencial de expressão após a indução de HbF em células CD34⁺.

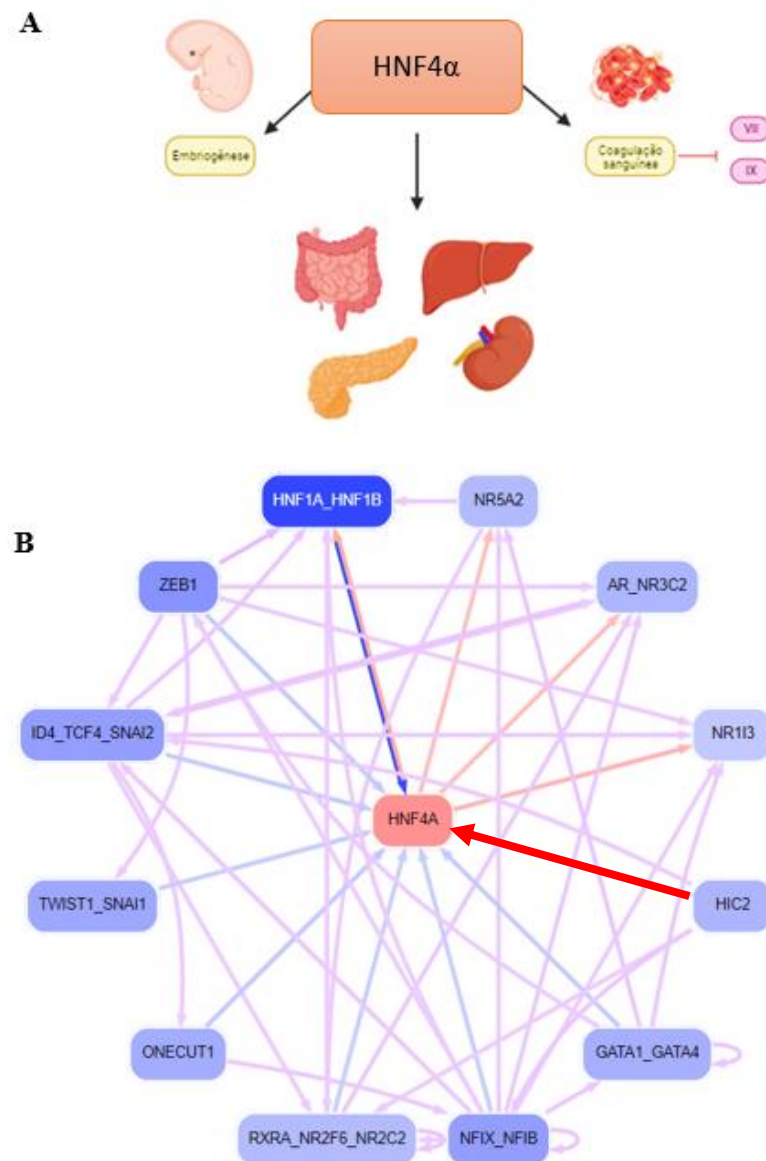


Figura 15. Fator de hepatócitos nuclear 4 alpha. **A.** HNF4 α participa do processo de embriogênese, no desenvolvimento do intestino, fígado, pâncreas e rim e no processo de coagulação sanguínea. **B.** Rede regulatória primária de interação do HNF4 α , com um importante destaque para o gene HIC2, um importante repressor de BCL11A. (A. Elaborado pela autora, 2023 - BioRender; B. Adaptado de ismara.unibas.ch/HNF4A.html)

Os *guides* RNA *Hs. Cas9.HNF4α*. AA (CGGGATCAACGGCGACATTCGGG) e *Hs. Cas9.HNF4α*. AB(GGGACCGGATCAGCACTCGAAGG) foram sintetizados pela IDT, selecionados de acordo com o melhor *score* (maior precisão/menor possibilidade de *off targets*).

Os *guides* selecionados apresentaram especificidade para todas as isoformas do gene alvo (Figura 16). Após padronização do método contendo o *guide* e a proteína Cas9, responsável pelo corte no DNA na célula, as células foram nucleofectadas com o complexo (Figura 17).



Figura 16. Alinhamento das isoformas do gene HNF4α. A. Guide AB região do 4º éxon . B. Guide AA região do 5º éxon.

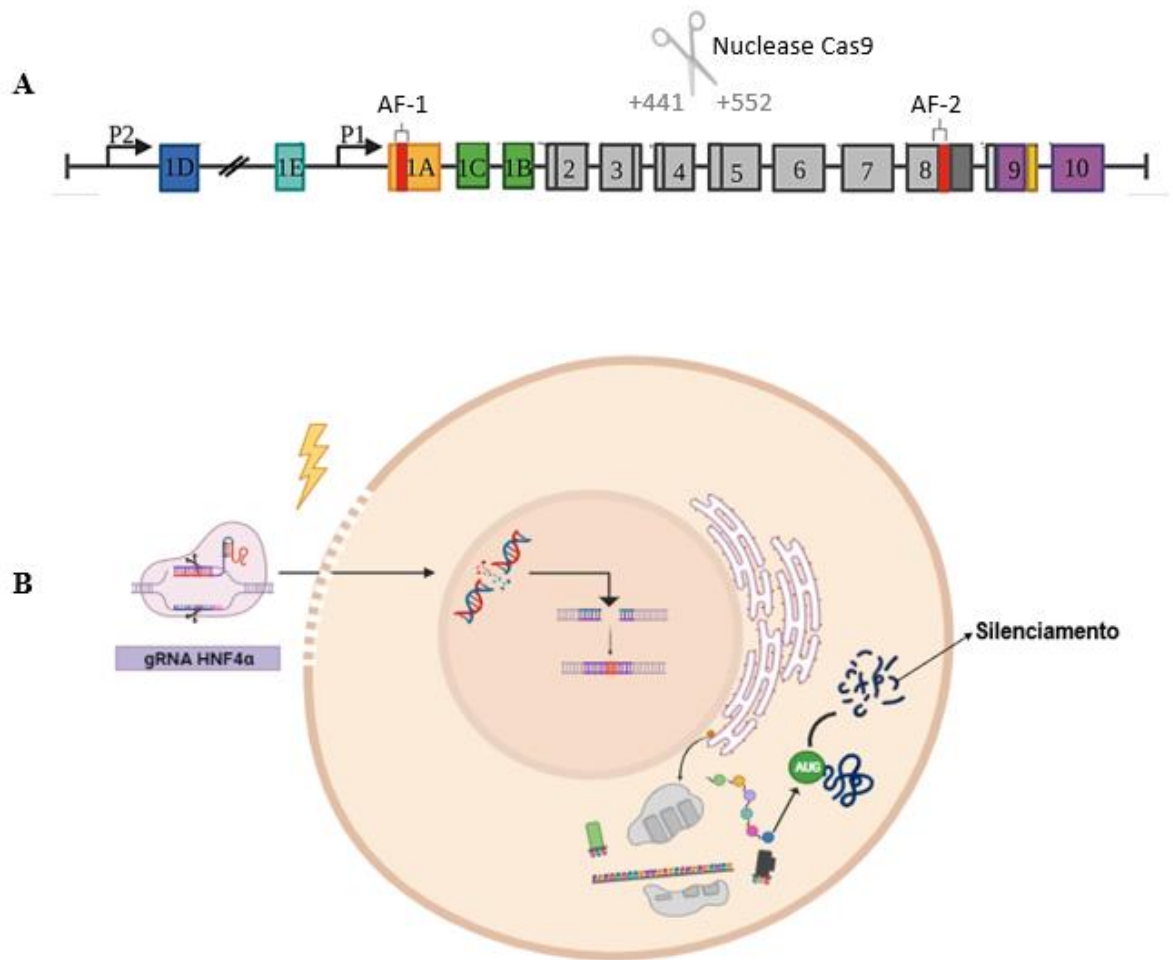


Figura 17. Representação esquemática da técnica CRISPR/Cas9. A. Gene HNF4α possui dois promotores (P1 e P2) que produzem 12 isoformas através de splicing alternativo (Adaptado de HERERA-PULIDO *et al.*, 2023) B. Modelo ilustrativo da entrega do RNA guia e da Cas9, ativação da via de junções não homólogas, seguido pelo processo de transcrição e tradução de uma proteína não funcional. Elaborado pela autora, 2023 – BioRender.

A HUDEP-2 apresenta auto fluorescência laranja/vermelho, resultado da edição genética realizada durante o processo de transformação das células do cordão umbilical CD34⁺ em células imortalizadas. A incorporação do complexo RNPCas9+RNAguias (Figura 18) pode ser visualizado 24 horas após a nucleofecção.

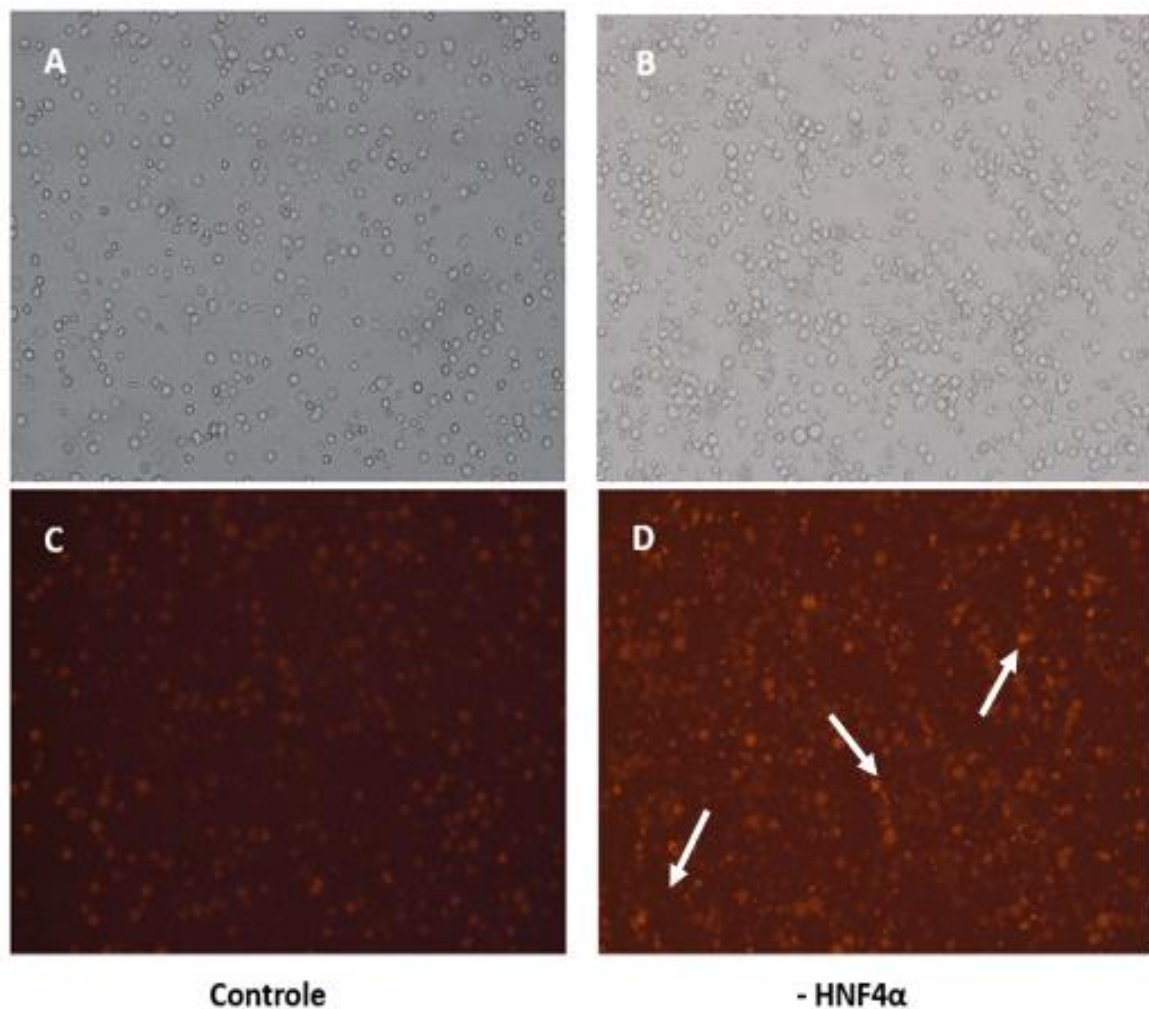


Figura 18. Microscopia de Fluorescência invertida das células HUDEP-2 após nucleofecção. A e B Células controle e células nucleofectadas para o fator de transcrição HNF4 α em campo claro. C e D na fluorescência vermelha, observa-se pontos mais intensos (setas brancas) no citoplasma das células referentes ao pigmento presente na solução de nucleofecção ATTO 550 IDT nas células que receberam o complexo gRNA+Cas9. Aumento de 20x.

