

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv)
Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada

EFEITO DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE
ATF4, *MSN*, *PBXIP1* E *SNCA* EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E EM
CÉLULAS K562

Aluna: Fernanda Cristina Palombo

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

São Carlos-SP
2020

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv)
Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada

FERNANDA CRISTINA PALOMBO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE *ATF4*, *MSN*, *PBXIP1* E *SNCA* EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME E EM CÉLULAS K562**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

São Carlos-SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Fernanda Cristina Palombo, realizada em 06/03/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Profa. Dra. Isabeth da Fonseca Estevão (UFSCar)

Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Paulo e em especial à minha amada filha Heloísa, que motivou esse trabalho do início ao fim. A vocês, além de meu amor, dedico a mais sincera homenagem e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar minha mente, dar-me ânimo e estar a frente de todos os meus passos.

Ao meu esposo Paulo, que me deu o amparo necessário para a concretização desse trabalho científico e também foi fundamental para que eu pudesse conciliar a jornada acadêmica com a criação de nossos dois bebês, Heloísa e Davi.

Aos meus pais e à minha grande família, que por vezes enxergaram em mim um potencial maior do que eu mesma via e deram todo apoio e incentivo para a realização dessa pesquisa.

Ao meu orientador Anderson, que além de excelente professor e de seu conhecimento admirável, é uma das pessoas mais humanas que já conheci. Obrigada por me acolher mesmo estando grávida e por tanto confiar em mim e em minha pesquisa.

Às minhas queridas amigas Karina e Carla, companheiras de laboratório que muito me ajudaram e com as quais dividi inúmeras experiências, no mais amplo sentido da palavra. Agradeço também aos demais colegas do LBGA pelos bons momentos e por toda parceria ao longo dos últimos seis anos.

À Universidade Federal de São Carlos, à Coordenação do Programa de Genética Evolutiva e Biologia Molecular e a todos os docentes que participaram de minha formação, agregando conhecimentos que levarei pra vida.

Ao HEMOPE por fornecer as amostras de pacientes falciformes.

A todos os voluntários que literalmente se dispuseram a doar um pouco de seu sangue para que as análises pudessem ser realizadas.

Ao CNPq e à FAPESP por todo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

EPÍGRAFE

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isso fica sendo a minha última e mais elevada descoberta.”

Isaac Newton

Resumo

A expressão dos genes que codificam as cadeias das hemoglobinas, principalmente da hemoglobina adulta, pode ser afetada por mutações. Algumas mutações dão origem a hemoglobinopatias como a anemia falciforme, em que a substituição de uma adenina por uma timina no códon 6 do gene codificador da beta globina leva à tradução de uma valina no lugar de um ácido glutâmico. Tal substituição culmina no surgimento de uma hemoglobina adulta atípica denominada hemoglobina S (HbS). Esta apresenta forte tendência à polimerização quando na forma desoxigenada, resultando em deformação e enrijecimento da membrana celular da hemácia, redução do transporte de oxigênio para os tecidos e nas diferentes manifestações clínicas do paciente falciforme. Um dos fatores ligados à amenização do quadro clínico da doença é o aumento de hemoglobina fetal (HbF), que pode inibir a polimerização da HbS e consequentemente a falcização dos eritrócitos. Partindo deste princípio, um medicamento conhecido como hidroxiureia (HU) passou a ser utilizado no tratamento da anemia falciforme por aumentar o nível de HbF e apresentar benefícios adicionais no quadro clínico dos pacientes, cujos mecanismos ainda não foram bem elucidados. Nesse sentido, nosso estudo se propôs a analisar a expressão e conteúdo proteico de quatro genes (*ATF4*, *MSN*, *PBXIP1* e *SNCA*) por qPCR e *Western Blotting* em indivíduos com anemia falciforme tratados e não tratados com HU a fim de estabelecer associações com a fisiopatologia da anemia falciforme e, principalmente, com o tratamento com HU. Para comprovação dos resultados, as análises também foram realizadas com células K562 estimuladas para diferenciação eritroide na presença e ausência de HU. Nossos resultados mostram uma diminuição da expressão de *MSN* nos indivíduos com a doença, o que pode ser justificado pelo aumento de adesão celular neste grupo. Os dados obtidos sugerem também que o tratamento com HU induz a expressão de *PBXIP1* e inibe a de *SNCA*. A ativação de *PBXIP1* auxiliaria no estímulo da diferenciação e proliferação de células hematopoiéticas, enquanto que a diminuição no conteúdo de *SNCA* pode estar associada à redução dos processos inflamatórios, que é um efeito de grande importância no agravamento da doença. Para o gene *ATF4*, associado ao estresse oxidativo e neovascularização, esperávamos que o tratamento com hidroxiureia levasse a uma redução da expressão, porém, não obtivemos diferença estatística significativa na comparação entre os grupos. Por fim, sugerimos que o aumento do estresse oxidativo pela adição de H₂O₂ ao meio de cultura também influencia a expressão de nossos genes e afeta o potencial efeito da hidroxiureia.

Palavras-chaves: hidroxycarbamida, HPIP, moesina, α -sinucleína, expressão gênica, conteúdo proteico, cultura celular, estresse oxidativo

Abstract

The expression of genes that encode hemoglobin chains, especially adult hemoglobin, can be affected by mutations. Some mutations give rise to hemoglobinopathies such as sickle cell anemia, in which the replacement of an adenine with a thymine in codon 6 of the gene encoding beta globin leads to the translation of a valine instead of a glutamic acid. Such substitution culminates in the appearance of an atypical adult hemoglobin called hemoglobin S (HbS). This presents a strong tendency to polymerization when in deoxygenated form, resulting in deformation and stiffening of the red cell membrane, reduction of oxygen transport to the tissues and in the different clinical manifestations of the sickle cell patient. One of the factors linked to the alleviation of the clinical picture of the disease is the increase in fetal hemoglobin (HbF), which can inhibit the polymerization of HbS and consequently the sickling of erythrocytes. Based on this principle, a medication known as hydroxyurea (HU) started to be used in the treatment of sickle cell anemia because it increases the level of HbF and presents additional benefits in the clinical picture of patients, whose mechanisms have not yet been elucidated. In this sense, our study aimed to analyze the expression and protein content of four genes (ATF4, MSN, PBXIP1 and SNCA) by qPCR and Western Blotting in individuals with sickle cell anemia treated and not treated with HU in order to establish associations with pathophysiology sickle cell anemia and, mainly, with HU treatment. To prove the results, the analyzes were also performed with K562 cells culture stimulated for erythroid differentiation in the presence and absence of HU. Our results show a decrease in the expression of MSN in individuals with the disease, which can be justified by the increase in cell adhesion in this group. The data obtained also suggest that treatment with HU induces the expression of PBXIP1 and inhibits SNCA. The PBXIP1 activation would assist in stimulating the differentiation and proliferation of hematopoietic cells, while the decrease in the content of SNCA may be associated with the reduction of inflammatory processes, which is an effect of great importance in worsening the disease. For the ATF4 gene, associated with oxidative stress and neovascularization, we expected that treatment with hydroxyurea would lead to a reduction in expression, however, we did not obtain a statistically significant difference in the comparison between groups. Finally, we suggest that the increase in oxidative stress by adding H₂O₂ to the culture medium also influences the expression of our genes and affects the potential effect of hydroxyurea.

Keywords: hydroxycarbamide, HPIP, moesin, α -synuclein, gene expression, protein content, cell culture, oxidative stress.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	9
1. Introdução.....	10
1.1. Desenvolvimento da célula eritrocitária.....	10
1.2. Ontogenia das hemoglobinas humanas.....	12
1.3. Hemoglobinopatias e a anemia falciforme.....	13
1.3.1. Fisiopatologia da anemia falciforme.....	14
1.4. Hidroxiureia.....	17
1.5. Genes selecionados para análise de expressão.....	18
1.5.1. ATF4 (Activating Transcription Factor 4).....	18
1.5.2. MSN (Membrane-Organizing Extension Spike Protein).....	19
1.5.3. PBXIP1 (Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1)....	20
1.5.4. SNCA (Synuclein, Alpha).....	21
1.6. Estresse oxidativo e a anemia falciforme.....	22
1.7. Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias.....	23
2. Hipótese.....	24
3. Justificativa.....	25
4. Objetivo.....	26
4.1. Objetivo geral.....	26
4.2. Objetivos específicos.....	26
5. Metodologia.....	26
5.1. Grupos analisados.....	27
5.2. Análise da expressão gênica.....	27
5.2.1. Separação de reticulócitos.....	27
5.2.2. Extração de RNA.....	28
5.2.3. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	28
5.2.4. Reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	29
5.3. Análise do conteúdo proteico.....	29
5.3.1. Separação das células vermelhas.....	29
5.3.2. Extração e quantificação das proteínas.....	30
5.3.3. Western Blot.....	30
5.4. Cultivo de células eritroleucêmicas K562.....	31
5.4.1. Indução de estresse oxidativo por meio da adição de H₂O₂.....	32
5.5. Forma de análise dos resultados.....	33
6. Resultados e Discussão.....	33
6.1. qPCR – reticulócitos.....	33
6.2. Western Blot.....	38
6.3. Cultura de células K562.....	42
7. Conclusão.....	52
8. Referências.....	54
Apêndices.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações morfológicas durante a eritropoese em seres humanos.....	10
Figura 2 – Grupamento dos genes de α e β globina e as diferentes hemoglobinas produzidas durante o desenvolvimento humano.....	12
Figura 3 – Hipóteses sugeridas quanto à expressão de <i>MSN</i> , <i>PBXIP1</i> , <i>SNCA</i> e <i>ATF4</i> após o tratamento com HU.....	25
Figura 4 – Esquema da metodologia proposta.....	26
Figura 5 – Gel desnaturante de agarose com amostras de RNA de reticulócitos de dois participantes do grupo de indivíduos saudáveis.....	33
Figura 6 – Determinação da eficiência para <i>ATF4</i>	34
Figura 7 – Análise da expressão dos genes <i>ATF4</i> , <i>MSN</i> , <i>PBXIP1</i> e <i>SNCA</i> em reticulócitos de indivíduos sadios e com anemia falciforme (com e sem hidroxiureia).....	35
Figura 8 – Análise do conteúdo proteico de <i>PBXIP1</i> por <i>Western Blot</i>	38
Figura 9 – Análise do conteúdo proteico de <i>SNCA</i> por <i>Western Blot</i>	39
Figura 10 – Análise do conteúdo proteico de <i>MSN</i> por <i>Western Blot</i>	41
Figura 11 - Resultado das análises de qPCR para o gene <i>MSN</i> em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo.....	43
Figura 12 - Resultado das análises de qPCR para o gene <i>PBXIP1</i> em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo.....	45
Figura 13 - Resultado das análises de qPCR para o gene <i>ATF4</i> em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo.....	46
Figura 14 - Resultado das análises de qPCR para o gene <i>SNCA</i> em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo.....	47
Figura 15 - Resultado das análises do conteúdo proteico de P-MSN em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo.....	49
Figura 16 - Resultado das análises do conteúdo proteico de <i>PBXIP1</i> em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo.....	50
Figura 17 - Resultado das análises do conteúdo proteico de <i>ATF4</i> em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo.....	51
Figura 18 - Principais efeitos do tratamento com HU sobre a expressão de <i>MSN</i> , <i>PBXIP1</i> , <i>SNCA</i> e <i>ATF4</i> e consequências relacionadas.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desenvolvimento da Célula Eritrocitária

Através do estímulo do hormônio eritropoetina, células-tronco hematopoéticas diferenciam-se em células precursoras de eritrócitos por meio de um processo denominado eritropoese (ou hematopoese). Durante a vida intrauterina, a hematopoese ocorre inicialmente no interior do saco vitelínico e, após o primeiro mês de gestação, o fígado passa a ser o principal local de ocorrência, sendo o baço outro produtor de células sanguíneas. No quarto mês intrauterino se inicia a hematopoese medular, que aumenta à medida que a produção hepática diminui. Após o nascimento, o local de produção restringe-se aos ossos longos e medula óssea na fase da infância e basicamente à medula ao final deste período, sendo esta o principal local de formação de células hematológicas durante os períodos posteriores da vida do indivíduo (BONDURANT e KOURY, 1999; DESSYPRIS, 1999; CUNHA *et al.*, 2012).

Após o estímulo da eritropoetina, as células-tronco hematopoéticas passarão por uma série de modificações que levarão à formação do eritrócito como resultado da maturação do reticulócito, célula anucleada que ainda contém resquícios de organelas citoplasmáticas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e ribossomos com RNA (ribonucleic acid) mensageiro, permitindo limitada produção proteica (figura 1) (ZAGO *et al.*, 2005; HOFFMAN *et al.*, 2008; TSIFTSOGLU *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2012).