Após 48 horas da nucleofecção, células que foram editadas para HNF4 α foram sequenciadas para análise da eficiência da edição gênica. Na Figura 19, ocorrência de trocas de bases na sequência alvo. Entretanto, nesse período pós nucleofecção não houve alteração significativas dos níveis da HbF mensurados por citometria de fluxo (Figura 20). Nesse protocolo 1×10^6 células passam pelo processo de nucleofecção, porém o complexo de edição não atinge todas as células, além da limitação da eficiência que o próprio RNA guia apresenta.

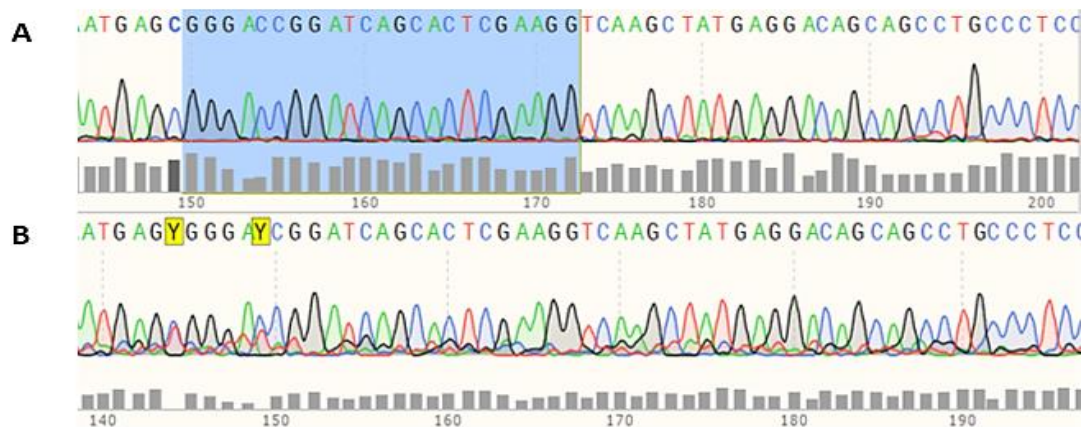


Figura 19. Eletroferograma da região referente ao HNF4 α 48 horas pós nucleofecção. A. Controle. B. Pool -HNF4 α com alterações de bases .

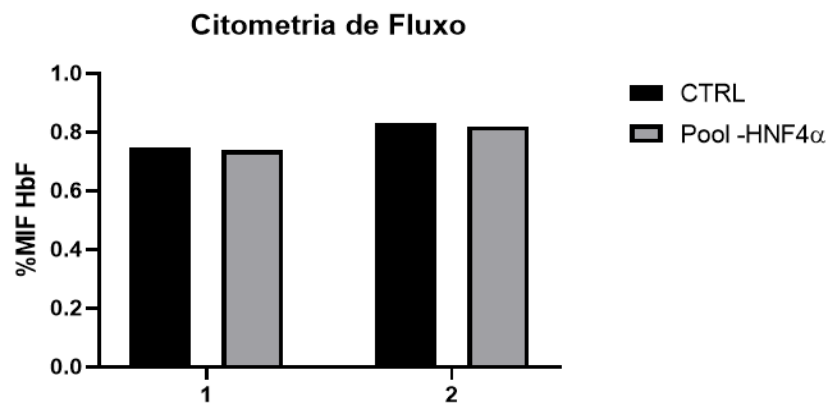


Figura 20. Intensidade de fluorescência para HbF 48 horas após a nucleofecção do guide HNF4 α . Controle e células nucleofectadas para o fator HNF4 α .

Diante dos resultados obtidos na análise de todas as células nucleofectadas, optou-se pelo isolamento clonal mais homogêneo possível, as células nucleofectadas foram divididas em placa de 96 poços, 48 h após a nucleofecção, nas concentrações aproximadas de 1/20 μ L, 10/20 μ L, 20/50 μ L e 50 células suspensas em 100 μ L de meio SFEM suplementado. Os resultados apresentados nesse trabalho foram resultados da proporção de 20 a 50 células por poço expandidas inicialmente. As demais concentrações não permitiram a proliferação celular, limitando a análise da edição gênica. Por isso, os resultados apresentados do silenciamento do gene HNF4 α , foram análises da expansão de células heterogêneas (editadas e não editadas para HNF4 α), não sendo possível mensurar a quantidade total de células silenciadas nesse trabalho; para essas populações utilizou-se a nomenclatura de *pools* celulares.

4.5 Validação da edição gênica e análise da eficiência de edição

Após a expansão clonal, com extração do DNA genômico, amplificou-se por PCR o fragmento da região do éxon 4 (FOWARD: CACCAGCTGAGTTAGAGGCC/REVERSE: TGAAGACTCTGCTTGGCCTG) com tamanho de 1560 pb, essas amostras foram sequenciadas (Figura 21), com identificação de 5 *pools* apresentando alterações de base na região de corte. A quantificação da eficiência de corte, com inserções ou deleções, foi realizado utilizando a plataforma TIDE (Figura 22), que compara as sequências da amostra controle com as amostras editadas.

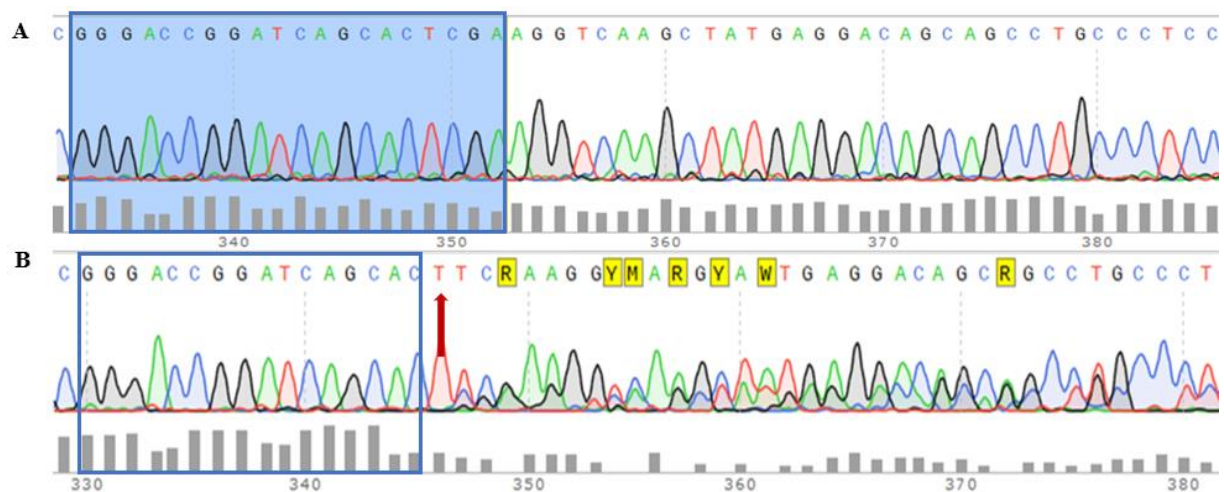


Figura 21. Sequenciamento do cromossomo 20, locus gênico HNF4α. A. Sequência controle. B. Sequência com *indel* na região alvo do gene HNF4α na posição dos cortes gerados pela Cas9. (Sequência do RNA guia: GGGACCGGATCAGCACTCGA AGG).

A alteração na sequência de bases provoca alteração na leitura do DNA, possibilitando a transcrição de um aminoácido de parada precoce ou substituição do aminoácido, com consequente interrupção do processo de tradução proteica ou gerando uma proteína truncada não-funcional. A eficiência da edição gênica pode ser visualizada na figura 23, calculada na plataforma TIDE.

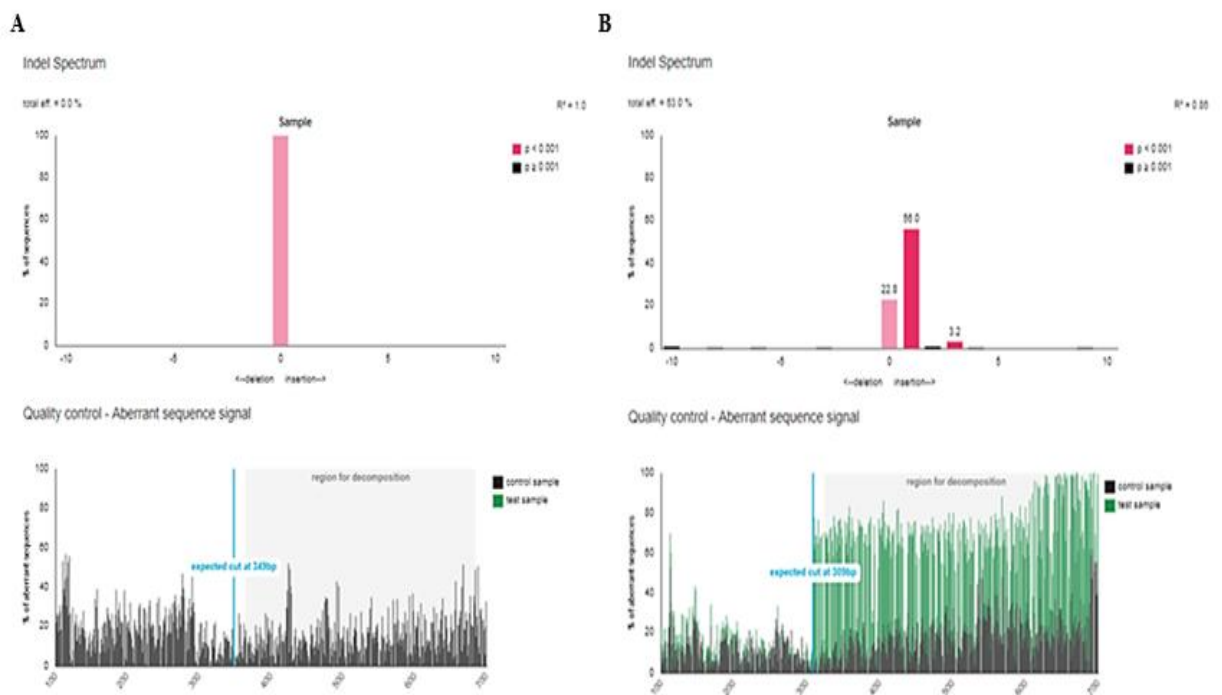
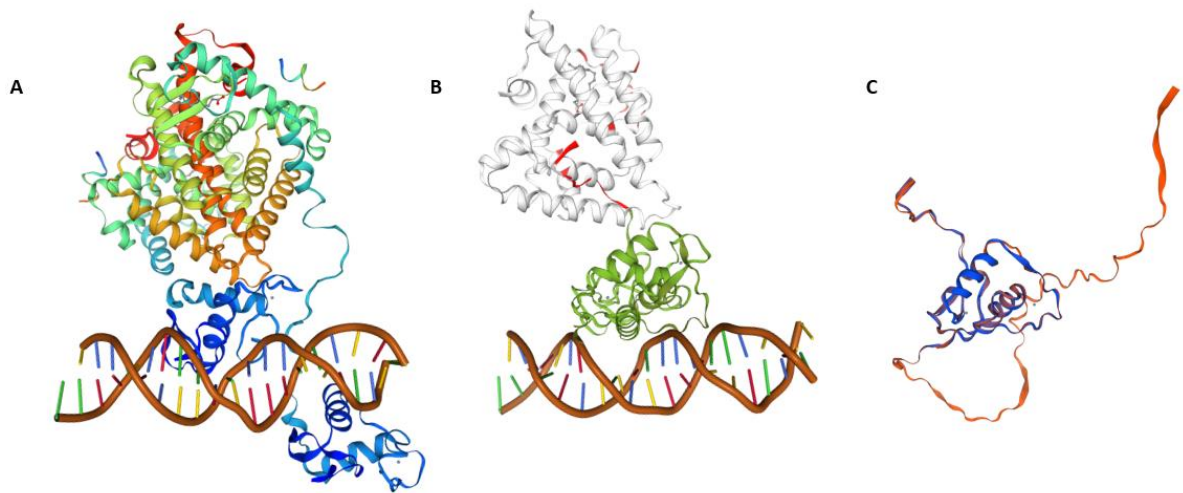


Figura 22. Eficiência de edição da Cas9. A. *Pool* sem alteração de base na região esperada de corte pela Cas9. B. *Pool* apresentando 63% de eficiência de corte, com inserções e deleções estimadas.

Referência AA	GCCC GAATGTCGCCGTTGATCCCGAGACGGGGAGGTGATCTTCGAGAGATAC	HNF4α
Referência AB	GAATGAGCGGGACCGGATCAGCACTCGAAGGTCAAGCTATGAGGACAGCAGCC	

Clone A	GAATGAGCGGGACCGGATCAGCACTCRAAGGYMARGYTAWTGAGGACAGCR----GCCT	63%
Clone B	GAATGAGCGGGACCGGATCAGCACTCAARARGATTGCCAGS—ATCRCAGATGYGTGTGA	27%
Clone C	GAATGAGCGGGACCGGATCAGCACTCSRAAGKYCAGG-TTATGAGGACGGMA----SCCT	39%
Clone D	GAATGAGCGGGACCGGATCAGCACTCSAAGGKCMAGG--TATGARGACMGCM----G-CT	55%
Clone E	GCCCGAATGTC SYC TTGATCCCGGAKACKGSKGAAGTGATCTTCGAAAGATACRAGA	15%

Figura 23. Alinhamento dos *pools* editados para o gene HNF4α com a sequência controle. Observa-se a eficiência de corte dos clones na região referente aos RNAs guias, em comparação a sequência do gene sem alteração. Em amarelo sequência PAM e em vermelho troca de bases na sequência dos *pools*.



24. Estrutura da Proteína HNF4 α . **A.** Proteína ligada ao DNA e peptídeos derivados do coativador, essa estrutura atua como um sistema de transmissão, capaz de propagar sinais entre os domínios de ligação ao ligante e de ligação ao DNA (CHANDRA *et al.*, 2013). **B.** Proteína HNF4 α sobreposta pela proteína resultante da edição com CRISPR/Cas9, região em cinza não traduzida nos *pools*. **C.** Modelagem da sequência de aminoácidos do *pool* -HNF4 α . (Imagens geradas pela plataforma SWISS-MODEL)

4.6 Validação do silenciamento do gene HNF4 α

As amostras que apresentaram modificações na sequência alvo, foram cultivadas e expandidas até atingirem o número necessário de células para os procedimentos de validação do silenciamento e mensuração da HbF. A proteína total foi extraída e analisada por Western Blot utilizando os anticorpos Gamma globina, GAPDH e HNF4 α (Figura 25). O RNA foi extraído e transcrito para a quantificação da expressão gênica por qPCR dos mesmos alvos proteicos (Figura 26), os *pools* apresentaram menores expressões para o fator de transcrição HNF4 α tanto ao nível proteico quanto ao nível transcricional.

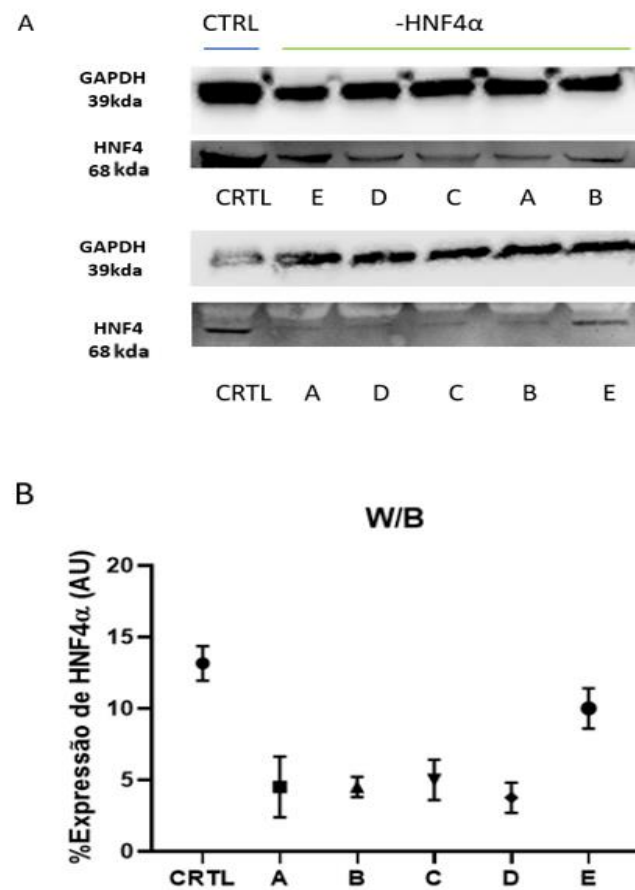


Figura 25. Expressão proteica HNF4α **A.** Western blot das células controle e HNF4α silenciadas. **B.** Quantificação da expressão da proteína do HNF4α corrigida pela expressão de GAPDH. As populações editadas para esse fator de transcrição apresentaram variada expressão entre elas, no entanto, com considerável diminuição na expressão em relação a HUDEP-2 controle. Análise estatística ANOVA $p=0,0023$.

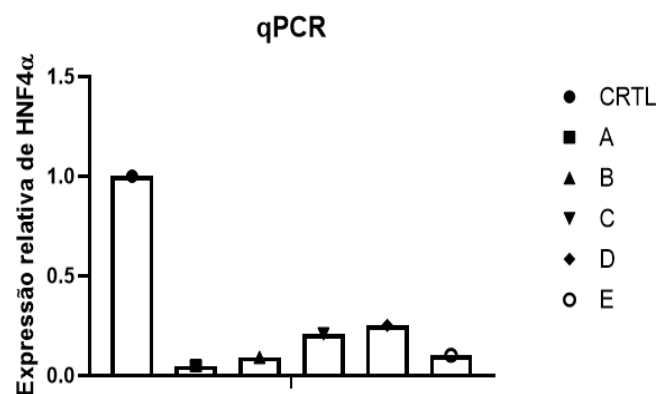


Figura 26. PCR quantitativo da expressão gênica HNF4α. A diminuição da expressão do HNF4α foi significativa em relação ao controle, mostrando o sucesso no silenciamento desse gene (Normalizado por GAPDH).

4.7 Avaliação dos níveis da HbF após o silenciamento do HNF4 α

As células HUDEP-2 expressam predominantemente HbA e se assemelham mais às células eritroides adultas, com *pellets* em tons de branco/rosa. As células que sofreram edição apresentaram considerável mudança no fenótipo celular (Figura 27),

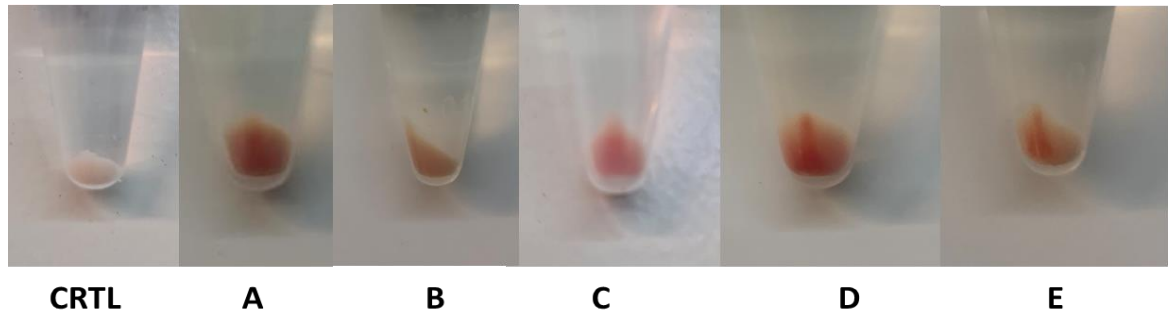


Figura 27. Pellets de células HUDEP-2 indiferenciadas. Controle e *pools* silenciados para o HNF4 α expressando diferentes concentrações da hemoglobina.

A avaliação da expressão proteica da HbF (Figura 28) nas populações editadas foi comparada a fluorescência positiva para HbF nas células marcadas para o anticorpo anti-HbF, utilizando citometria de fluxo, esses *pools* - HNF4 α , apresentaram significativamente mais HbF em comparação ao controle (Figura 29) com índices de expressões variáveis entre os *pools*. Na análise estatística os *pools* apresentaram na população A-10,5% $\pm$ 2,8, B-3,3 $\pm$ 1,4, C-7,9 $\pm$ 2,1, D-4,1 $\pm$ 2,15 e E-6,9 $\pm$ 2,3, enquanto expressão nas amostras controle foi de 0,7 $\pm$ 0,1.

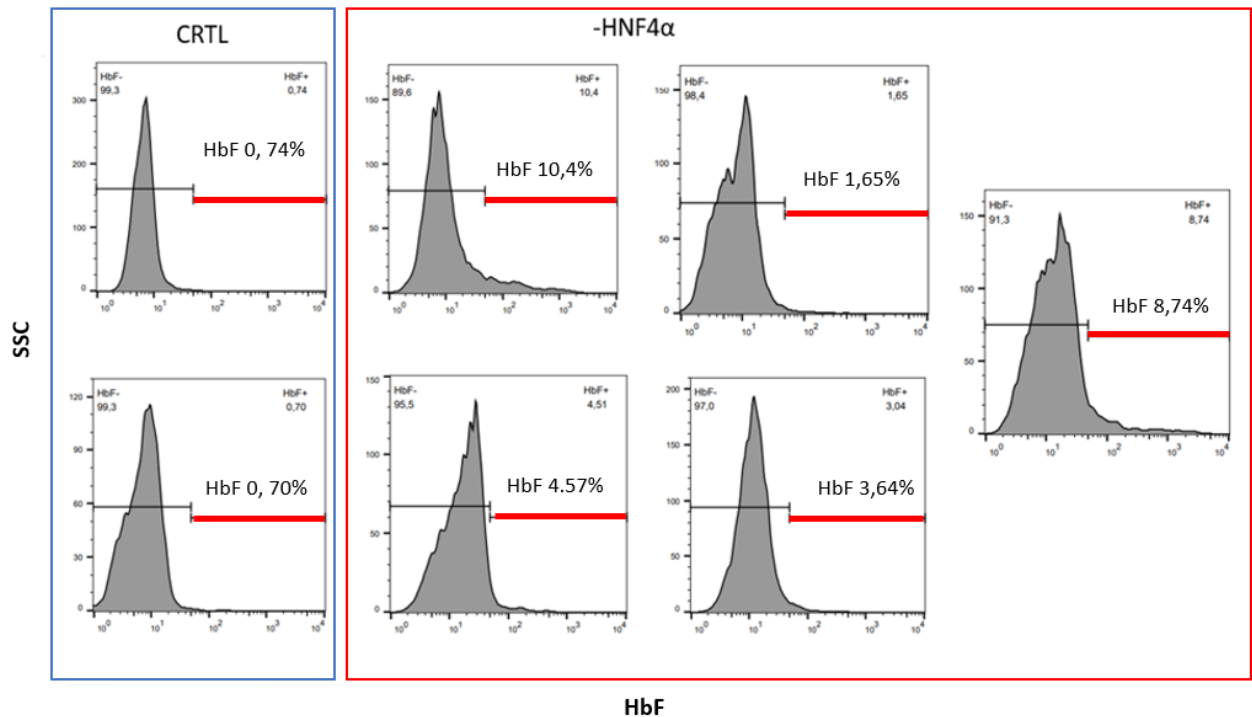


Figura 28. Citometria de Fluxo para HbF nas células HUDEP-2. A produção da HbF foi mensurada utilizando a proporção de células positivas para HbF (Anticorpo anti-HbF conjugado com FITC) de cada *pool* (quadro vermelho) em comparação ao controle (quadro azul). Os 5 *pools* com expressão diminuída do gene HNF4α apresentam ampla variabilidade na quantidade de células positivas para HbF.