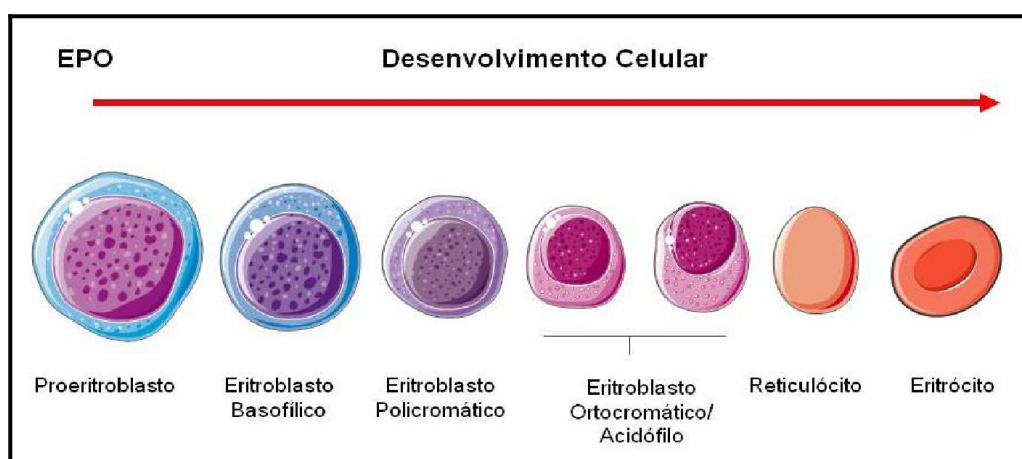


Figura 1 – Alterações morfológicas durante a eritropoese em seres humanos. Após o estímulo da eritropoetina, a célula eritroide sofre várias alterações até que os eritrócitos maduros sejam formados. Figura extraída de CUNHA *et al.*, 2012.

Em condições normais, o tempo de vida dos eritrócitos é de aproximadamente 120 dias. Após este período, a redução da atividade metabólica e a oxidação da hemoglobina – principal proteína constituinte desta célula – causam uma série de alterações morfológicas nos eritrócitos

(GHAFFARI, 2008). Estas alterações são reconhecidas pelo sistema mononuclear fagocitário – constituído por monócitos e macrófagos presentes no fígado e baço –, que remove as células da circulação sanguínea. A aceleração da destruição das hemácias é a característica mais importante encontrada em várias doenças hemolíticas, como é o caso da anemia falciforme, que será discutida em detalhes posteriormente (TELEN e KAUFMAN, 1999; HOFFMAN *et al.*, 2008).

1.2. Ontogenia das hemoglobinas humanas

O transporte de oxigênio do pulmão para os tecidos e de dióxido de carbono dos tecidos para o pulmão é a principal função dos eritrócitos. Este transporte é exercido através da molécula de hemoglobina (Hb), que constitui 95% das proteínas totais dos eritrócitos. Sua estrutura globular é formada por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β). Cada uma dessas cadeias se associa a um grupo prostético heme, composto por um átomo de ferro divalente capaz de se ligar de modo reversível à molécula de oxigênio (PERUTZ *et al.*, 1960; STEINBERG, BRUGNARA, 2003).

A produção das cadeias globínicas é controlada por genes localizados em dois grupamentos cromossômicos diferentes: α e β . O grupamento α está situado no braço curto do cromossomo 16 e possui um gene zeta embrionário ($\zeta 2$), os pseudogenes psizeta ($\psi\zeta 1$), psi alfa 2 ($\psi\alpha 2$), psi alfa 1 ($\psi\alpha 1$), dois genes alfa ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e um gene teta (θ) de função indeterminada. Todos esses genes estão arranjados no sentido 5' \rightarrow 3', na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento (WEATHERALL, CLEGG, 2001; HIGGS, WOOD, 2008).

O grupamento β está localizado no braço curto do cromossomo 11 e é composto pelo gene embrionário épsilon (ϵ); pelos genes gama-alanina (γA) e gama-glicina (γG), que são característicos do período fetal e divergem em apenas um aminoácido em sua estrutura; pelo pseudogene beta ($\psi\beta$); e pelos genes delta (δ) e beta (β), que são ativados apenas no final do período fetal e se expressam completamente após o nascimento. Estes genes também estão dispostos no cromossomo na ordem em que são expressos (Figura 1) (ANTONARAKIS *et al.*, 1985; GROSVELD *et al.*, 1993; SCHECHTER, 2008).

No decorrer do desenvolvimento, ocorrem mudanças na expressão desses genes, resultando nos diferentes tipos de hemoglobinas humanas (Figura 2). A partir da décima segunda semana de gestação, quando termina a fase embrionária – constituída por HbGower 1, HbGower 2 e HbPortland –, tem início a formação da hemoglobina Fetal ($\alpha 2\gamma 2$), a mais importante da vida intra-uterina. A partir da trigésima semana, ocorre o aumento da produção das cadeias de globina

β . Estas progressivamente substituem as cadeias γ , formando a hemoglobina do adulto – hemoglobina A1 ($\alpha_2\beta_2$) –, que aumenta gradativamente até constituir aproximadamente 97% do conteúdo de hemoglobina seis meses após o nascimento. Há, também, outra hemoglobina encontrada na fase adulta que é formada pela combinação das globinas α e δ , denominada hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$), e que representa 2–3% da hemoglobina total. A produção de hemoglobina fetal pode não cessar totalmente na vida adulta, mantendo um nível entre 0 e 1%, quadro benéfico para pacientes com anemia falciforme (seção 1.3.) (WEATHERALL, CLEGG, 2001; ANTONARAKIS *et al.*, 1985; HONIG, ADAMS III, 1986; MIGLIACCIO, PAPAYANNOPOULOU, 2001; STEINBERG, 2005).

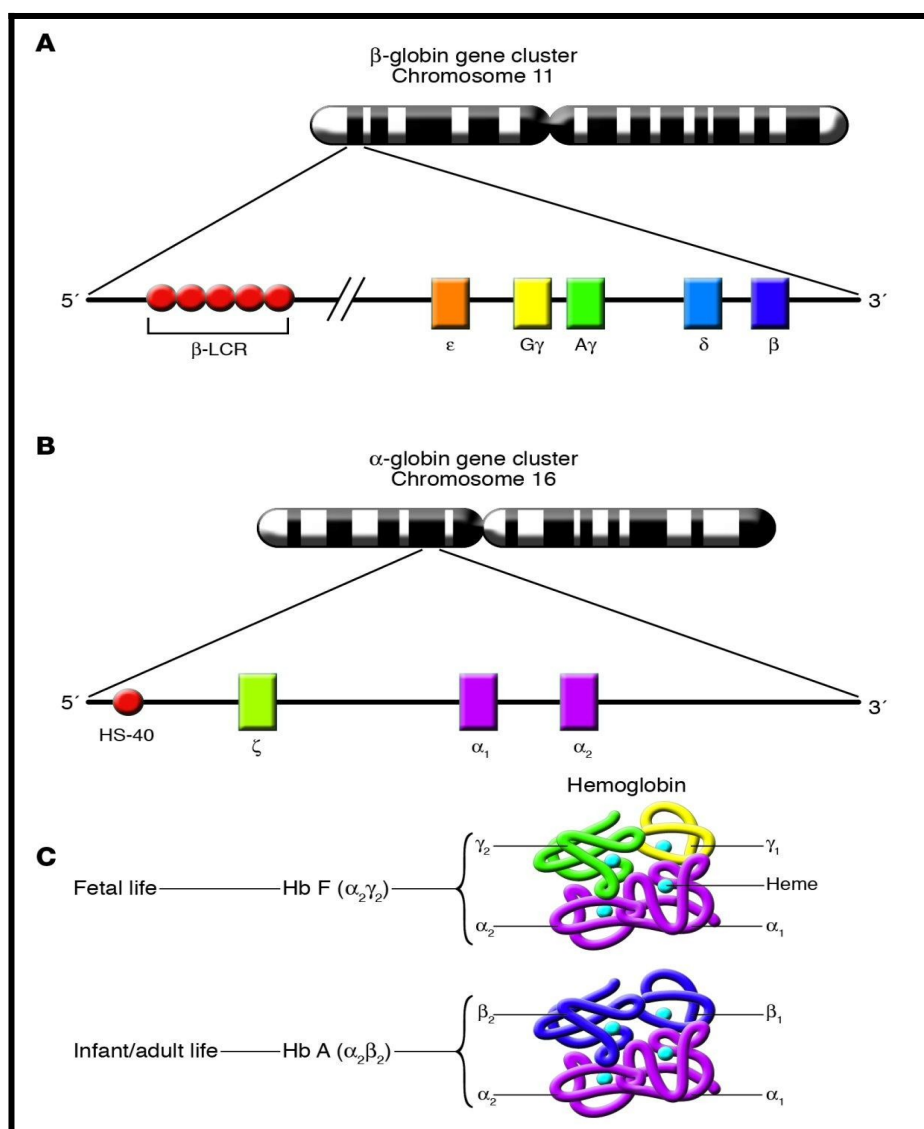


Figura 2 – Grupamento dos genes de α e β globina e as principais hemoglobinas produzidas durante o desenvolvimento humano. Os genes responsáveis pela tradução das cadeias globínicas estão organizados em dois grupamentos gênicos localizados em cromossomos diferentes. O grupamento α localiza-se no braço curto do cromossomo 16 e o grupamento β está situado no braço curto do cromossomo 11. Durante o desenvolvimento humano

ocorrem mudanças na expressão desses genes, resultando em diferentes tipos de hemoglobinas (figura extraída da publicação de FRENETTE e ATWEH (2007), com livre acesso em: <<https://www.jci.org/articles/view/30920>>).

1.3. Hemoglobinopatias e a anemia falciforme

A expressão dos genes da hemoglobina normal pode ser afetada por mutações, resultando em hemoglobinopatias que representam as formas mais comuns de anemia hemolítica hereditária. Estas alterações podem ser divididas em três grupos: variantes estruturais, alterações no ritmo de produção e uma anomalia que se caracteriza pela persistência da produção de cadeias γ durante a vida adulta, chamada de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (BUNN, FORGET, 1986; SONATI, COSTA, 2008).

Do ponto de vista clínico, as principais hemoglobinopatias são as talassemias e as doenças falciformes, dentre elas a anemia falciforme, variante estrutural que é foco deste trabalho. A anemia falciforme é uma das desordens hematológicas mais comumente herdadas em todo o mundo. É causada por um distúrbio genético autossômico recessivo que leva a modificações estruturais na molécula de hemoglobina, resultando em alterações importantes na formação das hemácias. Esta hemoglobinopatia ocorre devido à substituição de uma adenina por uma timina no códon 6 do gene da beta globina, levando à tradução de uma valina no lugar de um ácido glutâmico. Tal substituição provoca modificações estruturais no tetrâmero da hemoglobina adulta, culminando no surgimento de uma hemoglobina atípica denominada hemoglobina S (HbS) (SERJEANT, SERJEANT, 2001; STEINBERG *et al.*, 2001).

A HbS tem sua conformação molecular modificada em condições de baixa disponibilidade de oxigênio devido à presença da valina, que interage com os receptores leucina (β -88) e fenilalanina (β -85) na molécula de hemoglobina S adjacente. Esta interação hidrofóbica leva à formação de polímeros de desoxihemoglobinas enoveladas entre si, processo que evolui com o alongamento e alinhamento de mais fibras, gerando uma estrutura multipolimérica. Quando a hemoglobina S é novamente oxigenada, este polímero se desfaz, mas após diversos ciclos de polimerização e despolimerização, a ligação torna-se irreversível e, por apresentar diferente estabilidade e solubilidade, culmina na formação de fibras que se depositarão nos eritrócitos. Com isso, ocorrerá deformação e enrijecimento da membrana celular da hemácia, levando as células a assumirem a forma de foice característica da doença em vez do formato bicôncavo esperado. Tais fatores somados a outros agravantes resultam em oclusão vascular e lesão tecidual, manifestações clínicas recorrentes nos pacientes (BUNN, 1997; GALIZA NETO, PITOMBEIRA, 2003).

Algumas características estão associadas à gravidade e evolução clínica dos pacientes com anemia falciforme, como o haplótipo ligado ao grupo de genes da globina β^S e os níveis de hemoglobina fetal (HbF). Os haplótipos do grupamento β são classificados em cinco tipos de acordo com a origem e área geográfica onde são predominantes e estão fortemente relacionados com a evolução da doença, sendo eles: Benin, Senegal, Camarões, Asiático e CAR (República Centro Africana). Eles também exercem influência na regulação da produção de HbF e, portanto, na relação entre a concentração de HbS e HbF (NAGEL, 1984; SUTTON *et al.*, 1989; ZAGO *et al.*, 1999).

Como a HbF possui cadeia γ no lugar da cadeia β – que é a que contém a mutação responsável pela polimerização –, os níveis de HbF estão inversamente relacionados com a gravidade da doença, pois estas inibem a polimerização da hemoglobina S e a falcização dos eritrócitos, amenizando o quadro clínico do paciente (SERJEANT, SERJEANT, 2001). Partindo deste princípio, o medicamento conhecido como Hidroxiureia (HU) ou Hidroxicarbamida (seção 1.4) passou a ser utilizado no tratamento da anemia falciforme por aumentar o nível de HbF e apresentar benefícios adicionais no quadro clínico dos pacientes, cujos mecanismos ainda não foram bem elucidados (PAIKARI e SHEEHAN, 2018).

1.3.1. Fisiopatologia da anemia falciforme

As alterações fisiopatológicas decorrentes da anemia falciforme podem ser observadas em diferentes níveis (Tabela 1). A complicação marcante associada à doença é a dolorosa crise vaso-oclusiva. Embora a vaso-oclusão seja um fenômeno complexo, a polimerização da HbS é a ocorrência fisiopatológica essencial, pois ela altera a forma e as propriedades físicas dos eritrócitos, resultando em anemia hemolítica e bloqueio do fluxo sanguíneo, o que pode danificar diferentes órgãos. Além disso, os polímeros de HbS levam a outras anormalidades no nível celular que contribuem para o mecanismo fisiopatológico geral da doença (STEINBERG, 1998; VEKILOV, 2007).

O fenômeno de falcização da hemácia está relacionado a fatores que o facilitam ou dificultam. Para que as moléculas de HbS se agreguem é necessário que, além de desoxigenadas, estejam em elevada concentração. Outro fator é que o fenômeno de falcização não é instantâneo. Para que ocorra falcização, é necessário que a hemácia sofra um retardo na circulação, processo que ocorre com mais frequência em determinados órgãos, como o baço, onde as condições de

circulação facilitam a falcização e provocam repetidos enfartos que levam à fibrose e destruição do órgão na maioria dos pacientes (ZAGO, 2007).

A formação de polímeros de HbS dentro das hemácias tem como consequência múltiplas alterações da célula, como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e a formação de polímeros de hemoglobina com proteínas da membrana. Desta forma, a membrana acaba por refletir as alterações moleculares que estão ocorrendo no interior da célula. Tais modificações têm consequências que as amplificam, levando a manifestações clínicas como: aumento da adesão de hemácias ao endotélio, que desencadeia fenômenos inflamatórios; enrijecimento da membrana da hemácia, encurtando sua sobrevivência em circulação; lesões microvasculares; depleção de óxido nítrico que contribui para vasoconstrição e indução de inflamação; ativação da coagulação (ZAGO, 2007).

Tabela 1. Alterações fisiopatológicas em diferentes níveis nas doenças falciformes	
Nível	Fenômenos ou alterações
Molecular e celular	Mutação da hemoglobina Polimerização da Hb desoxigenada Falcização Alterações de membrana
Tecidos e órgãos	Adesão celular ao endotélio Hipóxia local Isquemia Inflamação Lesão microvascular Ativação da coagulação Depleção de NO
Organismo (paciente)	Dor Anemia hemolítica Insuficiência de múltiplos órgãos

Tabela 1. Alterações fisiopatológicas em diferentes níveis nas doenças falciformes. Extraída da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

Os eritrócitos falciformes são altamente instáveis, com uma vida útil reduzida em $\geq 75\%$. Acredita-se que a hemólise ocorra principalmente via fagocitose extravascular por macrófagos, mas uma fração substancial (aproximadamente um terço) ocorre por hemólise intravascular. A hemólise é uma causa e um efeito do estresse oxidativo. Os níveis substanciais de estresse oxidativo nos eritrócitos falciformes aumentam a auto-oxidação da HbS, o que poderia contribuir para o dano da membrana celular, envelhecimento prematuro dos eritrócitos e hemólise. Além da

acelerada autoxidação de HbS, os radicais de oxigênio resultam do aumento da expressão de oxidases, heme extracelular e Hb no plasma. As proteínas citoesqueléticas e lipídios da membrana são oxidadas e o estresse oxidativo crônico nos eritrócitos falciformes diminui os níveis de antioxidantes catalíticos, como a superóxido dismutase, peroxiredoxina-2 e peroxiredoxina-4. A capacidade antioxidante prejudicada provavelmente contribui para a hemólise (ROGERS, 2013; ALAYASH, 2018).

O heme livre no plasma e a Hb atuam como ativadores do sistema imunológico e aumentam a aderência das células sanguíneas circulantes entre si e com o endotélio, desencadeando assim a vaso-oclusão. O heme livre ativa neutrófilos, que por sua vez induzem a ativação plaquetária e a trombose, promovendo vaso-oclusão pulmonar e liberação do fatores de crescimento nos eritroblastos. Esses fatores de crescimento se ligam ao receptor 1 de fator de crescimento endotelial vascular em células endoteliais e macrófagos, promovendo a liberação da endotelina-1, que contribui para a hipertensão pulmonar. O receptor *toll-like-4* (TLR4) é altamente expresso nas células imunes da anemia falciforme, e danos nos tecidos e ativação plaquetária liberam um ligante TLR4 de alta afinidade. O TLR4 também se liga a lipopolissacarídeo (LPS) derivados de bactérias gram-negativas, o que poderia explicar porque as infecções promovem crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme. Os ligantes de TLR4 são ativados por monócitos e macrófagos para liberar citocinas inflamatórias, que promovem um estado inflamatório e ativam a adesividade de neutrófilos, plaquetas e células endoteliais. Finalmente, o aumento intracelular de eritrócitos hemolisados e transfundidos está associado a um aumento acentuado da expressão de células mononucleares no sangue periférico (GLADWIN, 2014; WANG *et al.*, 2014; KATO *et al.*, 2017).

Logo, a vaso-oclusão na anemia falciforme é um fenômeno complexo no qual as interações entre eritrócitos e células endoteliais, leucócitos e plaquetas desempenham um papel central. As células endoteliais são provavelmente ativadas pelo contato direto dos eritrócitos falciformes, heme livre, Hb e EROs. A biodisponibilidade reduzida de NO também pode induzir a expressão de moléculas de adesão endotelial como VCAM-1, ICAM-1, P-selectina e E-selectina. As células endoteliais ativadas produzem mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), o que leva a um estado inflamatório crônico (KATO *et al.*, 2017).

1.4. Hidroxiúrea

Inicialmente utilizada como quimioterápico, foi notado que a HU induzia a expressão de genes da γ -globina, possivelmente pela indução da guanilato ciclase – via da proteína G-quinase – ou pelo aumento da expressão de fatores de transcrição e outros genes com papel importante na eritropoese. Trata-se de uma droga que inibe a ribonucleotídeo redutase, mantendo a divisão celular na fase S, e que adicionalmente gera óxido nítrico após a administração, além de exercer efeito anti-angiogênico (LOPES *et al.*, 2014; 2015). Apesar de ser atualmente o principal tratamento para anemia falciforme e a melhora no quadro clínico dos pacientes ser notável para a maioria – tais como redução da frequência de dor e crises vaso-oclusivas e menor requerimento de transfusão e hospitalização –, os genes ativados ou inibidos e os mecanismos envolvidos para esses resultados ainda não estão bem elucidados (IKUTA *et al.*, 2001; COKIC *et al.*, 2003; BARAZIA *et al.*, 2015).

Há indícios de que um dos mecanismos celulares em que HU atua é na inibição da adesão de leucócitos ao endotélio vascular, diminuindo assim a vaso-oclusão que, como citado anteriormente, é uma importante manifestação fisiopatológica da anemia falciforme. Utilizando um modelo animal com vaso-oclusão induzida, foi demonstrado que a administração a curto prazo de HU altera significativamente o recrutamento de leucócitos para a microvasculatura. Os resultados indicam que a HU tem efeitos benéficos sobre a vasculatura em células falciformes, os quais são independentes das propriedades de elevação de hemoglobina fetal da droga e provavelmente envolvem a formação de óxido nítrico intravascular (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Recentemente, Guarda e colaboradores (2019) obtiveram resultados relevantes ao investigar os diferentes tipos de células que contribuem para a vaso-oclusão com ênfase nos subconjuntos de monócitos, observando sua capacidade de expressar moléculas pró-inflamatórias e fator tecidual (TF). Os resultados sugerem que a HU diminuiu a produção de TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-8 e TF pelos monócitos ativados por lipopolissacarídeos. Da mesma forma, a frequência de monócitos que expressam TF é aumentada em pacientes com vaso-oclusão. Além disso, monócitos ativados que expressam TF produziram várias citocinas pró-inflamatórias simultaneamente e essa capacidade polifuncional foi consideravelmente atenuada pela terapia com HU (GUARDA *et al.*, 2019).

Já Hasson e colaboradores (2019) obtiveram resultados que sugerem que a hidroxiureia pode prevenir um acidente vascular cerebral (AVC), ocorrência muito comum nos primeiros anos de vida de um paciente com anemia falciforme. Os estudos analisados sugerem que a hidroxiureia

é bem tolerada e reduz a incidência de AVC silencioso nos pacientes tratados com relação aos que não recebem o medicamento (HASSON *et al.*, 2019).

Em estudo publicado em 2006, a fim de conhecer os mecanismos envolvidos na ação da HU, um perfil de expressão gênica foi obtido a partir de células da medula óssea de um paciente com anemia falciforme antes e depois do tratamento com o medicamento. A Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE) mostrou a expressão diferencial de 147 transcritos, sendo 82 deles reprimidos e 65 induzidos pela hidroxiureia. Em estudo posterior, SUDS3 (suppressor of defective silencing 3 homologue), FZD5 (frizzled homologue 5) e PHC3 (polyhomeotic homologue 3), entre outros, foram identificados como genes que podem estar fortemente associados com a regulação da expressão da globina gama (COSTA *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2008).

Com base nas pesquisas já realizadas nessa área e para maior elucidação dos mecanismos responsáveis pela melhora do quadro clínico dos pacientes, quatro genes cuja relação com a anemia falciforme e hidroxiureia ainda não foi analisada foram selecionados para o presente estudo.

1.5. Genes selecionados para análise de expressão

1.5.1. *ATF4* (Activating Transcription Factor 4)

A proteína codificada por este gene pertence a uma família de proteínas que se liga ao DNA. A expressão da mesma é induzida por sinais de estresse, sendo um gene que regula a proteção e adaptação das células a fatores como hipóxia/anóxia, estresse do retículo endoplasmático e estresse oxidativo (CIBELLI *et al.*, 1999; HARDING *et al.*, 2000).

A relação de *ATF4* com doenças vem principalmente de estudos *in vitro* e com animais. Estudos em mamíferos geneticamente modificados têm indicado que *ATF4* é requerido para o desenvolvimento dos olhos e esqueleto, proliferação celular, hematopoese e está envolvido com desordens neurológicas. *ATF4* também tem sido observado em maiores taxas em tumores do que em tecidos normais, sugerindo que a sinalização para *ATF4* gerada em áreas de tumores com hipóxia/anóxia possa regular processos relevantes para a progressão do câncer (MASUOKA, TOWNES, 2002; AMERI *et al.*, 2004; BI *et al.*, 2005).

Em estudo publicado em 2019, Pereira e colaboradores identificaram *ATF4* como um fator de transcrição responsivo ao ferro em macrófagos humanos. O ferro é um metal essencial que ajusta a resposta imune inata. Através da quelação aguda de ferro em macrófagos humanos primários, as respostas transcricionais e metabólicas resultantes foram avaliadas. Foi possível

observar a modulação dependente de ferro na expressão de alguns dos alvos conhecidos de ATF4, o que foi notado através da curta exposição a FeCl₃ após a quelação de ferro. Os macrófagos humanos privados de ferro mostraram uma inibição da fosforilação oxidativa e um aumento concomitante da glicólise. Em camundongos, a privação aguda de ferro reduz a proliferação celular glomerular e induz o acúmulo de lipídios no córtex renal. Estes resultados sugerem que a privação aguda de ferro tem efeitos protetores *in vivo* mediados por uma troca imunometabólica anti-inflamatória em macrófagos, havendo uma forte associação com a expressão de *ATF4* (PEREIRA *et al.*, 2019).

Um estudo mostrou que a mutação nocaute de *ATF4* provoca anemia fetal grave em camundongos. Fígados de fetos com genótipo *ATF4*^{-/-} são pálidos e hipoplásicos e o número de células progenitoras hematopoiéticas de múltiplas linhagens é diminuído mais de duas vezes. Portanto, o ATF4 é essencial para o alto nível de proliferação requerido para a hematopoese fetal no fígado (MASUOKA, TOWNES, 2002). Além disso, outro estudo mostrou a relação do ATF4 com a angiogênese, induzindo a expressão de fatores de crescimento durante o processo de espessamento da camada interna dos vasos (MALABANAN *et al.*, 2008).