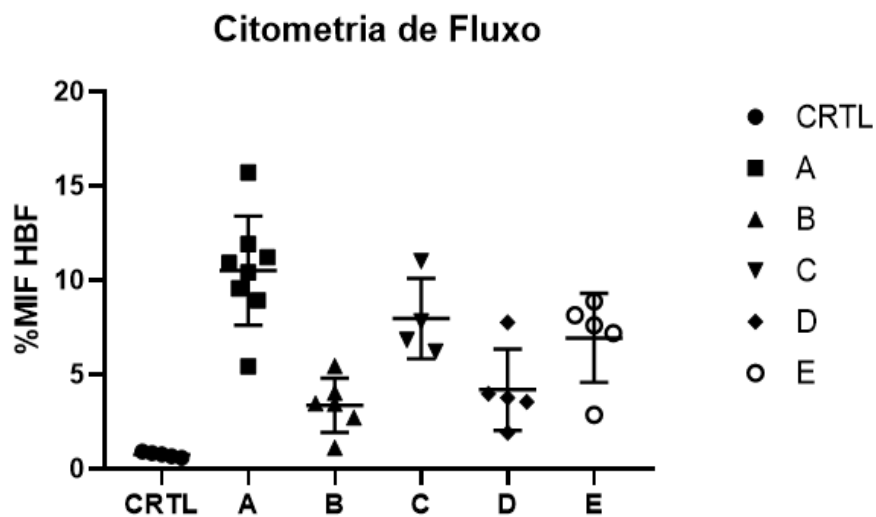


Figura 29. Intensidade de fluorescência média dos clones editados para HNF4α em relação ao controle (HUDEP, n=5). A produção da HbF foi avaliada por citometria de fluxo em diversos momentos pós-confirmação do silenciamento para HNF4α. Observa-se a variação na expressão de HbF entre as populações, com um padrão de expressão para cada *pool*, a população A seguida da população C apresentam maior expressão de HbF em relação ao controle HUDEP-2. Análise estatística ANOVA $p=0,0001$.

4.8 Análise morfológica das células silenciadas

Durante o cultivo das células foram realizados experimentos para análise morfológica dessas células editadas, utilizando citospin e microscopia de imagem (AMNIS). A observação da morfologia celular foi utilizada para identificar possíveis alterações, relacionadas ao processo de edição genética, nas células que sofreram edição genética e apresentavam silenciamento para o gene HNF4 α . Na figura 30, observa-se a morfologia das células controle e das células silenciadas. A variabilidade de células em estágios de diferenciação é similar tanto no controle quanto nas células -HNF4 α , nota-se a presença de células precursoras eritroides, pró-eritroblastos, eritroblastos basófilos e policromáticos, sem alterações na morfologia celular.

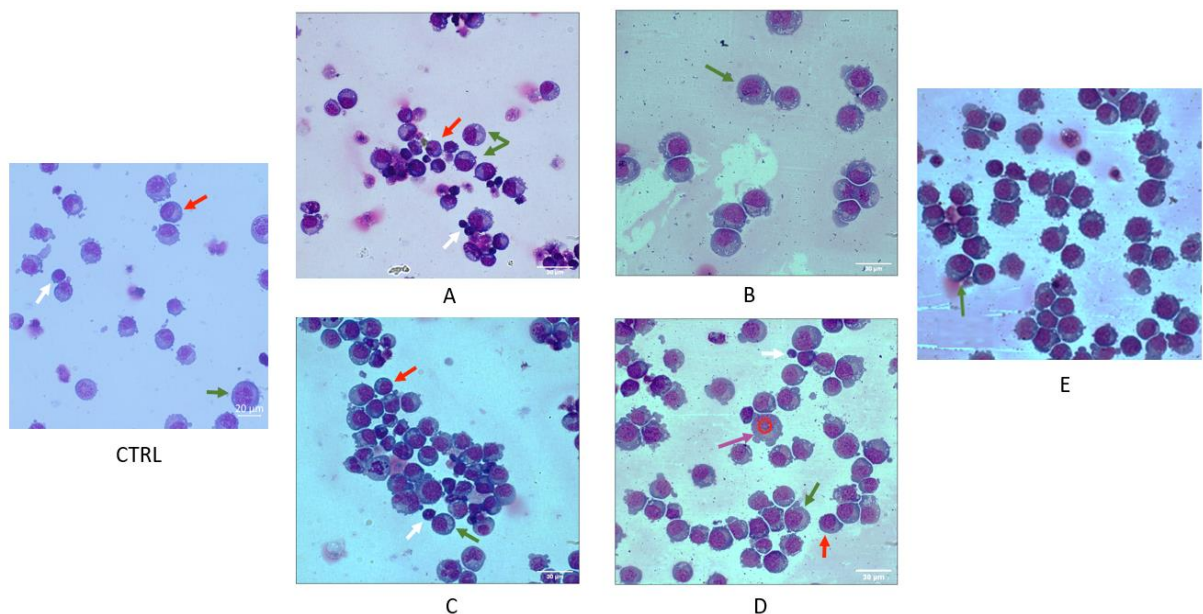


Figura 30. Microscopia das células HUDEP-2, controle e editadas -HNF4 α . A partir da análise da morfologia observa-se células semelhantes no grupo controle e nos *pools*. Nota-se a presença de pró-eritroblastos, eritroblastos policromáticos (seta vermelha), basófilos (seta verde) ortocromático (seta branca), aspectos e diferenciação celular correspondente com a cultura de células HUDEP-2, observa-se células em divisão celular (telófase). Aumento 100x.

Para análise individual da morfologia celular e a avaliação da presença e concentração da hemoglobina fetal utilizou-se a citometria de fluxo AMNIS. A célula HUDEP-2 apresenta níveis de HbF semelhante a células hematopoiéticas adultas, no controle (Figura 31) visualizou-se esse padrão, pouca ou ausente expressão de HbF, enquanto nas células silenciadas para HNF4 α foi nítida a fluorescência positiva para HbF e maior percentual positivo para HbF, a partir dessa análise destaca-se o aumento nos níveis da HbF nas células silenciadas para HNF4 α .

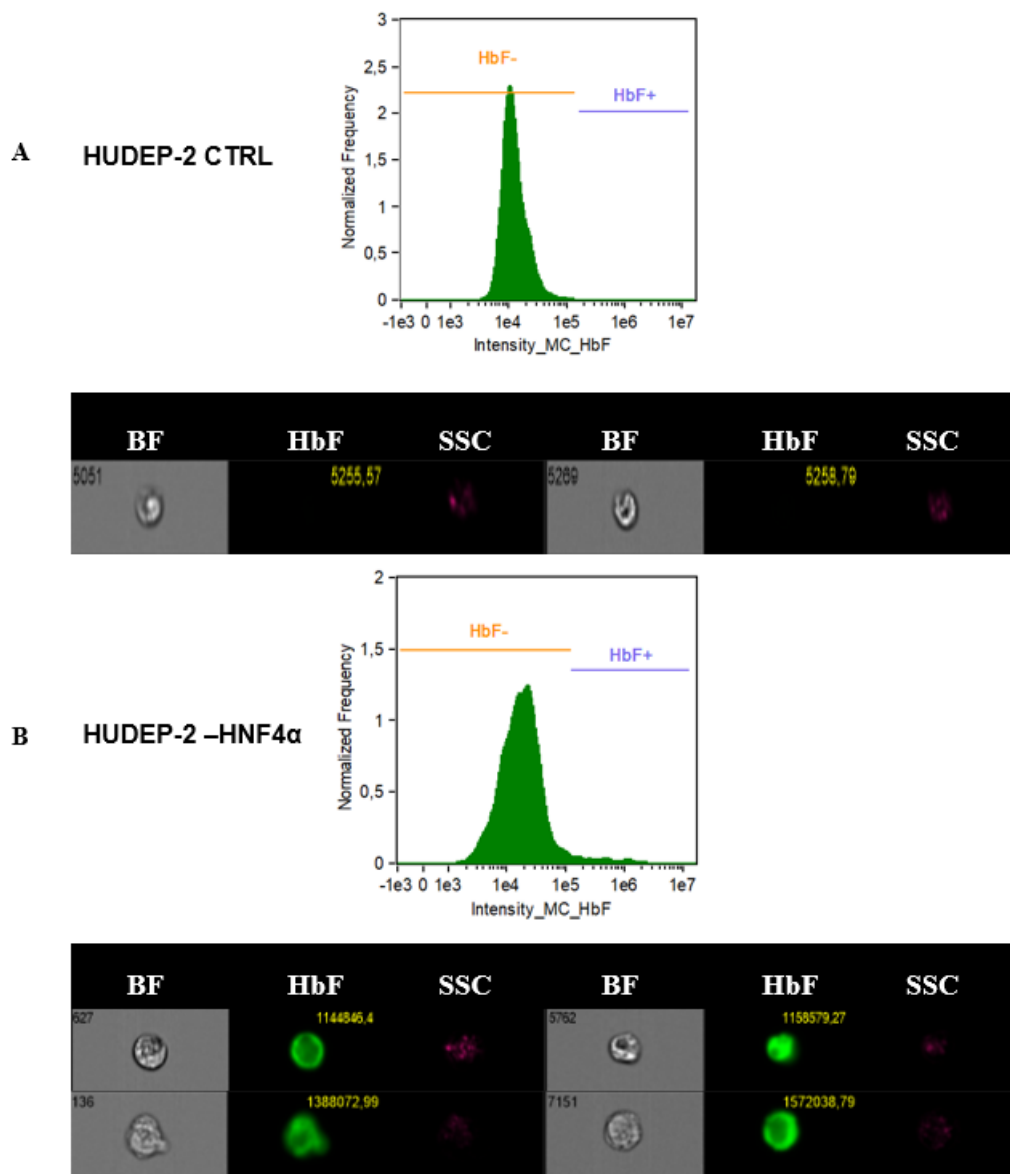


Figura 31. Microscopia de imagem – AMNIS, em células controle e silenciadas para HNF4 α . **A.** Células HUDEP-2 controle isoladas em campo claro (BF). No canal referente a fluorescência para HbF não é possível identificar marcação. **B.** Células -HNF4 α em campo claro apresenta morfologia semelhante ao controle, com intensa marcação para HbF (marcação verde).

A expressão da globina γ nas células foi avaliada por Western Blot (Figura 32) e por qPCR (Figura 33) nas populações controle e silenciadas para HNF4 α . Confirmando os resultados anteriores, onde as células que apresentaram alterações na sequência de nucleotídeos na região codificante do gene HNF4 α apresentaram maior expressão da HbF.