Sendo assim, o gene em questão foi selecionado devido a sua relação com a hematopoese, angiogênese e por ter sua expressão induzida em condições de estresse oxidativo, quadro comum para pacientes com anemia falciforme.

1.5.2. MSN (Moesin; Membrane-Organizing Extension Spike Protein)

Moesina é uma proteína importante para o reconhecimento célula-célula, sinalização celular e para a circulação, cujo gene correspondente é expresso em células de diferentes tecidos (LANKES e FURTHMAYR, 1991).

Estudos já comprovaram que MSN interage com CD43, favorecendo o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz (DELON *et al.*, 2001; FAURE *et al.*, 2004). Além disso, em *Drosophila* essa proteína promove a montagem da actina cortical e polaridade apical-basal, ressaltando suas funções na manutenção da integridade epitelial e regulação dos eventos de sinalização celular que afetam a organização da actina (SPECK *et al.*, 2003). Ainda, MSN foi identificada como parte de um grupo de proteínas que facilita o reconhecimento de lipopolissacarídeos, resultando na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Com isso, Zawawi e colaboradores (2010) sugeriram um papel importante para a moesina na resposta imune inata.

Em estudo da angiogênese *in vitro* com siRNA e inibidores químicos, Vitorino *et al.* (2015) definiram um complexo *MAP4K4-moesin-talin-beta-1-integrin* que promove eficiente retração da membrana plasmática durante a migração de células endoteliais. A perda de *MAP4K4* (*Mitogen-Activated Protein Kinase 4*) diminuiu a dinâmica da membrana e a migração celular endotelial, e prejudicou a angiogênese *in vitro* e *in vivo*. Em migração de células endoteliais, *MAP4K4* fosforila *MSN* para retrair as membranas em sítios de desmontagem da adesão. Por conseguinte, a perda de *MSN* ou *MAP4K4* reduz a taxa de separação do complexo de adesão nas células endoteliais.

Outro estudo sugere que a fosforilação de proteínas ERM (ezrina-radixina-moesina), incluindo *MSN*, inibe a adesão celular e, portanto, a desfosforilação destas é essencial para que a adesão se mantenha. Além disso, a pesquisa concluiu que a fosforilação destas proteínas também contribui para a formação e manutenção da forma celular esférica (TACHIBANA *et al.*, 2015).

Com relação a outras doenças, já foi constatado que uma única mutação *missense* no gene que codifica *MSN* foi identificada como causa de imunodeficiência primária ligada ao cromossomo X. Consistente com sua influência na imunodeficiência, há vários relatos de associação de moesina com infecções virais, incluindo sarampo, HIV e hepatite C. Observou-se também que *MSN* está associado a distrofias musculares e diferentes tipos de câncer (MICHIE *et al.*, 2019).

Por estar envolvido na adesão celular – processo que desencadeia a vaso-oclusão em pacientes com anemia falciforme –, resposta imune e angiogênese, o gene *MSN* também foi selecionado para estudo.

1.5.3. *PBXIP1* (*Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1*)

PBXIP1 ou *HPIP* é um co-repressor de *pre-B-cell leukemia homeobox 1* (*PBX1*) e também é conhecido por regular as funções do receptor de estrógeno por meio da associação com a rede de microtúbulos (ABRAMOVICH *et al.*, 2000; WANG, 2008).

HPIP mostrou-se superexpresso em vários cânceres humanos. O estudo de Cheng e colaboradores (2019) fornece evidências de que *HPIP* prediz progressão do câncer endometrial e baixa sobrevida, destacando seu potencial como alvo terapêutico do câncer. A pesquisa constatou que pacientes com alta expressão de *HPIP* tinham tempo médio de sobrevida significativamente menor do que aqueles com baixa expressão de *HPIP* (CHENG *et al.*, 2019).

Já foi demonstrado que a superexpressão de *PBXIP1* mediada por lentivírus em células CD34+ (*Cluster of Differentiation 34+*) humanas aumenta a formação de colônias de células hematopoiéticas *in vitro*. Além disso, a expressão induzida de *HPIP* em células K562, de linhagem

celular eritroleucêmica multipotente, levou à indução da diferenciação eritroide. Tal expressão é aumentada também na presença de eritropoetina (ABRAMOVICH *et al.*, 2000).

A superexpressão de *HPIP* em ambas as células (CD34+ e K562) foi associada com o aumento da ativação da via PI3K/AKT (*phosphatidyl inositol-3-kinase*). Estes resultados indicam um papel importante da via PI3K/AKT na mediação de efeitos induzidos por *PBXIP1* sobre o crescimento e diferenciação de células hematopoiéticas (MANAVATHI *et al.*, 2012; BONE, WELHAM, 2007; LIU *et al.*, 2008). O fator de transcrição específico para linhagem eritrocitária *GATA1* (*GATA Binding Protein 1*) se liga ao promotor de *HPIP* e ativa a transcrição do gene. Logo, *PBXIP1* é um alvo de *GATA1* em células eritroides e desempenha um papel importante na diferenciação eritroide através da modulação da via PI3K/AKT (KADRI *et al.*, 2005).

Por atuar como regulador e desempenhar um papel importante no crescimento e diferenciação eritroide, sendo consideravelmente expresso nesse tipo celular, o gene *PBXIP1* também foi escolhido para análise.

1.5.4. *SNCA* (*Synuclein, Alpha*)

A alfa-sinucleína é um membro da família das sinucleínas, que também inclui beta e gama-sinucleína. Esta proteína está relacionada com a regulação da liberação e transporte de dopamina e induz fibrilização da proteína tau, associada a microtúbulos. O gene em questão está envolvido na resposta celular ao estresse oxidativo, na regulação da ativação de macrófagos, na atividade de fosfolipases e na resposta a lipopolissacarídeos (LOTHARIUS, BRUNDIN, 2002; GIASSON *et al.*, 2003; COUCH *et al.*, 2011). Costa e colaboradores (2002) examinaram a influência da α -sinucleína na resposta de células neuronais ao estímulo apoptótico, sugerindo que *SNCA* reduz a ativação da caspase 3 dependente de p53 em resposta a estímulos apoptóticos, gerando um fenótipo antiapoptótico sob condições normais.

A proteína *SNCA* está concentrada nos terminais nervosos pré-sinápticos. Agregados de α -sinucleína formam lesões cerebrais características de sinucleinopatias neurodegenerativas e o estresse oxidativo está relacionado com a patogênese de algumas destas doenças, como Parkinson (JAKES, 1994; GIASSON *et al.*, 2000). Entretanto, Nakai e colaboradores (2007) observaram expressão de *SNCA* na medula óssea e sangue periférico de camundongos, incluindo em reticulócitos e eritrócitos. Posteriormente, Scherzer e colaboradores (2008) também encontraram alta expressão de *SNCA* em glóbulos vermelhos normais durante as etapas terminais da

diferenciação dos eritrócitos, o qual foi fortemente co-expresso e co-induzido com enzimas críticas do metabolismo do grupo heme.

Outro estudo comprovou que sinais como despolarização da membrana plasmática, acúmulo de ferro intracelular e estresse oxidativo estimulam a tradução da proteína SNCA via 5'-UTR (*untranslated region*) (KOUKOURAKI e DOXAKIS, 2016). Sugere-se, assim, que a relação da tradução de SNCA com estresse oxidativo e acúmulo de ferro livre possa ser ainda mais intensificada nas células falciformes, nas quais estes são mais recorrentes.

Devido a sua associação com estresse oxidativo, resposta inflamatória, relação com o metabolismo do grupo heme e regulação de processos biológicos, o gene *SNCA* também foi selecionado para análise.

1.6. Estresse oxidativo e a anemia falciforme

O estado oxidativo das células é determinado pelo equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes. A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre esses agentes em favor da geração excessiva de radicais livres. A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas, por exemplo, mas sua produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm como objetivo limitar os níveis intracelulares das espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes. As espécies reativas de oxigênio (ERO) não incluem somente os radicais de oxigênio, como o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH^\cdot) e o radical peroxil (RO^\cdot), mas também abrangem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras moléculas (BIANCHI e ANTUNES, 1999; FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

Quando ocorre um aumento das ERO e/ou uma diminuição da capacidade antioxidante, haverá lesão de componentes celulares direta ou indiretamente. Na anemia falciforme, o estresse oxidativo é também um fator que modula o fenótipo da doença, uma vez que atua nos processos vaso-oclusivos aumentando as propriedades adesivas dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio (SULTANA *et al.*, 1998, KATO *et al.*, 2009).

Um dos fatores que predispõe ao processo hemolítico das células falciformes, induzindo-o às múltiplas consequências patológicas da anemia falciforme, é a degradação oxidativa da Hb S. Com a desoxigenação, qualquer fator que estabilize o estado desoxi reduzirá a afinidade pelo oxigênio, perpetuando este estado e a polimerização (DAS *et al.*, 1991; SOUZA, 1999).

A desoxigenação da Hb S favorece a sua meta-hemoglobinação (meta-Hb S). Quando a concentração de metaHb S supera a ação da enzima meta-Hb redutase, é desencadeada a degradação da meta-Hb S, com formação de hemicromos ou subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina S (WINTERBOURN, 1990; NAOUM, 1996).

Durante a transformação do eritrócito bicôncavo com Hb S em eritrócito em forma de foice, ocorre a degradação oxidativa da Hb S, com liberação dos seus produtos de degradação (complexos de Fe²⁺ e Fe³⁺), que atacam a membrana eritrocitária formando os hidroperóxidos lipídicos (BECKER *et al.*, 2004). As alterações de membrana resultantes da polimerização levam à falência parcial da bomba de sódio/potássio/ATPase, com consequente perda de potássio e água pela hemácia. Ocorre também aumento na concentração de cálcio intracelular devido a alteração da bomba de cálcio/ATPase e aumento da permeabilidade da membrana a esse íon (NAGEL *et al* 1991; MORRIS, RUCKNAGEL e JOINER, 1993; NAOUM, 1997).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂), apesar de não ser naturalmente tão reativo, é capaz de reagir com metais como o ferro e dar origem ao radical hidroxila (•OH), que é extremamente reativo e ataca rapidamente as biomoléculas. H₂O₂ também pode ser gerado através de fontes extracelulares e entrar no eritrócito devido à alta permeabilidade de ERO na membrana dessa célula. Desta forma, a hemoglobina está constantemente sob o efeito do H₂O₂ e existem evidências de que o aumento do H₂O₂ está diretamente relacionado com a peroxidação lipídica e a hemólise eritrocitária (FIBACH e RACHIMILEWITZ, 2017).

1.7. Célula K562 como modelo biológico de células eritroides

K562 é uma linhagem celular imortalizada inicialmente obtida a partir de uma paciente com leucemia mielóide crônica em 1970 (LOZZIO e LOZZIO, 1975). Desde que foi estabelecida, K562 tem sido amplamente visada na pesquisa biomédica como uma linhagem modelo, contribuindo para a compreensão de processos biológicos humanos fundamentais (DREXLER *et al.*, 2004; BUTLER, HIRANO, 2014).

Essas células têm sido muito utilizadas no estudo da proliferação e diferenciação celular hematopoiética, podendo se diferenciar tanto para linhagem eritrocitária quanto para linhagem megacariocítica a depender do indutor utilizado. A hemina, por exemplo, é um indutor para a linhagem eritroide. Ela é capaz de estimular a maturação das células eritrocitárias e promover a síntese de hemoglobina. Além disso, este composto é capaz de gerar uma resposta autofágica, induzindo a expressão de genes associados (KOEFFLER e GOLDE, 1980; BIANCHI *et al.*, 2012; FADER *et al.*, 2016; GROSSO *et al.*, 2019).

Diversos trabalhos têm utilizado a célula K562 como modelo biológico *in vitro* para reproduzir as características de células eritroides, auxiliando a compreender mecanismos ainda não conhecidos nesses tipos celulares (SONG *et al.*, 2016; GROSSO *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2019). A plasticidade das células K562 as torna um excelente modelo experimental para o estudo de células eritroides, o que é de fundamental importância para o entendimento de doenças como a anemia falciforme.

Desta forma, para complementar os resultados obtidos com pacientes, optamos por realizar alguns testes utilizando cultura de células K562, o que inclui a indução de estresse oxidativo através da adição de peróxido de hidrogênio a essa linhagem celular, visto que alguns de nossos genes de interesse são induzidos por estresse oxidativo e este é agravado na anemia falciforme (como já explicado no tópico anterior - item 1.6).

2. HIPÓTESE

Nossa hipótese encontra-se sumarizada na figura 3. Esperávamos que o tratamento com HU ativasse positivamente a expressão tanto de MSN quanto de PBXIPI, enquanto afeta negativamente a expressão de SNCA e ATF4. Com a ativação de MSN, esperávamos uma diminuição da adesão celular, levando à consequente diminuição das crises vaso-oclusivas tão comuns na anemia falciforme. Essas alterações amenizariam os processos inflamatórios e provavelmente atuariam inibindo os estímulos apoptóticos responsáveis pela incidência de anemia nestes pacientes. A ativação de PBXIPI auxiliaria no estímulo da diferenciação de células hematopoiéticas, repovoando o sistema circulatório com novos eritrócitos e consequentemente reduzindo as complicações causadas pelos eventos apoptóticos das células falcizadas. A diminuição na produção de SNCA tem um papel de grande importância, uma vez que reduz os efeitos inflamatórios que são os fatores de maior gravidade nesta doença, responsáveis por grande

parte das sinalizações apoptóticas desencadeadas nestas células. Por último, a redução de ATF4 reduziria a neovascularização e espessamento dos vasos, aumentando a circulação sanguínea e contribuindo também na amenização tanto de processos inflamatórios quanto apoptóticos.

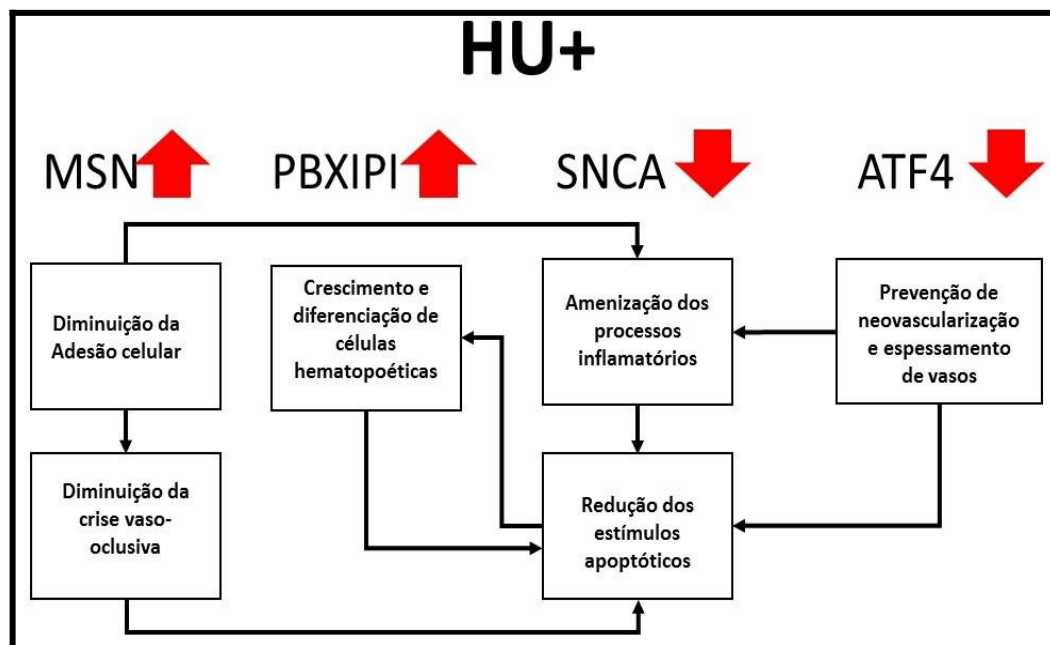


Figura 3 – Hipóteses sugeridas quanto à expressão de *MSN*, *PBXIPI*, *SNCA* e *ATF4* após o tratamento com HU.

3. JUSTIFICATIVA

De modo geral, o uso de hidroxureia leva ao aumento da síntese de hemoglobina fetal, cujos benefícios para pacientes com anemia falciforme já foram mencionados. Entretanto, alguns portadores de tal hemoglobinopatia parecem se beneficiar do uso de HU mesmo quando o nível de HbF não aumenta, sugerindo que este medicamento atue através de mecanismos adicionais ainda não elucidados e que poderão ser melhor compreendidos por meio de estudos direcionados de expressão gênica. O conhecimento de quais genes são ativados ou reprimidos pela HU, bem como os efeitos de tal alteração, é importante para ajudar a esclarecer os mecanismos pelos quais ela atua. Isso possibilitaria, por exemplo, a detecção de genes alvos para o desenvolvimento de novas terapias para a anemia falciforme e outras hemoglobinopatias, enfermidades que acometem parcela considerável da população.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão dos genes *ATF4*, *MSN*, *PBXIP1* e *SNCA* na presença e ausência de hidroxíureia em pacientes com anemia falciforme e em cultura de células K562 estimuladas para diferenciação eritroide.

4.2. Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica e conteúdo proteico dos quatro genes de interesse via qPCR e *Western Blot* em reticulócitos e hemácias de pacientes com anemia falciforme tratados e não tratados com HU, comparando também com a observada em indivíduos não acometidos pela doença;

- Realizar o cultivo de células K562 na presença e ausência de HU, incluindo ensaios de indução de estresse oxidativo;

- Relacionar os resultados obtidos com a fisiopatologia da anemia falciforme;

- Estabelecer associações com a utilização de hidroxíureia.

5. METODOLOGIA

O esquema da figura 4 resume a metodologia proposta.

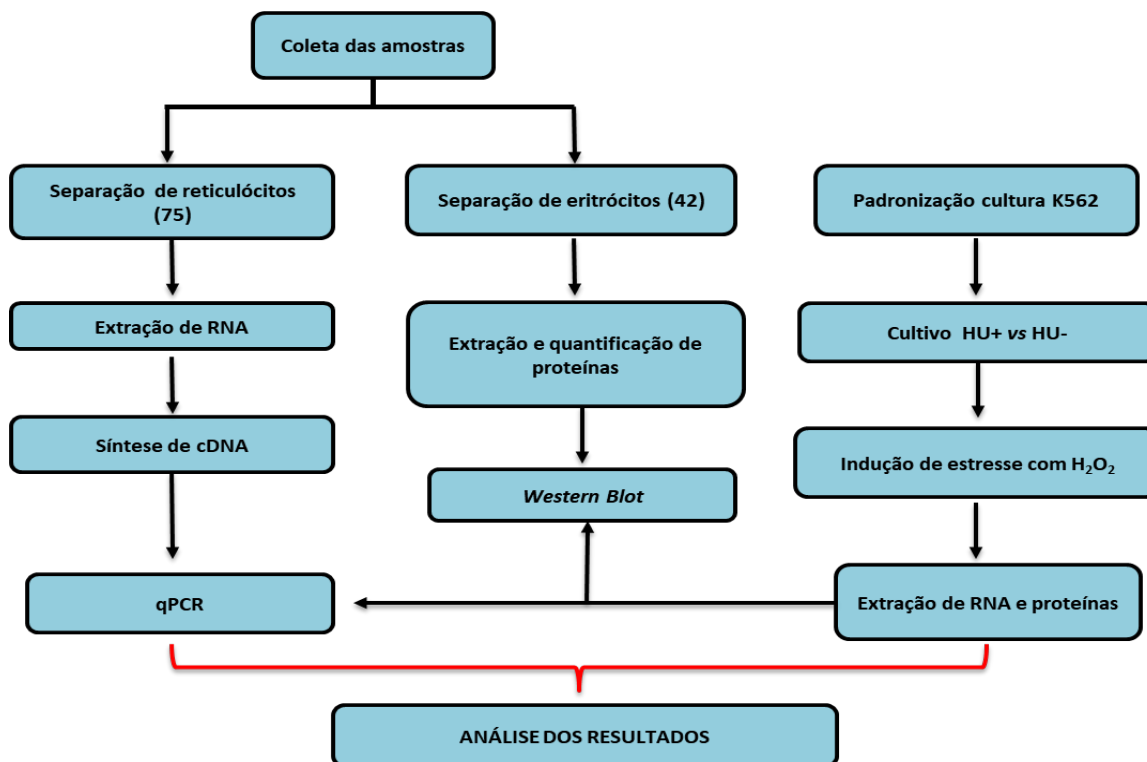


Figura 4 –

Esquema da metodologia proposta. A imagem apresenta as principais etapas experimentais da presente pesquisa.

5.1. Grupos analisados

A coleta de sangue de pacientes com anemia falciforme tratados e não tratados com HU foi realizada pelo Hemope (Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco). Uma triagem foi feita para obtenção de maiores informações sobre cada participante da pesquisa, tais como idade, sexo, perfil hematológico, haplótipo e sintomas adversos (Tabela 1).

Tabela 1 – Características gerais dos grupos de pacientes analisados tratados e não tratados com hidroxiureia

CATEGORIA	PACIENTES TRATADOS COM HU	PACIENTES NÃO TRATADOS COM HU	TOTAL
Sexo (número de indivíduos)	Homens: 10 Mulheres: 15	Homens: 12 Mulheres: 13	Homens: 22 Mulheres: 28
Idade (anos)	Faixa etária: 09 a 50 Idade média: 23,7	Faixa etária: 01 a 26 Idade média: 13,1	Faixa etária: 01 a 50 Idade média: 20,6
Haplótipo (número de indivíduos)	CAR/CAR: 12 BEN/BEN: 01 ATP*/ATP: 01 CAR/BEN: 05 CAR/CAM: 04 CAR/ATP: 00 Não genotipado: 02	CAR/CAR: 09 BEN/BEN: 05 ATP/ATP: 00 CAR/BEN: 05 CAR/CAM: 01 CAR/ATP: 03 Não genotipado: 02	CAR/CAR: 21 BEN/BEN: 06 ATP/ATP: 01 CAR/BEN: 10 CAR/CAM: 05 CAR/ATP: 03 Não genotipado: 04
Manifestações clínicas (número de indivíduos)	Úlcera: 02 A.V.C.: 05 Priapismo: 04	Úlcera: 03 A.V.C.: 05 Priapismo: 03	Úlcera: 05 A.V.C.: 10 Priapismo: 07

Para a separação das células, o sangue foi coletado em tubos contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), que foram mantidos refrigerados até o momento do processamento. O sangue de indivíduos saudáveis, composto por doadores voluntários, também foi coletado e utilizado como um terceiro grupo a ser comparado com os anteriores. Para as análises de qPCR, cada grupo foi constituído por 25 indivíduos, totalizando 75. Já para *Western Blot*, utilizamos uma média de 15 amostras por grupo de pacientes e 12 para o grupo controle. Todos os participantes só foram incluídos no estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndices C e D). É válido salientar que o projeto possui aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos (Número do Parecer: 1.370.411).

5.2. Análise da Expressão Gênica

5.2.1. Separação de Reticulócitos

A facilidade de obtenção e características intrínsecas levaram à escolha do reticulócito como o tipo celular em que a expressão dos genes selecionados foi analisada, visto que estas células ainda possuem resquícios de ácido nucléico – diferente do eritrócito maduro. Para tal, as amostras de sangue periférico (4mL) foram coletadas em tubos com EDTA e transferidas para tubo plástico cônico de 50mL. Foi feita a centrifugação para remoção do plasma e os eritrócitos foram lisados com solução de lise de hemácias (0,144M NH_4Cl ; 0,01M NH_4HCO_3). As amostras foram incubadas em gelo por 30 min, com agitação vigorosa a cada 5 min, e passaram por nova centrifugação seguida da homogeneização do sobrenadante com 1/10 de volume de uma solução de Sucrose/KCl (1,5M $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$; 0,15M KCl, filtrada ou preparada com H_2O tratada com DEPC (pirocarbonato de dietila)), que foi então centrifugado novamente. O sobrenadante contendo apenas reticulócitos foi transferido para novo tubo, tratado com 700 μL de ácido acético 10% e centrifugado pela última vez. O precipitado (*pellet*) foi então ressuspendido e homogeneizado em 1mL de Trizol® (Invitrogen).

5.2.2. Extração de RNA

Para obtenção do RNA de reticulócitos foi utilizado o método de extração com Trizol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 200 μL de clorofórmio (CHCl_3) às amostras e uma nova incubação foi feita por 3 min à temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 min a 12.000xg com temperatura de 4°C,

o sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com isopropanol. Após homogeneização, foi realizada incubação por 10 min em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 min a 15.000xg e 4°C. O sobrenadante foi então descartado e 1mL de etanol 75% adicionado ao precipitado, sendo realizada nova centrifugação por 5 min a 15.000xg e 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 min à temperatura ambiente, sendo então ressuscitado em água livre de RNase e incubado a 55°C por 10 min e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA (a -80°C). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e avaliadas quanto à integridade em gel desnaturante de agarose.