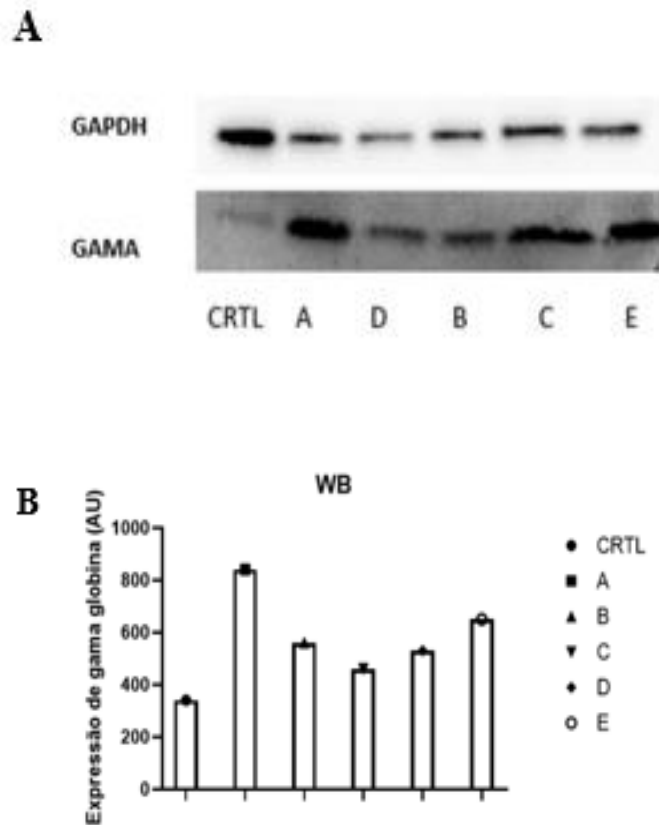


Figura 32. Quantificação da proteína gama. A. Western blot das células editadas para HNF4 α e controle para a proteína gama e GAPDH. B. Quantificação da expressão de gama globina corrigida pela expressão de GAPDH.

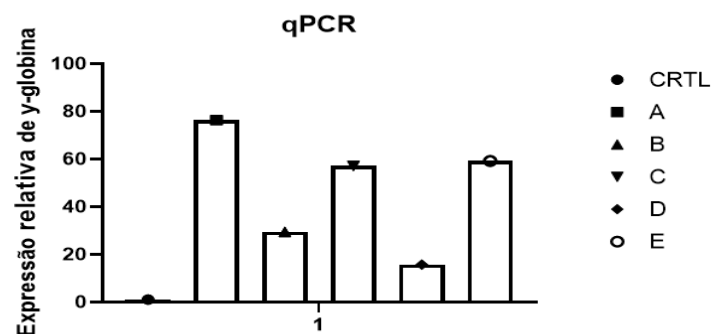


Figura 33. PCR quantitativo da expressão gênica do gene HBG1. Nota-se expressivo aumento da globina gama nas amostras silenciadas para HNF4 α em comparação HUDEP-2 não editada. (Normalização por GAPDH)

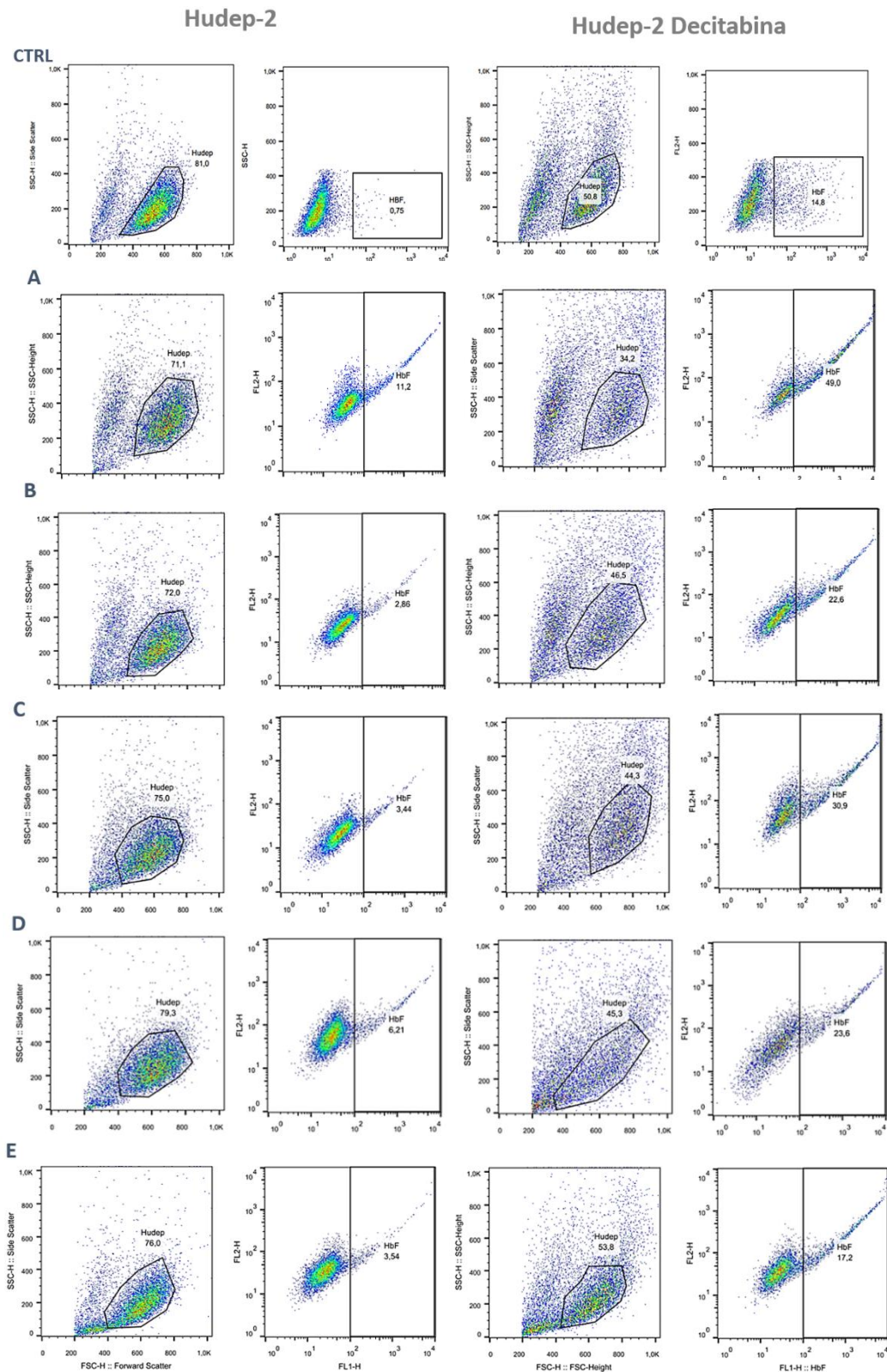


Figura 34. Citometria de Fluxo. Células Hudep-2 controle e silenciadas para HNF4 α marcadas para HbF, colunas lado esquerdo (sem tratamento – controle), colunas do lado direito tratadas com decitabina 50nM por 72 horas. Os *pools* tratados aumentaram a produção de HbF após tratamento.

4.9 Principais funções celulares compartilhada pelos genes HBG e HNF4 α

Buscando identificar a possível interação do fator de transcrição HNF4 α e a regulação do gene HBG (Figura 35), utilizou-se análise *in silico*, dados de enriquecimento funcional das 10 principais funções celulares compartilhadas entre os genes. Figura gerada a partir da plataforma ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go>), com dados fornecidos pelo Gene Ontology (<http://geneontology.org/>).

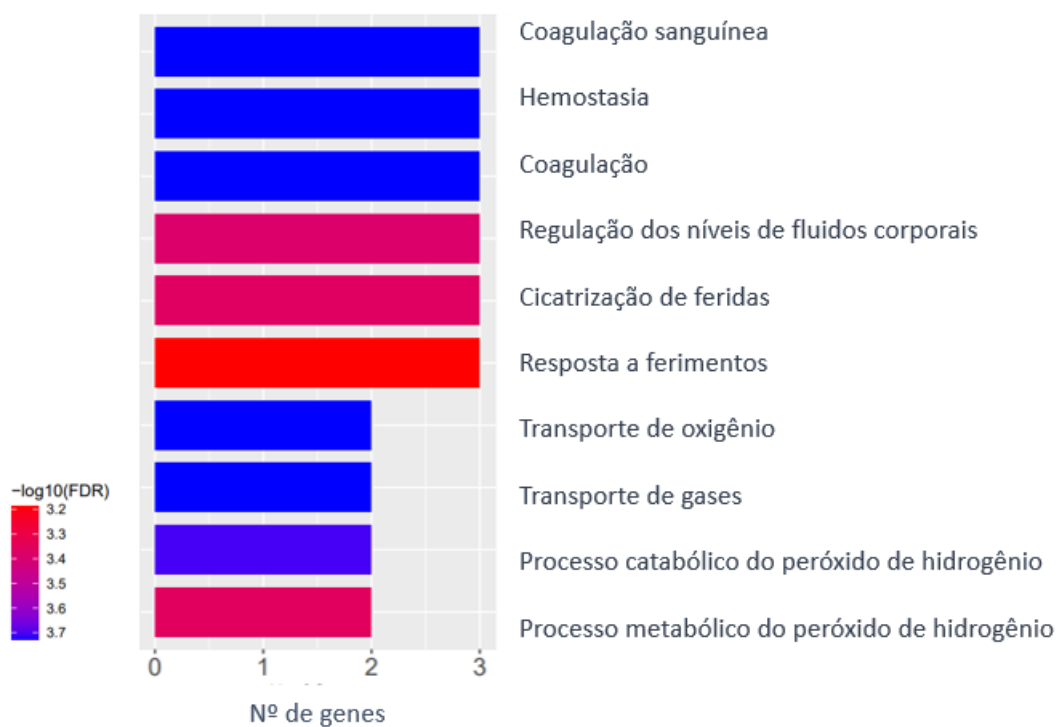


Figura 35. Gráfico de Enriquecimento Funcional dos genes HBG1, HBG2 e HNF4 α . Principais funções moleculares dos genes HBG1, HBG2 e HNF4 α . Dados normalizados com o -Log10.

5. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento biológico, as células transitam pelo estágio embrionário, fetal, até o momento que adquirem as características dos tecidos maduros. Os mecanismos que impulsionam as mudanças durante este processo, ainda não são completamente elucidados. Entretanto, alguns mecanismos regulatórios já descritos estão atuando, durante esse processo, há ativação ou inativação de vias regulatórias orquestradas por uma série de fatores de transcrição, algumas regiões são mais acessíveis (eucromatina) a determinadas interações de fatores transcricionais que reconhecem e se ligam a essas sequências no DNA durante o estágio fetal, e podem estar indisponíveis no estágio posterior (heterocromatina). A hemoglobina fetal é um exemplo dessa regulação durante o desenvolvimento, a região correspondente aos genes HBGs na fase adulta estão metiladas, conseqüentemente inativas à transcrição. A metilação do DNA é um dos principais mecanismos epigenéticos envolvidos na expressão gênica, estabilidade genômica e na diferenciação celular (LIU *et al.*, 2023).

No presente trabalho, investigou-se a ação da decitabina, fármaco repressor da metilação do DNA, sobre a regulação da HbF em células eritroides primárias, buscando novos alvos gênicos ainda não associados com essa regulação. A metabolização desse composto, acontece por fosforilação sequencial, realizada pela ação das enzimas fosfoquinase, com mudanças estruturais, até a forma passível de incorporação ao DNA, umas das principais conseqüências desse processo é a inibição das DNA metiltransferases (DNMT), resultando em hipometilação de regiões que estavam anteriormente metiladas no genoma.

A DNMT1 é a principal metiltransferase responsável pela adição de um grupamento metil (CH_3) na base C (citosina) nas ilhas CpG após a replicação do DNA, sendo responsável pela manutenção do padrão de metilação para as células-filhas. Condizente com as informações na literatura acerca dessa regulação, houve a repressão do gene DNMT1, subexpresso nas culturas de células CD34⁺ tratadas com decitabina, na ausência da DNMT1 não ocorre a adição do grupo metil na região promotora do gene HBG1, permitindo a transcrição deste gene, com aumento direto dos níveis da HbF (PARKER *et al.*, 2021)

A família DNMT é composta pela DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, as duas últimas são significativamente expressas em células indiferenciadas, com atuação crítica durante o desenvolvimento humano, a interação funcional entre DNMT3A e DNMT3B é essencial tanto na regulação epigenética durante o desenvolvimento, quanto para o desenvolvimento de neoplasias. Estudos de análise estrutural dos complexos DNMT3A e DNMT3B, associam essas enzimas preferencialmente ligadas aos nucleossomos, sem envolvimento direto na metilação do DNA, entretanto esse processo ainda não está completamente descrito (XU *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020). Nesse trabalho, não foi quantificada a expressão das DNMT3, que poderiam indicar se houve alterações na conformação do nucleossomo em regiões onde elas se ligam.