5.2.3. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para retirar possíveis contaminações do RNA com moléculas de DNA, 1,0µg de cada RNA extraído foi tratado com 1µL da enzima *DNaseI* (Fermentas, ThermoScientific) e tampão adequado por 30 min, seguido da inativação da enzima por meio da adição de EDTA. A síntese do cDNA foi realizada por meio da reação de transcrição reversa a partir do RNA tratado, utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Esse mesmo procedimento foi realizado para um tubo contendo todos os reagentes da transcrição, mas aplicando-se apenas água no lugar da amostra de RNA (controle negativo). Para verificar a eficiência da reação da transcriptase, foi realizada a amplificação por qPCR utilizando iniciadores para o gene referência β -actina (*ACTB*).

5.2.4. Reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A detecção de amplificação por PCR tempo real foi feita no equipamento “StepOne Plus” (Applied Biosystems), utilizando o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Foram utilizados os *primers* previamente desenhados e padronizados para cada gene e como controle foram utilizados *primers* para amplificação do gene *ACTB* (Apêndice A). Vale salientar que, seguindo o estabelecido por Bustin e colaboradores (2009), diversos genes referência foram testados pelo nosso grupo de pesquisa e entre eles o da *ACTB* foi o que se mostrou o mais estável e adequado para a análise dos genes de interesse desse estudo, não sendo afetado pela doença ou pelo tratamento com HU.

As amostras foram amplificadas em duplicata, em placas de 96 poços com vedação plástica que permite a passagem de luz, havendo sempre uma duplicata de controle negativo (presença do

primer na ausência de cDNA). No equipamento, cada placa foi exposta a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após a amplificação, a curva de *melting* foi determinada por meio da variação de temperatura de 95°C por 15 min, 60°C por 1 min e novamente 95°C por 15 min.

A quantificação dos resultados se baseia na derivação da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O ΔCt é calculado utilizando a diferença na média de Ct entre o gene alvo e o gene referência. Em seguida, o $\Delta\Delta Ct$ é calculado em relação a uma situação considerada como controle, que constitui a amostra calibradora. Adotamos como calibrador a média de ΔCt dos indivíduos saudáveis (controles) para cada gene alvo.

5.3. Análise do conteúdo proteico

5.3.1. Separação das células vermelhas

O sangue foi coletado em tubo contendo EDTA. Para separação dos eritrócitos, o sangue com EDTA foi transferido para tubos plásticos cônicos de 15mL, centrifugados a 1700xg por 10 min e à temperatura de 4°C. Para essa etapa, foram utilizadas 28 amostras distintas, sendo 08 de indivíduos sadios, 10 de falciformes não tratados com HU e mais 10 de pacientes falciformes tratados com o medicamento.

5.3.2. Extração e quantificação de proteínas

Para extração de proteínas, 200µL dos eritrócitos isolados foram transferidos para um tubo de 1,5mL. Em seguida, adicionou-se 1mL de solução de lise de hemácias (0,144M NH₄Cl; 0,01M NH₄HCO₃) e inibidor de protease. As amostras foram incubadas em gelo por 30 min, com agitação vigorosa a cada 5 min. Finalmente, foi realizada a centrifugação e o sobrenadante contendo o extrato proteico foi transferido para um novo tubo de 1,5mL, que foi armazenado em *freezer* a -80°C.

As proteínas totais foram quantificadas no espectrofotômetro Libra S50 (Biochrom) pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). O comprimento de onda adotado para quantificação das amostras após as reações foi de 650nm.

5.3.3. Western Blot

Para cada proteína, foram consideradas três situações distintas: comparação de indivíduos sadios com falciformes não tratados com hidroxiiureia, comparação de indivíduos sadios com

pacientes tratados e comparação de falciformes não tratados com tratados. A mesma quantidade de proteína (50µg) para todas as amostras foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE e essas amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por *eletroblotting* em tampão contendo Tris-HCl 150mM, glicina 50mM, metanol 20% e SDS 10%. A membrana foi bloqueada com 9% de leite desnatado em tampão de solução salina-trizma com detergente Tween (TBS-T – 10mM tris-HCl, 150mM NaCl e Tween a 0,1%), lavada com TBS-T e incubada sob agitação *overnight* com anticorpo primário específico para cada proteína de interesse (Apêndice B).

Após nova lavagem com TBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário adequado para cada anticorpo primário. As bandas foram detectadas por quimioluminescência com o uso do kit Amersham ECL Prime *Western Blot Detection Reagent* (GE Healthcare Life Sciences) e subsequente exposição a um fotodocumentador equipado com câmera CCD (ChemiDoc da Bio-Rad). A análise quantitativa por densitometria óptica foi realizada através do ImageLab™ *Software*.

5.4. Cultivo de células eritroleucêmicas K562

Para o cultivo de K562, utilizamos o meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). A cultura celular foi mantida em frascos de poliestireno em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao meio foram adicionados os antibióticos penicilina (100U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e fungicida anfotericina B (0,25µg/mL). Utilizamos 10% de Soro Fetal Bovino como complemento do meio de cultura, que contém fatores de crescimento, hormônios, proteínas, peptídeos, nucleosídeos e lipídeos importantes para a proliferação celular. Diariamente, as células foram observadas quanto a sua confluência, morfologia e possíveis contaminações, adicionando-se meio fresco suplementado com 10% de soro fetal bovino e trocando-o quando necessário (em casos de mudança de pH ou precipitação excessiva de células mortas).

Após aproximadamente uma semana de cultivo, quando obtivemos um número de células suficiente, foi realizado o congelamento de parte delas. Para isso, utilizamos como solução criopreservante a mistura de DMSO 10% e soro fetal bovino 90%. A cada tubo criopreservante adicionamos 1mL de solução criopreservante contendo 2×10^6 células/mL com viabilidade acima de 80%. Os tubos foram armazenados em ultrafreezer a -80°C por 12-24 h e transferidos para o nitrogênio líquido.

Células com 90% de viabilidade e 70-90% de confluência em proliferação por cerca de uma semana foram utilizadas para a diferenciação. A diferenciação das células foi acompanhada durante

quatro dias (D₁, D₂, D₃ e D₄), além do dia anterior à indução de diferenciação (D₀). Foram utilizados frascos de 50 mL contendo 10ml de cultura celular à 2x10⁶ células/ml para cada dia das seguintes culturas:

- a) Células K562 não diferenciadas (controle);
- b) Células K562 diferenciadas com hemina;
- c) Células K562 diferenciadas com hemina e hidroxiureia;
- d) Células K562 diferenciadas com hemina, com adição de hidroxiureia somente após a coleta do dia 2;
- e) Células K562 diferenciadas somente com hidroxiureia.

Essas cinco situações foram escolhidas a fim de avaliar o efeito da HU sobre a expressão dos genes analisados neste estudo durante e após a diferenciação. Portanto, uma cultura na ausência de agentes indutores foi utilizada como controle negativo da diferenciação. Optamos também por utilizar cultura sob indução tanto de hemina quanto de hidroxiureia como situação ideal para a diferenciação de K562. Dois cultivos (“b” e “d”) foram induzidos inicialmente somente com hemina e, após o auge da produção das globinas que acontece no dia 2, aplicamos HU a um desses cultivos a fim de avaliar o efeito desse medicamento sobre as células que já estavam em um avançado estágio de diferenciação. Essa adição posterior de HU também foi importante particularmente para o gene *PBXIP1*, que está diretamente relacionado com a diferenciação eritroide. Logo, considerando essa situação (“d”), tentamos avaliar o efeito de HU sobre a expressão dos genes desvinculando-o do estágio de diferenciação em que as células se encontram. Uma quinta situação considerando somente a presença de HU como indutor desde o início do cultivo também foi avaliada.

Em cada frasco de cultura a ser diferenciada, foi adicionado 50µM de hemina e 100µM de hidroxiureia quando apropriado. A cada dia, o material de cada frasco foi coletado e centrifugado, o precipitado celular foi ressuspensionado em 1mL de PBS, centrifugado novamente e ressuspensionado em 1mL de TRIzol para posterior extração de RNA e análise de expressão gênica.

Para a análise proteica, as células foram congeladas na presença do inibidor de protease complet Mini® (Roche AppliedScience). Para a extração das proteínas totais, o *pellet* celular foi descongelado em gelo e homogeneizado. Foram acrescentados 300µl de solução de lise (NP-40 1%, NaCl 150mM e TRIS-HCl 50mM pH 8,0) seguido de agitação por 2 min e incubação em gelo por 30 min. Após o tempo de incubação, o extrato foi centrifugado (20 min, 12.000xg, 4°C) e então

o sobrenadante era retirado e armazenado em novo tubo para as análises. As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Após estabelecer a mesma concentração de proteínas totais para todas as amostras (50µg), adicionou-se a elas tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) e em seguida as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100°C por 5 min, dando sequência ao protocolo de *Western Blotting*.

5.4.1. Indução de estresse oxidativo por meio da adição de H₂O₂

Com o intuito de avaliar o efeito de HU para cada um dos genes no que diz respeito ao estresse oxidativo, este foi induzido através da adição diária de 100µM de H₂O₂ (DAGNELL *et al.*, 2017) à cultura, coletando RNA e proteína a cada 24h. Para cada situação, foi feito um cultivo controle na ausência de peróxido de hidrogênio.

5.5. Forma de Análise dos Resultados

Os resultados obtidos para os pacientes foram comparados por meio do teste de Kruskal Wallis seguido de Dunn e apresentados na forma de gráficos de dispersão com mediana e desvio padrão. Já para a cultura, como não foi possível realizar replicatas do experimento, não há dados estatísticos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. qPCR - reticulócitos

A qualidade de todos os RNAs utilizados neste trabalho foi averiguada através da integridade do RNA ribossomal. Como dito, o RNA ribossomal é utilizado para análise da qualidade do RNA total por ser o mais abundante no meio intracelular, e, estando este íntegro, espera-se que a mesma afirmação seja válida para o mRNA, que é mais escasso. O rRNA 28S tem função catalítica, fazendo parte da atividade da peptidil transferase da subunidade 60S. Já o 18S tem uma função de reconhecimento relacionada com o posicionamento correto da molécula de mRNA e da peptidil tRNA (KARP, 2005).

Verificada a integridade do RNA conforme exemplificado na figura 5, foi feita a quantificação dos RNAs seguida de transcrição reversa, O cDNA dos respectivos participantes foi testado com o gene referência *ACTB* a fim de analisar a eficiência da transcrição.

Comprovando-se que esta foi bem sucedida, as amostras estavam prontas para as análises por PCR em tempo real, cujos resultados serão apresentados posteriormente.

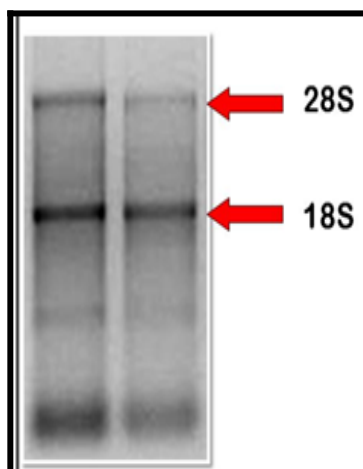


Figura 5 – Gel desnaturalizante de agarose com amostras de RNA de reticulócitos de dois participantes do grupo de indivíduos saudáveis. Pode-se observar a integridade das moléculas de ácido ribonucleico através das distintas bandas para as subunidades 28S e 18S (indicadas respectivamente pela seta vermelha) do RNA ribossomal. Figura visualizada pelo fotodocumentador GelDoc, da Bio-Rad.

A padronização dos *primers* já havia sido realizada no projeto de TCC da autora dessa dissertação, cujas características encontram-se descritas no Apêndice A. A título de exemplificação das curvas de eficiência geradas pelo programa, temos a figura 6, referente à padronização para o gene *ATF4*. Como gene referência, optamos pela β -actina (*ACTB*). Vale salientar que outros genes de referência foram testados, com resultados similares ao da *ACTB*, que foi escolhido por ser um gene constitutivo que é expresso em níveis moderadamente abundantes na maioria dos tipos celulares e já amplamente utilizado no tipo celular em estudo, codificando uma proteína do citoesqueleto celular (BUSTIN, 2009).