Mabaera *et al.*, 2008, testaram o papel da hipometilação do DNA na indução da expressão da globina γ pela 5-azacitidina, utilizando RNA de interferência (*siRNA*) para regulação negativa do gene DNMT1 para induzir a expressão da globina γ em progenitores eritroides humanos, sugerem que a diminuição na metilação do promotor globina γ induzidas pela ação da droga 5-azacitidina não é o principal causa da indução do gene HBG e da produção de hemoglobina fetal (HbF), com o aumento da síntese da HbF sendo um efeito secundário relacionado à ativação do HBG relacionado a outros agentes. No nosso estudo, utilizou o composto 5-aza-2', oriundo da família dos análogos de citidina e com perfil epigenético semelhante a 5-aza, observou-se expressão diminuída do DNMT1, acompanhada de alterações de expressão de diversos genes, não sendo possível definir um único mecanismo envolvido ao utilizar drogas epigenéticas como a decitabina para síntese de HbF.

Modificações epigenéticas realizadas pela família HDAC (histona deacetilase) que atuam removendo grupos acetil (CH_3CO) em histonas, participam da compactação e silenciamento de determinadas regiões do DNA. Quando há o bloqueio da atividade dessas enzimas, através dos inibidores de HDAC, observa-se um aumento na acetilação dessas histonas, permitindo a associação com o DNA, tornando as regiões codificantes permissivas para a transcrição (ESRICK *et al.*, 2015). BRADNER *et al.*, 2010, demonstraram que a diminuição na expressão de HDAC1 ou HDAC2 é suficiente para indução de HbF, como observado nesse estudo nas células CD34⁺ tratadas com decitabina. Adicionalmente, foi observado a subexpressão das enzimas HDAC3 e HDAC4 na nossa análise, enquanto a HDAC9 foi identificada superexpressa em relação ao controle após o tratamento.

Algumas enzimas encontradas diferencialmente expressas anteriormente nesse ensaio, como: PRMT1, TCF7L2, c-MYC, c-MYB, SP1, STAT5, SETD8 e EHMT2 já são descritas na regulação da HbF, no entanto, ainda não estavam relacionadas com o tratamento da decitabina em células primárias eritroides (VAN DIJK *et al.*, 2010; BAUER *et al.*, 2012; RENNEVILLE *et al.*, 2015).

A família de PRMTs é composta por 9 tipos de proteínas argininas metiltransferases, importantes reguladores epigenéticos, adicionam o grupo metil (CH_3) na cadeia lateral da arginina em proteínas histonas e não histonas, essa região frequentemente se projeta das superfícies das proteínas para permitir ligações e interações com outras proteínas e ácidos nucleicos. Modificações pós transcricionais (MPT) podem alterar processos biológicos como interações de proteínas, sinalizações celulares, diferenciação celular, reparo do DNA, splicing, transcrição e consequentemente na tradução do mRNA (GUCCIONE; RICHARD 2019; WANG *et al.*, 2021). Os resultados da subexpressão encontrados nesse estudo, são condizentes com os estudos relacionados ao silenciamento dessas enzimas.

PRMT1 é responsável pela metilação da arg-3 da histona H4 (H4R3me2a), associado com a regulação da hemoglobina fetal pela interação com o gene FOP (*Friend of PRMT1*). Seu silenciamento é acompanhado pelo aumento da expressão do gene HBG1 em cultura de células primárias eritroides, com a hipótese na qual alterações estruturais na histona H4, permitem a exposição da região *enhancer* e promotora do gene HBG. (VAN DIJK *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2020). Assim como PRMT1, PRMT4 (CARM1-arginina metiltransferase 1 associada ao coativador), subexpresso nesse ensaio, é associado com a regulação da globina γ . O silenciamento de CARM1 em células K562, resultou no aumento da síntese de HbF. Adicionalmente CARM1 metila PRMT5 para reprimir a expressão do gene da globina γ em células K562, a metilação do PRMT5 desempenha um papel crítico para repressão da expressão do gene HBG (BEDFORD; CLARKE, 2009; NIE *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2013).

SETDs são descritas pelo seu papel na regulação da metilação de histonas. SETD8, é a única histona metiltransferase capaz de metilar a histona H4 na posição da lisina 20 (H4K20me1), estando expressa em níveis significativamente mais altos nas células eritroides do que em qualquer outro tipo de célula ou tecido (KINGSLEY

et al., 2013). Malik *et al.*, 2015, realizaram o silenciamento de SETD8 que resultou na perda de H4K20me1 e ganho de acetilação H4 no promotor GATA2, sugerindo que o SETD8 pode ser um importante regulador da maturação eritróide, através da repressão de GATA2. Na nossa análise, SETD6 e SETD8 estão subexpressos após a indução da HbF pela decitabina.

Nesse trabalho o fator de transcrição HNF4 α foi selecionado para silenciamento em células HUDEP-2, essa escolha foi baseada pelo maior perfil diferencial de expressão após tratamento com decitabina em células CD34⁺ e pela ausência de descrições desse fator relacionadas ao controle na expressão do gene HBG, tornando-o um candidato promissor como novo alvo terapêutico.

O fator nuclear de hepatócitos 4 alpha, também, conhecido como NR2A1 é um fator de transcrição altamente conservado da superfamília de receptores hormonais nucleares (NR), com 78 kDa formado por 465 aminoácidos. O HNF4 α apresenta 317 alvos de interação descritos, com principais atuações no controle de diversos processos metabólicos, sendo altamente expresso no fígado, intestino, pâncreas e rim, participando na regulação de enzimas glicolíticas, no metabolismo da glicose e lipídico e no processo de coagulação sanguínea (fator VII e IX) (ARBINI *et al.*, 1997; HAYHURST *et al.*, 2001; HWANG-VERSLUES *et al.*, 2010).

Mutações identificadas no gene HNF4 α estão associadas a diabetes de início na maturidade nos jovens (*Maturity Onset Diabetes of the Young- MODY1*). Enquanto polimorfismos na região promotora do HNF4 α estão correlacionados ao maior risco para diabetes tipo 2 (LOVE-GREGORY; PERMUTT, 2009).

O HNF4 α atua nos processos de diferenciação e manutenção das células hepáticas., onde a família dos HNFs desempenha um papel essencial e relacionadas ao estresse oxidativo (ZHOU *et al.*, 2014; MALECKI *et al.*, 1999). HNF1 α pertence à família HNF, sendo regulado por HNF4 α pela ligação à sua região promotora proximal, corroborando com a superexpressão do HNF1 α descrita nesse trabalho.

Os RNAs guias utilizados nesse estudo, apresentavam especificidade para todas as isoformas do HNF4 α , entretanto, com os experimentos realizados, não podemos descrever quais e quantas isoformas podem ter sido silenciadas nas células HUDEP-2. Rastinejad *et al.*, 2023, argumentaram que a versatilidade desse fator de transcrição, com suas diferentes isoformas e atuações em diversos tecidos, podem funcionar como ativador ou repressor transcricional no mesmo gene. Adicionalmente,

foi descrito isoformas do HNF4 α em eritroblastos e identificação de um *SNP* rs1800961 em novos *loci* associados a características dos glóbulos vermelhos (BELALI *et al.*, 2023; CHAMI *et al.*, 2016).

O silenciamento do gene HNF4 α em células HUDEP-2, elevou a síntese de HbF, HUDEP-2 apresenta baixa expressão do gene HBG. VETÕ *et al.*, 2017, mostraram que o promotor da globina β é desprovido de acetilação e ligação ao HNF4 α , corroborando nossos resultados que esse fator de transcrição participou da regulação específica da gama globina e no aumento da síntese da hemoglobina fetal. Sugere-se que HNF4 α pode estar relacionado indiretamente a região promotora do gene HBG, interagindo com possíveis genes reguladores do gene HBG, pela alteração na expressão de cofatores ou enzimas regulatórias. Até o momento, não há uma associação e descrição do HNF4 α na regulação da globina gama.

Há 10.290 sequências ligadas ao HNF4 α mapeadas no genoma, sendo 5.820 em genes únicos. Alguns coativadores já foram descritos relacionados ao domínio AF-2 em HNF4a. Esses coativadores incluem as histonas acetiltransferases (HATs) CBP e p300, membros da família p160 de coativadores (SRC-1 e GRIP-1) e o complexo Mediador. PRMT1, descrita anteriormente, atua como coativador do HNF4 α , apresenta um papel ambíguo na modulação da atividade transcricional desse gene: atua na regulação da atividade de ligação do HNF4 α ao DNA; e também na metilação de histonas, pois a metilação do Arg-91 aumenta a afinidade ao DNA, com a interação depende da região DBD do HNF4 α (resíduos 50–103) (Rastinejad *et al.*, 2023). Genes regulados ativamente por HNF4 α , apresentam a acetilação de histonas H3K27ac, uma marca registrada dos genes ativos (WANG *et al.*, 1998; MALIK *et al.*, 2002; MAEDA *et al.*, 2002).

As vias biológicas e funções celulares compartilhadas pelos genes HBG1, HBG2 e HNF4 α encontradas nas análises de bioinformática, destaca-se a via de coagulação sanguínea e hemostasia sanguínea, corroborando com os dados na literatura onde HNF4 α participa da regulação de fatores da cascata de coagulação (HWANG-VERSLUES *et al.*, 2010).

As últimas décadas foram acompanhadas por intensos estudos relacionados a modificações epigenéticas, ampliando o conhecimento sobre modificações pós-translacionais. A compreensão dos processos regulatórios sobre o gene HBG

possibilita a identificação e quantificação dos possíveis participantes desse processo (sítios de ligação, *motifs*, interação com fatores de transcrição, regulação repressiva ou permissiva de enzimas acetiltransferases, ou metiltransferases) relacionados à repressão desse gene.

Nesse estudo, células HUDEP-2 silenciadas utilizando a ferramenta Crispr/Cas9 para o fator de transcrição HNF4 α , expressaram significativamente mais HbF em comparação ao controle, com índices de expressões variável entre as populações tanto para HNF4 α , quanto na produção de HbF. Os resultados apresentados sugerem a participação do fator de transcrição HNF4 α na regulação do gene de globina γ em células HUPEP-2, cujo mecanismo ainda não está esclarecido. Mais estudos são necessários para melhor compreensão dessa regulação e quais outros fatores podem estar atuando com HNF4 α nesse processo.

Os dados apresentados sugerem um mecanismo regulatório no qual um fator de ligação pode controlar a atuação de metiltransferases, modulando diretamente a sua ligação ao DNA. A regulação do gene HBG através do silenciamento dos genes PRMT1, PRMT4 e PRMT5 já foi relatada (VAN DIJK *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2013), sendo o PRMT1 coativador do HNF4 α , nos direcionou na interpretação dos resultados e propomos a associação destes genes como possível mecanismo para o incremento da síntese de HbF. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a ligação do HNF4 α aos seus coativadores buscando observar as possíveis modificações pós-translacionais. Estudos da análise da metilação do DNA, utilizando técnicas como o sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (RRBS), ATAC-Seq (acessibilidade da cromatina), podem ajudar na caracterização dos processos envolvidos regulação do gene HBG no modelo de células silenciadas para HNF4 α apresentado nesse estudo.