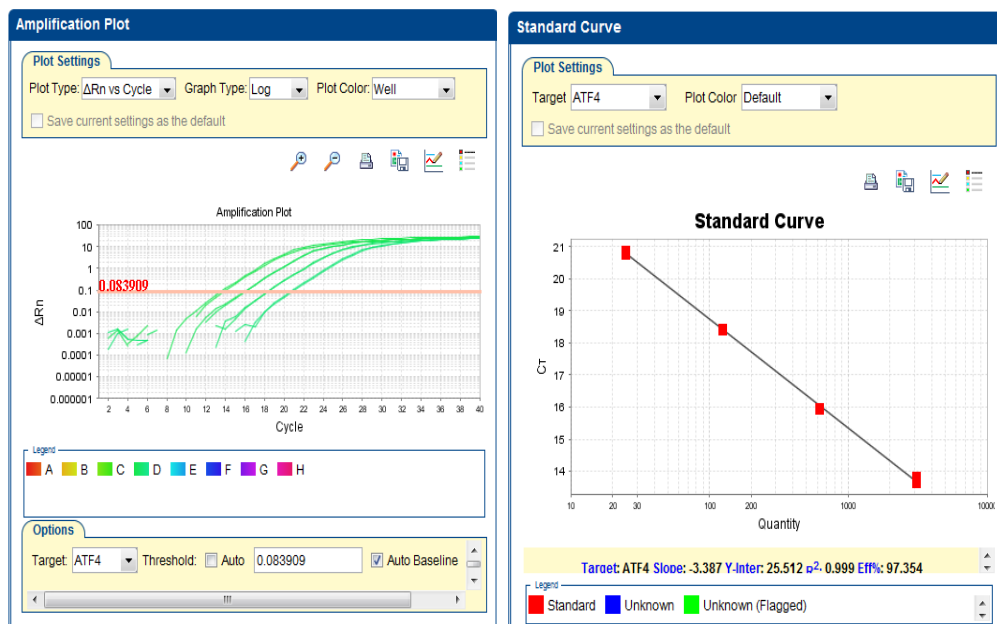


Figura 6 – Determinação da eficiência para ATF4. Em A, observa-se as quatro primeiras curvas da diluição seriada (as duas últimas diluições foram omitidas a fim de se obter um maior coeficiente de correlação, mas houve amplificação para todos os casos), com intervalos fixos e duplicatas confiáveis. Também é apresentado o valor do *threshold*, que foi utilizado em todas as análises com este *primer*. Em B, tem-se a curva padrão construída a partir dos pontos obtidos, e na porção inferior são apresentados os parâmetros considerados para analisar a eficiência deste gene. Figura obtida através do sistema *StepOne Software v2.2.2.*

Após o monitoramento óptico da fluorescência do produto de qPCR ciclo a ciclo para todas as amostras de cDNA (25 indivíduos por grupo), a média de Ct obtida para cada duplicata do respectivo gene foi utilizada para quantificação da expressão gênica, sendo aplicada na equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Após os devidos cálculos, os resultados para cada grupo de estudo foram utilizados como entrada para a construção dos gráficos. Os gráficos obtidos para cada gene estão apresentados na figura 7, em que “AA” refere-se ao grupo de indivíduos saudáveis (“AA” por apresentarem-se homocigotos para hemoglobina A nativa), “SS (Hu+)” ao grupo de anêmicos falciformes tratados com hidroxureia e “SS (Hu-)” ao grupo de falciformes não tratados (“SS” por apresentarem-se homocigotos para hemoglobina S portadora da mutação no códon 6 da beta globina). Como resultado, obtivemos diferença estatística significativa somente para o gene *MSN*, que mostrou-se mais expresso no grupo controle (AA).

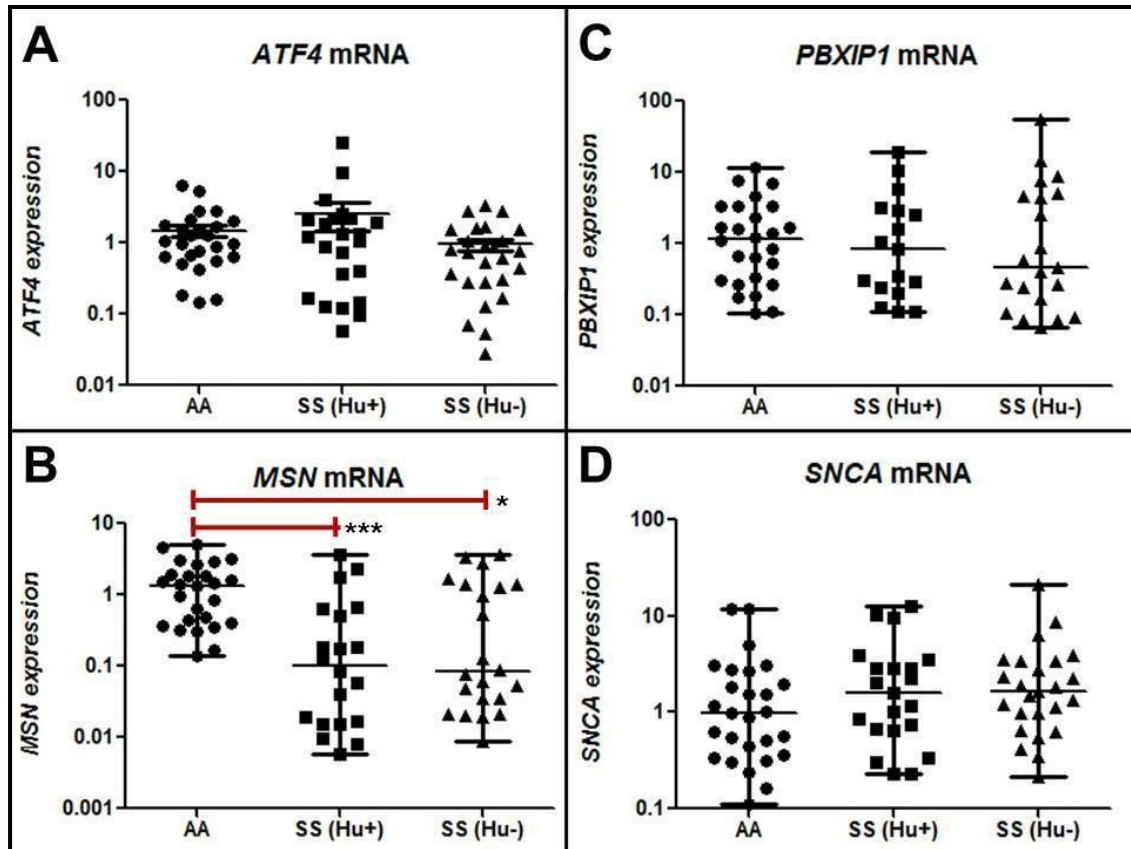


Figura 7 – Análise da expressão dos genes *ATF4*, *MSN*, *PBXIP1* e *SNCA* em reticulócitos de indivíduos saudáveis com anemia falciforme (com e sem hidroxiureia). (A) *ATF4* não apresentou diferença significativa entre os grupos. (B) Em relação ao grupo AA, a análise de *MSN* resultou em diferença significativa tanto para falciformes tratados quanto para não tratados. (C) O gene *PBXIP1* não apresentou diferença significativa entre nenhum dos grupos, apresentando *p-value* superior a 0,05. (D) Da mesma forma, não foi constatada diferença significativa para *SNCA*.

* $p=0,0128$

*** $p=0,0007$

Para o gene *ATF4*, esperávamos que o tratamento com hidroxiureia levasse a uma redução da expressão nos pacientes, porém, não obtivemos diferença estatística significativa na comparação entre nenhum dos grupos por qPCR. Dentre a variedade de funções do fator de transcrição codificado por este gene, tem-se a ativação da expressão de *ATF4* sob condição de estresse e hipóxia (CIBELLI, 1999; HARDING *et al.*, 2000), que é recorrente em indivíduos com anemia falciforme. Nossa hipótese era que o tratamento com hidroxiureia melhorasse as condições de oxigenação e amenizasse o estresse (também justificado pelo já estabelecido aumento de hemoglobina fetal), reduzindo assim a expressão de *ATF4* para um nível bem próximo ao de indivíduos saudáveis (AA). Ainda, já foi comprovado que a ativação de *ATF4* via *PERK* (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) resulta em um aumento de mRNAs que codificam proteínas importantes na resposta antioxidante e equilíbrio REDOX,

aumentando também a expressão de *CHOP* (*C/EBP-Homologous Protein*), proteína que induz a resposta apoptótica (OHOKA *et al.*, 2005).

Além disso, a relação de *ATF4* com a angiogênese já foi demonstrada, induzindo a expressão de fatores de crescimento durante o processo de espessamento da camada dos vasos sanguíneos (MASUOKA *et al.*, 2002; MALABANAN *et al.*, 2008). Nesse sentido, estudos recentes relataram que os níveis de mediadores angiogênicos são elevados em pacientes com anemia falciforme, o que pode estar associado a diferentes sintomas da doença. O desequilíbrio angiogênico acaba sendo, portanto, prejudicial. Por outro lado, já foi demonstrado que a HU exerce efeito anti-angiogênico, prevenindo a progressão da neovascularização desregulada e manifestações associadas à falcização dos eritrócitos, o que sugere uma justificativa para que os pacientes tratados com hidroxiureia apresentassem menor expressão de *ATF4* e, conseqüentemente, melhor quadro clínico (LOPES *et al.*, 2014; 2015).

Ainda, utilizando camundongos como modelo, Zhang *et al.* (2018) demonstraram que *ATF4* é necessário para promover a diferenciação eritroide e reduzir o estresse oxidativo em caso de anemia por deficiência de ferro, visto que a ativação de *ATF4* promove a indução de genes de resposta ao estresse. Sendo assim, apesar de não termos observado diferença estatística por qPCR, poderíamos obter resultados positivos ao avaliarmos o conteúdo dessa proteína por *Western Blot*, o que lamentavelmente não pôde ser comprovado devido ao grande atraso para entrega do anticorpo primário adequado para *ATF4*, que passou meses sob suspensão da ANVISA.

O gene *MSN* apresentou diferença estatística significativa entre controles e pacientes falciformes, tanto tratados quanto não tratados. Os resultados de qPCR sugerem que a expressão reduzida deste gene tem mais relação com a doença do que com o tratamento propriamente dito. A moesina faz parte da superfamília de proteínas ERM (ezrina, radixina e moesina), as quais participam de várias funções fisiológicas, com ênfase na morfologia, adesão e mobilidade celular (MADAN, 2008; WANG, 2012; MANITTI *et al.*, 2013). Se *MSN* é menos expresso, haverá menor mobilidade das células endoteliais e falhas no desacoplamento do complexo de adesão (VITORINO *et al.*, 2015), característica que condiz com o estado fisiológico dos pacientes falciformes, cuja vaso-oclusão é intensificada pelo aumento do processo de adesão celular. E por tratar-se de uma das proteínas mais importantes das células endoteliais, mudanças funcionais nesta podem ainda alterar o processo de angiogênese. Logo, ativar a expressão desse gene seria um alvo terapêutico interessante no tratamento da anemia falciforme.

Quanto ao gene *PBXIP1*, como apresentado na figura 7, não houve diferença significativa na expressão deste em nenhum dos grupos. Esses resultados sugerem que em reticulócitos a expressão deste gene não está regulada pelo tratamento com hidroxiureia, nestes pacientes. No entanto, Feng *et al.* (2015) demonstraram que a proteína PBXIP1 está envolvida na proliferação celular, adesão e migração, principalmente de células tumorais. Sabe-se ainda que, quando este gene é superexpresso em células K562, ocorre aumento da ativação da via PI3/AKT e a indução do crescimento e diferenciação das células hematopoiéticas (MANAVATHI *et al.*, 2012). Logo, apesar do embasamento literário e da hipótese primária de que a hidroxiureia ativaria a expressão de *PBXIP1*, limitando-se às informações obtidas sobre os transcritos de mRNA apenas, as diferentes funções desse gene aparentemente não são afetadas pela mutação pontual que leva à falcização das hemácias e nem pelo uso terapêutico de hidroxiureia. Porém, além da amplitude da barra de erro observada, é possível que o mRNA ainda sofra algum tipo de regulação pós-transcricional ou que tenha sido regulado em momentos anteriores da diferenciação dos eritrócitos, podendo haver maior ou menor conteúdo proteico na célula totalmente diferenciada (a hemácia) entre os grupos analisados neste estudo. Por isso foi realizado o *Western Blot*, cujos resultados descrevemos no item 6.2.

O gene *SNCA* também não apresentou diferença significativa em mRNA para os reticulócitos de nenhum dos grupos. Esse gene tem sido muito estudado devido a sua associação com a doença de Parkinson, mas Nakai *et al.* (2007) analisaram a expressão de *SNCA* na medula óssea, reticulócitos e eritrócitos e em estudo publicado em 2008, Scherzer e colaboradores constataram elevada expressão de *SNCA* em células normais do sangue durante as etapas finais da diferenciação eritroide. Esses dados corroboram com os nossos resultados, visto que *SNCA* mostrou-se consideravelmente mais expresso que o gene referência *ACTB* para todos os grupos analisados. Usando a mesma suposição sobre a regulação de *PBXIP1*, esse gene pode estar regulado em estágios anteriores e o conteúdo proteico pode estar alterado na hemácia. A discussão complementar para esse e os demais genes será apresentada juntamente com os resultados obtidos por *Western Blot*.