Os resultados desse estudo enfatizam que a regulação transcricional é um sistema complexo, que não pode ser erroneamente atribuído ao efeito direto de um único componente, como a metilação do DNA, ou o silenciamento de um único gene. Em conjunto, essas observações indicam que ao utilizar uma droga com efeito epigenético como a decitabina, diversas alterações gênicas são esperadas. Entretanto, não são todos os genes encontrados diferencialmente expressos envolvidos no processo regulatório do gene HBG

6. CONCLUSÃO

Utilizando ferramentas de análise da expressão gênica diferencial em células CD34⁺ tratadas com 5-aza-2 foi possível identificar pela primeira vez um conjunto de novos genes diferencialmente expressos pela ação da decitabina, um conhecido fármaco indutor da expressão de HbF.

- 1- Este estudo avaliou a ação da decitabina (5-aza-2) na expressão de 168 genes (84 fatores de transcrição e 84 Enzimas Epigenéticas Modificadoras de Cromatina) em cultura de células CD34⁺. Após análise, foram identificados 45 genes diferencialmente expressos (5 superexpressos e 40 com expressão reduzida)
- 2- Observou-se a indução da HbF em cultura de células HUDEP-2 pela ação da decitabina (dados da citometria de fluxo: 0,75% no grupo de células controle vs 13,9% no grupo de células tratadas. Desta forma, devido à semelhança no perfil de expressão da HbF observado em cultura de células CD34⁺ foi possível a utilização do modelo de cultura de células HUDEP-2 para avaliação funcional do silenciamento do gene alvo.
- 3- O fator de transcrição HNF4 α foi selecionado para os ensaios de silenciamento gênico por CRISPR-Cas9, apresentou expressão aumentada (*fold change* >26) em células CD34⁺ após o tratamento com decitabina. Adicionalmente, apresenta interação com PRMT1, cujo silenciamento foi associado à regulação do gene HBG. Observou-se aumento significativo na expressão da HbF ($p=0,0001$), mensurada por citometria de fluxo, após o silenciamento do gene HNF4 α em 5 *pools* de células HUDEP-2, comparado ao controle HUDEP-2, com intensidade de fluorescência variável entre 1,65% a 10,4% nos 5 *pools* vs $\pm 0,7\%$ no controle. Destaca-se que a alteração genética no *locus* gênico do HNF4 α não alterou a morfologia nessa linhagem celular.

Os dados apresentados nesse estudo, sugerem que o fator de transcrição HNF4 α pode desempenhar um papel na regulação do gene da globina γ em células HUPEP-2, o qual o mecanismo ainda não está esclarecido. Este estudo, abre caminho para mais pesquisas relacionadas a genes/ fatores de transcrição usualmente não correlacionados à regulação gênica do gene HBG. O resultado inédito e instigante da

atuação do HNF4 α , indica a necessidade de estudos que busquem esclarecer principalmente as alterações epigenéticas que possam estar envolvidas com os níveis intracelulares da HbF nas células HUDEP-2 silenciadas para esse fator.

Em seu conjunto esse trabalho apresenta uma prova de conceito, é possível a partir do uso de uma droga indutora da produção de HbF, identificar genes diferencialmente expressos em células primárias hematopoiéticas para incrementar a quantidade de HbF.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A.A.; TISDALE, J. **Gene Therapy for Sickle Cell Disease - Moving from the Bench to the Bedside.** *Blood*, 2021. DOI:10.1182/blood.2019003776.
- BARRERO, M. J.; MALIK, S. **Two functional modes of a nuclear receptor-recruited arginine methyltransferase in transcriptional activation.** *Molecular Cell*, v. 24, n. 2, p. 233–243, 2006. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.09.020.
- BEDFORD, M. T.; CLARKE, S. G. **Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why.** *Molecular Cell*, 33, 2009. DOI 10.1016/j.molcel.2008.12.013.
- BELALI, T.; ABOMUGHAID, M.; ALHUJAILY, M. **The transcription factor HNF-4 α : a key player in haematological disorders.** *Archives of Medical Science*, v. 19, n. 6, 2023. DOI: 10.5114/aoms/141219.
- BLANC, R. S.; RICHARD, S. **Arginine methylation: The coming of age.** *Molecular Cell*, v. 65, p. 8-24, 2017. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.11.003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GN/MS no 872 de 6 de novembro de 2002. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Doença Falciforme - Hidroxiuréia.** Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2002/GM/GM-872htm>.
- BUNN, H. F. **Pathogenesis and treatment of sickle cell disease.** *The New England Journal of Medicine*, v. 337, n. 11, p. 762-769, 1997. DOI: 10.1056/NEJM199709113371107.
- CHAMI, N., et al. (2016). HNF4A rs1800961. **Exome Genotyping Identifies Pleiotropic Variants Associated with Red Blood Cell Traits.** *American Journal of Human Genetics*, v. 99, n. 1, p. 8-21, 2016. DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.05.001.
- CHANDRA, V. et al. **Multidomain integration in the structure of the HNF-4 α nuclear receptor complex.** *Nature*, **495**, 394–398, 2013. DOI:10.1038/nature11966.
- CHARACHE, S.; DOVER, G., J.; MOVER, M., A.; MOORE, J., W. **Hydroxyurea-Induced Augmentation of Fetal Hemoglobin Production in Patients with Sickle Cell Anemia.** *Blood*, v. 69, n. 1, p. 109-116, 1987. DOI: 10.1182/blood.V69.1.109.109.
- CHEN, L. et al. **HNF4 factors control chromatin accessibility and are redundantly required for maturation of the fetal intestine.** *Development*, v. 146, n. 19, 2019. DOI: 10.1242/dev.179432.
- CONG, L.; ZHANG, F. **Genome engineering using CRISPR-Cas9 system.** *Methods Mol Biol*, v. 1239, p. 197-217, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-1862-1_10.

DARSIGNY, M. et al. **Hepatocyte Nuclear Factor-4 α Promotes Gut Neoplasia in Mice and Protects against the Production of Reactive Oxygen Species.** *Cancer Research*, v. 70, n. 22, p. 9423–9433, 2010. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1697.

DESIMONE, J.; HELLER, P.; HALL, L.; ZWIERS, D. **5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 79, n. 14, p. 4428-4431, 1982. DOI: 10.1073/pnas.79.14.4428.

DOUDNA, J. A. **The promise and challenge of therapeutic genome editing.** *Nature*, v. 578, p. 229–236, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-1978-5.

FANG, BIN et al. **Identification of a binding motif specific to HNF4 by comparative analysis of multiple nuclear receptors.** *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 12, p. 5343-5356, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks190

FRANCO, E.; KARKOSKA, K. A.; MCGANN, P. T. **Inherited disorders of hemoglobin: A review of old and new diagnostic methods.** *Blood Cells Mol Dis*, 104, 102758, 2024. DOI: 10.1016/j.bcmd.2023.102758

FRANGOUL, H. et al. **CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia.** *N Engl J Med*, v. 384, n. 3, p. 252-260, 2021. DOI: 10.1056/NEJMoa2031054.

GAO, L., EMPERLE, M., GUO, Y. et al. **Comprehensive structure-function characterization of DNMT3B and DNMT3A reveals distinctive de novo DNA methylation mechanisms.** *Nat Commun*. v. 11, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-17109-4.

GIRARD, R. et al. **The transcription factor hepatocyte nuclear factor 4A acts in the intestine to promote white adipose tissue energy storage.** *Nature Communications*, v. 13, p. 224, 2022. DOI:10.1038/s41467-021-27934-w.

GOODMAN MA, MALIK P. **The potential of gene therapy approaches for the treatment of hemoglobinopathies: achievements and challenges.** *Ther Adv Hematol.*, v.7. n. 5, p. 302-315, 2016. DOI: 10.1177/2040620716653729.

GUCCIONE, E.; RICHARD, S. **The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 20, n. 10, p. 642-657, 2019. DOI: 10.1038/s41580-019-0155-x.

GUO, S.; LU, H. **Novel mechanisms of regulation of the expression and transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 α .** *Journal of Cell Biochemistry*, v. 120, n. 1, p. 519-532, 2019. DOI: 10.1002/jcb.27407.

- GUPTA, R. K.; KAESTNER, K. H. **HNF-4 α : from MODY to late-onset type 2 diabetes.** *Trends in Molecular Medicine*, v. 10, n. 11, p. 521-524, 2004. DOI: 10.1016/j.molmed.2004.09.004.
- HENRY, E. R. et al. **Allosteric control of hemoglobin S fiber formation by oxygen and its relation to the pathophysiology of sickle cell disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 117, n. 26, p. 15018-15027, 2020. DOI: 10.1073/pnas.1922004117.
- HERRERA-PULIDO, J. A.; BOISVERT, F. M.; BOUDREAU, F. **Hepatocyte nuclear factor 4 α multiple isoforms, their functions, and their interactomes.** *Proteomics*, 23, 2023. DOI: 10.1002/pmic.202200372.
- HOBAN, M. D. et al. **CRISPR/Cas9-Mediated Correction of the Sickle Mutation in Human CD34⁺ cells.** *Mol Ther*, v. 24, n. 9, p. 1561-1569, 2016. DOI: 10.1038/mt.2016.148.
- HWANG, J. W. et al. **Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy.** *Experimental & Molecular Medicine*, v. 53, p. 788–808, 2021. DOI: 10.1038/s12276-021-00613-y.
- ISHINO, Y., SHINAGAWA, H., MAKINO, K., AMEMURA, M., NAKATA, A. **Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.** *J Bacteriol Res.*, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- ISHINO, Y.; KRUPOVIC, M., FORTERRE P. **History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology.** *J Bacteriol.*, v; 200, n.7, 2018. DOI: 10.1128/jb.00580-17.
- JANSEN, R., EMBDEN, J.D., GAASTRA, W., SCHOULS, L., M. **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.** *Mol Microbiol*, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839x.
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J., CHARPENTIER, E. **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.** *Science* v. 337, n. 6096, p.816–821, 2012. DOI: 10.1126/science.1225829.
- KAKKAR, M.; HOLDERLE, K.; SHETH, M.; ARANY, S.; SCHIFF, L.; PLANEROVA, A. **Orofacial Manifestation and Dental Management of Sickle Cell Disease: A Scoping Review.** *Anemia*, 2021. DOI: 10.1155/2021/5556708.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. **Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 3, p. 750-760, 2017. DOI: 10.1172/JCI89741.

KLEIN, D. C.; HAINER, S. J. **Chromatin regulation and dynamics in stem cells.** *Curr Top Dev Biol*, v.138, p. 1–71, 2020. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2019.11.002.

LEY, T. J. et al. **5-azacytidine selectively increases gamma-globin synthesis in a patient with beta⁺ thalassemia.** *The New England Journal of Medicine*, v. 307, n. 24, p. 1469-1475, 1982. DOI: 10.1056/NEJM198212093072401. PMID: 6183586.

LI, J. et al. **Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 regulates fetal hematopoiesis and thymocyte development.** *Journal of Immunology*, v. 190, p. 597-604, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1102513.

LIU, N. et al. **Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch.** *Cell*, v. 173, n. 2, p. 430-442.e17, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.016.

LIU, R. et al. **Methylation across the central dogma in health and diseases: new therapeutic strategies.** *Signal Transduct. Target. Ther.*, 8, 310, 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01528-y.

LOWDER JN, TAVERNA P, ISSA JP. **Will next-generation agents deliver on the promise of epigenetic hypomethylation therapy?** *Epigenomics*, v. 7, n. 7, p. 1083-1088, 2015. DOI: 10.2217/epi.15.66.

MASUDA, T. et al. **Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin.** *Science*, v. 351, p. 285-289, 2016. DOI: 10.1126/science.aad3312.

MOUTOUH-DE PARSEVAL LA. et al. **Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34⁺ cells.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 1, p. 248-258, 2008. DOI: 10.1172/JCI32322.

NIE, M. et al. **CARM1-mediated methylation of protein arginine methyltransferase 5 represses human gamma-globin gene expression in erythroleukemia cells.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, p. 17454-17463, 2018. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004028.

NIWA, H. **The principles that govern transcription factor network functions in stem cells.** *Development*, v. 145, n. 6, dev157420, 2018. DOI: 10.1242/dev.157420.

PARKER, W. B.; THOTTASSERY, J. V. **5-Aza-4'-thio-2'-deoxycytidine, a New DNMT1-Depleting Agent.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 379, n. 3, p. 211-222, 2021. DOI: 10.1124/jpet.121.000758.

PASCHOUDI, K.; YANNAKI, E.; PSATHA, N. **Precision Editing as a Therapeutic Approach for β -Hemoglobinopathies.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 11, p. 9527, 2023. DOI: 10.3390/ijms24119527.

PERUTZ, M. F. **Species adaptation in a protein molecule.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 1, n. 1, p. 1-28, 1983. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040299.

PIEL, F. B. et al. **Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates.** *Lancet*, v. 381, n. 9861, p. 142-151, 2013. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61229-X.

PIEL, F. B. et al. **Sickle Cell Disease.** *The New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 16, p. 1561-1573, 2017. DOI: 10.1056/NEJMra1510865.

RADI, S. H., VEMURI, K.; MARTINEZ-LOMELI, J.; SLADEK, F. M. **HNF4 α isoforms: the fraternal twin master regulators of liver function.** *Frontiers in Endocrinology*, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fendo.2023.1226173.

RAMOS, M. P. et al. **DNA demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine is imprinted, targeted to euchromatin, and has limited transcriptional consequences.** *Epigenetics & Chromatin*, v. 8, p. 11, 2015. DOI: 10.1186/s13072-015-0004-x.

RAN, F. A. et al. **Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.** *Nat Protoc*, v. 8, n. 11, p. 2281-2308, 2013. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.

RANKINE-MULLINGS, A., E.; NEVITT, S., J. **Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease.** *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 9, 2022. DOI: 10.1002/14651858.CD002202.pub3.

RASTINEJAD F. **The protein architecture and allosteric landscape of HNF4 α .** *Front Endocrinol*, v. 4, n. 14, 2023. DOI: 10.3389/fendo.2023.1219092.

RENNEVILLE, A. et al. **EHMT1 and EHMT2 inhibition induces fetal hemoglobin expression.** *Blood*, v. 126, p. 1930-1939, 2015. DOI: 10.1182/blood-2015-06-649087.

RIGGS, A. D. **X inactivation, differentiation, and DNA methylation.** *Cytogenetics and Cell Genetics*, v.14, n.1, p. 9–25, 1975. DOI: 10.1159/000130315.

SANKARAN, V. G. et al. **Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A.** *Science*, v. 322, n. 5909, p. 1839-1842, 2008. DOI: 10.1126/science.1165409.

SEGURA, Elver E. R.; AYOUB, Patrick G.; HART, Kimberly L.; KOHN, Donald B. **Gene Therapy for β -Hemoglobinopathies: From Discovery to Clinical Trials.** *Viruses*, v. 15, n. 3, p. 713-9, 2023. DOI: 10.3390/v15030713.

SERRANO, L.; VAZQUEZ, B. N.; TISCHFIELD, J. **Chromatin structure, pluripotency and differentiation.** *Experimental Biology and Medicine*, v. 238, n. 3, p. 259–270, 2013. DOI: 10.1177/1535370213480718.

SHARMA, G.; SHARMA, A. R.; BHATTACHARYA, M.; LEE, S. S.; CHAKRABORTY, C. **CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases.** *Molecular Therapy*, v. 29, n. 2, p. 571-586, 2021. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.09.028.

ŠORM, F., PÍSKALA, A., ČIHÁK, A. et al. **5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic.** *Experientia*, v. 20, p. 202–203, 1964. DOI: 10.1007/BF02135399.

SORRENTINO, V.G.; THOTA, S.; GONZALEZ, E.A.; RAMESHWAR, P.; CHANG, V.T.; ETCHEGARAY, J.-P. **Hypomethylating Chemotherapeutic Agents as Therapy for Myelodysplastic Syndromes and Prevention of Acute Myeloid Leukemia.** *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 641, 2021. DOI: 10.3390/ph14070641

SOUALEM, H. D.; MAINASSARA, S.; BEENJELLOUN, L.; CHBICHE, S. **Oral manifestations and management of sickle cell disease: a literature review.** *International Journal of Surgery: Global Health*, v. 5, n.6, 2022. DOI: 10.1097/GH9.0000000000000084.

STEINBERG, M. H. **Fetal hemoglobin in sickle cell anemia.** *Blood*, v. 136, n. 21, p. 2392-2400, 2020. DOI: 10.1182/blood.2020007645.

STEPHENS KE, MIASKOWSKI CA, LEVINE JD, PULLINGER CR, AOUIZERAT BE. **Epigenetic regulation and measurement of epigenetic changes.** *Biol Res Nurs.*, 15, 4, 373-81, 2013. DOI: 10.1177/1099800412444785.

van der PLOEG, L. H.; FLAVELL, R. A. **DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues.** *Cell*, v. 19, n. 4, p. 947-58, 1980. DOI: 10.1016/0092-8674(80)90086-0.

van Dijk, T.B. et al. **Friend of Prmt1, a Novel Chromatin Target of Protein Arginine Methyltransferases.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 30, p. 260 – 272, 2010. DOI: doi:10.1128/MCB.00645-09.

- WANG, Y. et al. **The methyltransferase PRMT1 regulates γ -globin translation.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 296 2021. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100417.
- WEATHERALL, D. J. **The Evolving Spectrum of the Epidemiology of Thalassemia.** *Hematol. Oncol. Clin. North Am*, v. 32, n. 2, p. 165-175, 2018. DOI: 10.1016/j.hoc.2017.11.008.
- WOOD, W., G. **Increased HbF in adult life.** *Baillière's Clinical Haematology*, v. 6, n. 1, p. 177-213, mar. 1993. DOI: 10.1016/S0950-3536(05)80070-8.
- WU, Y. L. et al. **Epigenetic regulation in metabolic diseases: mechanisms and advances in clinical study.** *Signal Transduct. Target. Ther.*, 8, 98, 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01333-7.
- XU, J. et al. **Corepressor-Dependent Silencing of Fetal Hemoglobin Expression by BCL11A.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 6518–6523, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1303976110.
- XU, T. H. et al. **Structure of nucleosome-bound DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B.** *Nature*, v. 586, p. 151–155, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2747-1.
- ZHANG, Y.; PAIKARI, A.; SUMAZIN, P.; SUMMARELL, C. C. G.; CROSBY, J. R.; BOERWINKLE, E.; WEISS, M. J.; SHEEHAN, V. A. **Metformin induces FOXO3-dependent fetal hemoglobin production in human primary erythroid cells.** *Blood*, v. 132, n. 3, p. 321–333, 2018. DOI: 10.1182/blood-2017-11-814335.

ANEXO 1

Anexo 1 - Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PARTICIPANTES DA PESQUISA

(Doadores de sangue)

Título da pesquisa: Análise da expressão gênica global em cultura de células CD34+ e K562 induzidas com Decitabina e outros agentes indutores de HbF.

Nome dos responsáveis: Fernando Ferreira Costa; Ingrid Grazielle Sousa

Número do CAAE: 61602416.5.0000.5404

Você está sendo convidado a participar de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

Pacientes com anemia falciforme convivem com algumas complicações ao longo da vida. As hemácias em forma de foice ocasionam crises vaso-oclusivas e quadros inflamatórios que causam dor. O único medicamento aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento da anemia falciforme é a Hidroxiureia, que aumenta os níveis de hemoglobina fetal (HbF). Porém, não são todos os pacientes que respondem significativamente a essa terapia medicamentosa. O presente estudo como objetivo identificar novos genes que possam participar dos mecanismos de produção de HbF e que podem ser relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da anemia falciforme.

Rubrica do Pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Procedimentos realizados neste protocolo

Participando do estudo, você será submetido a uma coleta de sangue na veia de um de seus braços, por um profissional da equipe do Hemocentro de Campinas – UNICAMP. Não haverá punções adicionais para este estudo e será utilizado aproximadamente 54mL ml do seu sangue, coletados em tubo contendo citrato de sódio (azul) em uma única vez.

Riscos e inconveniências

Os riscos do procedimento são os mesmos de uma coleta de amostras para exames de rotina laboratorial, ou seja, provável dor na inserção da agulha e possível hematoma (mancha roxa) no local.

Benefício do tratamento

Você não terá nenhum benefício direto com esse estudo e seus dados não serão inseridos no seu prontuário. Porém, sua participação poderá ajudar os pesquisadores a entender melhor a doença falciforme e melhorar os tratamentos relacionados a esta doença.

Alternativa (s) à participação no estudo

Caso o(a) senhor(a) não queira participar deste estudo, não há problema algum. Você seguirá com a conduta clínica sem nenhum prejuízo a você.

Direitos do participante

Sua participação é voluntária e você pode retirar seu consentimento ou ainda descontinuar sua participação em qualquer momento, se o assim o preferir, sem penalização e/ou prejuízo de qualquer natureza. Não haverá nenhum custo a você proveniente deste estudo, assim como não haverá qualquer tipo de remuneração pela sua participação.

Indenização

Caso o(a) senhor(a) venha a sofrer qualquer tipo de dano, resultante de sua participação na pesquisa, dano este previsto ou não no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você terá direito a indenização.

Ressarcimento

Como a coleta de sangue será realizada junto com os demais exames de rotina em dias de consulta no Hemocentro da UNICAMP, não haverá nenhum ressarcimento caso aceite em participar da pesquisa. Não haverá nenhuma remuneração pela participação.

Rubrica do Pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Danos à Saúde

Se uma lesão ou qualquer dano direto, ou indireto, imediatos ou tardios à saúde ocorrer como resultado de sua participação nesta pesquisa, assistência integral estará disponível sem que você tenha gastos.

Armazenamento de material

- As amostras coletadas e tratadas com os compostos que serão objetos de estudo desse trabalho poderão ser utilizadas em outros projetos a fim de verificar, por exemplo, a expressão de outros genes;
- Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP);

Consentimento do sujeito da pesquisa:

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a:

Confidencialidade

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador

responsável, Prof. Fernando Ferreira Costa, Laboratório de Hemoglobina e Genoma do

Hemocentro-UNICAMP, localizado a R. Carlos Chagas, 480 - Cidade Universitária, Campinas-SP, 13083-878, telefone 19 3521-8661, e-mail: ferreira@unicamp.br ou pela pesquisadora Ingrid Grazielle Sousa, telefone 19 981337999, e-mail: indi.sousa@gmail.com.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas-SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

Rubrica do Pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Assinaturas de Consentimento

Fui informado de todos os detalhes relacionados ao estudo ao qual serei submetido. Após assinar, receberei uma via assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

_____ Data: __/__/__

Assinatura do participante da pesquisa

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material

e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: __/__/__

Assinatura do Pesquisador

Rubrica do Pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Anexo 2 - Aprovação Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise da expressão gênica global em cultura de células CD34+ e K562 induzidas com Dicitabina e outros agentes indutores de HbF

Pesquisador: Fernando Ferreira Costa

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 61602416.5.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.805.298

Apresentação do Projeto:

Solicitação de emenda ao projeto original.

Segundo o documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1709239_E1.pdf 09/03/2021 :

Justificativa da Emenda:

Solicitamos a inclusão da aluna de Doutorado Ingrid Grazielle Sousa, CPF: 025.796.895-40, como participante da pesquisa, juntamente com a alteração da vigência do projeto, com nova data final para março de 2022 (cronograma atualizado). Com adicionais alterações na metodologia (Inclusão de novo tipo celular e técnica – Nucleofecção Hudep-2 e Western Blotting).

Objetivo da Pesquisa:

Inalterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto original aprovado em 06 de Dezembro de 2016, Número do Parecer: 1.852.644.

Solicitação e emenda ao projeto original.

Justificativa:

1- inclusão da aluna de Doutorado Ingrid Grazielle Sousa, CPF: 025.796.895-40, como participante

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br