6.2. Western Blot

Além da etapa já descrita que envolveu a análise dos transcritos por qPCR, a quantificação proteica de cada gene alvo foi avaliada por *Western Blot*. Como resultado

confirmativo de nossa hipótese, para a proteína PBXIP1, com cerca de 81kDa, foi constatada diferença significativa entre pacientes com anemia falciforme não tratados (SS (Hu-)) e falciformes tratados com hidroxiureia (SS (Hu+)), bem como entre indivíduos saudáveis e anêmicos falciformes tratados com hidroxiureia (figura 8). Entre indivíduos saudáveis (AA) e falciformes não tratados, não foi identificada diferença significativa. É válido ressaltar que, para todas as análises, utilizou-se a proteína GAPDH (38kDa) como padronizador das amostras da proteína de interesse.

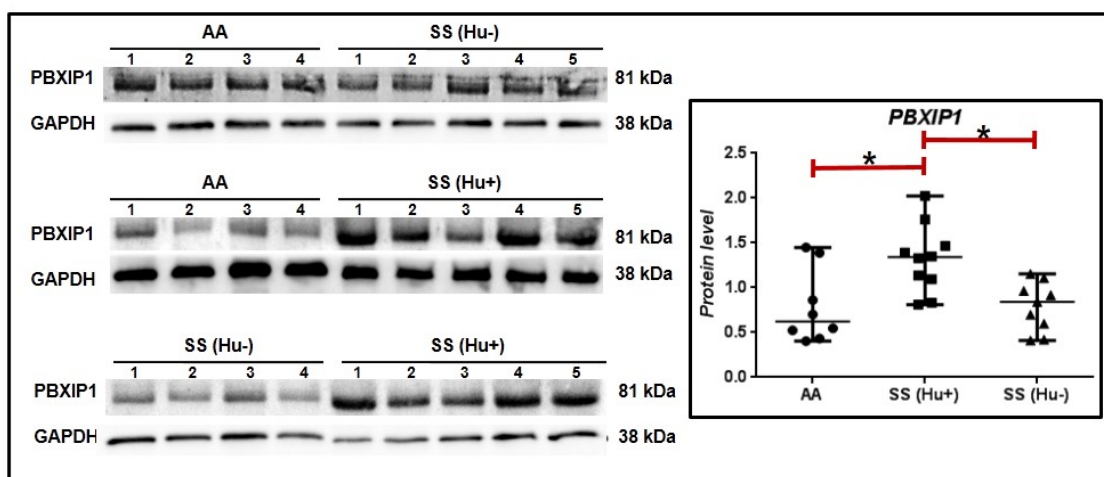


Figura 8 – Análise do conteúdo proteico de PBXIP1 por Western Blot. As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 15% (p/v), utilizando 50µg de proteína total de cada amostra. PBXIP1 apresenta em torno de 81kDa, enquanto que a proteína referência GAPDH possui cerca de 38kDa. À esquerda são apresentados os padrões de banda obtidos para cada uma das três situações analisadas (grupo controle (AA) comparado com o grupo de falciformes não tratados (SS Hu-); AA comparado a falciformes tratados com hidroxiureia (SS Hu+); e SS Hu-comparado à SS Hu+). À direita, tem-se o gráfico que torna evidente a diferença na análise densitométrica entre os grupos, sendo significativa quando tanto AA ($p=0,0437$) quanto SS Hu- ($p=0,0434$) são comparados à SS Hu+. Figura adaptada com *plots* tratados pelo *software ImageLab*.

Apesar de não terem sido constatadas estatísticas significativas para este gene por qPCR, os resultados obtidos através da técnica de *Western Blot* evidenciam que a diferença no conteúdo de PBXIP1 tem relação com o tratamento com hidroxiureia, e não diretamente com a doença, visto que o uso deste medicamento aumenta o conteúdo desta proteína até mesmo em relação a indivíduos saudáveis e não há variação considerável entre indivíduos saudáveis e falciformes não tratados. Em estudo recente, Ji *et al.* (2018) observaram - utilizando camundongos com *knockout* específico para condrócitos - que PBXIP1 é essencial para o desenvolvimento da osteoartrite, sendo que a deficiência de PBXIP1 nos camundongos os protegia contra a degeneração da cartilagem. Logo, assim como em vários tipos de câncer e modelos celulares, PBXIP1 promove a proliferação celular nos condrócitos. E como já mencionado, a expressão de PBXIP1 está fortemente envolvida na indução de crescimento e diferenciação também de células hematopoiéticas (MANAVATHI *et al.*, 2012). Tal característica é de grande relevância quando se trata da utilização de hidroxiureia, visto que a melhora do quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme que recebem este tratamento pode estar relacionada, além do já conhecido

aumento de hemoglobina fetal, à indução da produção de células da linhagem eritroide, amenizando assim o efeito da redução do tempo de vida das hemácias em decorrência do processo de falcização.

Já para a proteína SNCA, de cerca de 17kDa, foi constatada diferença significativa entre os grupos de falciformes não tratados e tratados com hidroxureia e também entre indivíduos saudáveis e falciformes tratados (figura 9). Devido ao pequeno tamanho molecular de SNCA, inicialmente houve grande dificuldade para que esta proteína pudesse ser identificada, visto que as sucessivas lavagens culminavam no deslocamento dessa proteína da membrana. Porém, Lee *et al.* (2011) sugeriram a adição de paraformaldeído (PFA) para fixar pequenas proteínas na membrana, cuja técnica mostrou-se bem sucedida. Deste modo, também optamos por incubar as membranas de SNCA em PFA, seguindo a metodologia proposta por Lee.

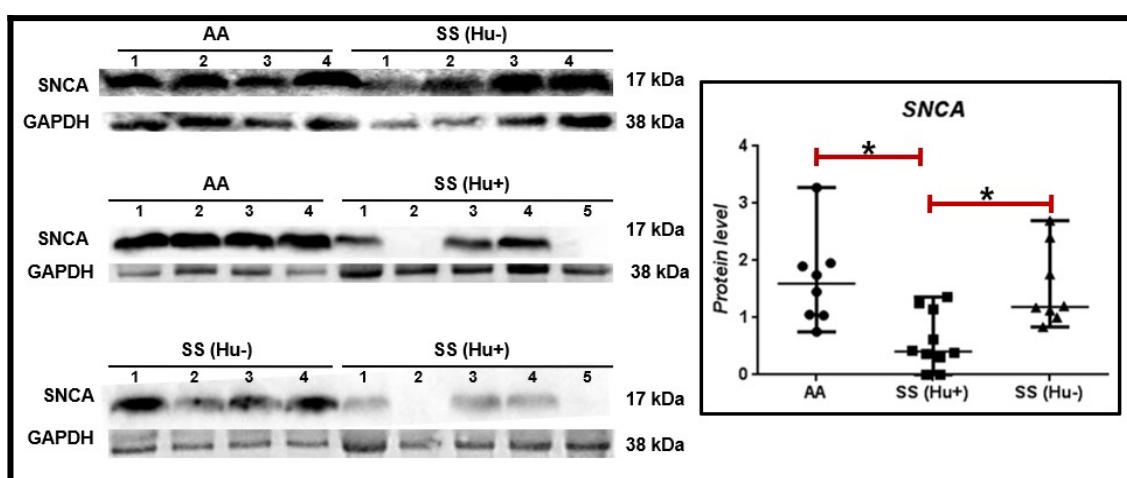


Figura 9 – Análise do conteúdo proteico de SNCA por Western Blot. As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 15% (p/v), utilizando 50µg de proteína total de cada amostra. SNCA apresenta em torno de 17kDa, enquanto que a proteína referência GAPDH possui cerca de 38kDa. À esquerda são apresentados os padrões de banda obtidos para cada uma das três situações analisadas (grupo controle (AA) comparado com o grupo de falciformes não tratados (SS Hu-); AA comparado a falciformes tratados com hidroxureia (SS Hu+); e SS Hu-comparado à SS Hu+). À direita, tem-se o gráfico que torna evidente a diferença na análise densitométrica entre os grupos, sendo significativa quando tanto AA ($p=0,0187$) quanto SS Hu- ($p=0,0417$) são comparados à SS Hu+. Figura adaptada com *plots* tratados pelo *software ImageLab*.

Na figura 7, observa-se o aumento do volume das bandas em pacientes não tratados com hidroxureia (SS (Hu-)) em relação aos tratados (SS (Hu+)), podendo-se notar que o conteúdo de SNCA em indivíduos tratados é baixo e não pôde ser detectado em duas das dez amostras do grupo (2 e 5). Através da análise do gráfico, é evidente a relevância da diferença estatística entre os grupos ($p=0,0187$), que foi acentuada pela ausência de proteína em dois dos tratados, como já mencionado. O resultado da comparação proteica de SNCA entre indivíduos saudáveis e falciformes tratados com hidroxureia obteve um padrão muito similar ao anterior, observando-se novamente um aumento da proteína de interesse em pacientes tratados ($p=0,0417$). Assim,

sugere-se que o tratamento com hidroxiureia tenha relação direta com a redução da tradução de α -sinucleína, a ponto de esta não ser detectada em alguns pacientes que receberam o tratamento.

Em 2018, um estudo de metanálise de expressão gênica foi publicado a partir de cinco conjuntos de dados de microarranjos independentes disponíveis publicamente relacionados a portadores de anemia falciforme a fim de identificar um perfil transcriptômico consenso. SNCA estava entre os genes que se destacaram como diferencialmente expressos, tendo sua transcrição induzida pela doença. Porém, o efeito do tratamento com hidroxiureia não foi levado em consideração nesse estudo (HAMDA *et al.*, 2018).

A SNCA humana produz importante resposta inflamatória tanto *in vitro* quanto *in vivo*, levando à ativação de macrófagos por citocinas pró-inflamatórias (COUCH *et al.*, 2011), e sugere-se que a mesma relação com o processo inflamatório possa ser válida para a SNCA eritrocitária. Deste modo, a aparente redução do conteúdo proteico de SNCA observada até então em nosso estudo para os pacientes tratados poderia ser um importante mecanismo de ação da hidroxiureia, que culminaria na redução da inflamação tão recorrente nos pacientes falciformes, amenizando parte dos sintomas e complicações.

Outra justificativa plausível está vinculada à co-expressão de SNCA com proteínas críticas para o metabolismo do grupo heme (SCHERZER *et al.*, 2008). Conforme descrito por Kokouraki (2016), a tradução de SNCA é induzida por acúmulo de ferro e estresse oxidativo. Supondo que a hidroxiureia amenize tais condições críticas no interior das células falciformes, a expressão de SNCA seria conseqüentemente reduzida em indivíduos tratados. Ainda, devido à já estabelecida indução do nível de hemoglobina fetal por hidroxiureia, as condições intracelulares dos eritrócitos de pacientes falciformes são benéficamente modificadas com o tratamento, reduzindo os estímulos apoptóticos e, conseqüentemente, a necessidade da tradução de SNCA como mecanismo de defesa antiapoptótico (COSTA *et al.*, 2002).

Quanto à proteína moesina, de cerca de 78kDa, a quantificação proteica não resultou em diferença estatística entre nenhum dos grupos (Figura 10). Esses resultados diferem dos que foram visualizados para os transcritos por qPCR (Figura 6), que apresentaram diferença estatística na comparação entre indivíduos saudáveis e falciformes independentemente do tratamento com hidroxiureia.

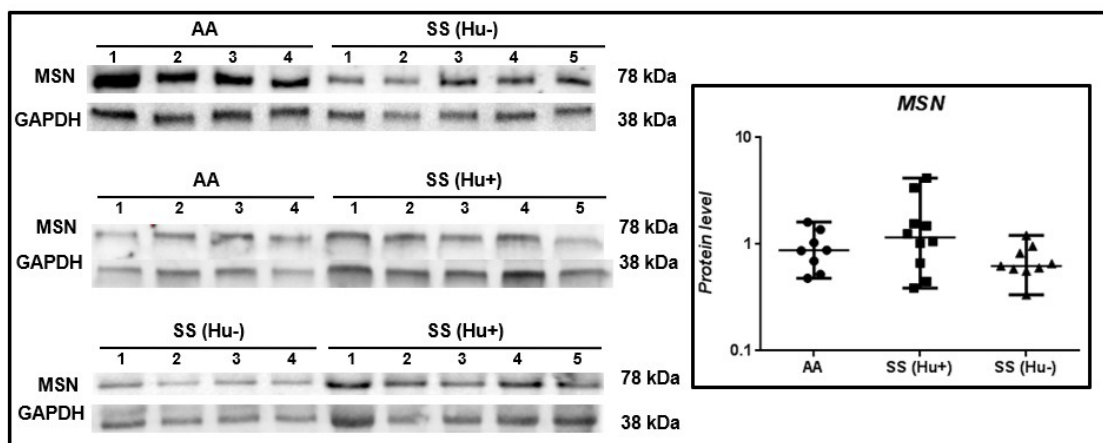


Figura 10 – Análise do conteúdo proteico de MSN por Western Blot. As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 15% (p/v), utilizando 50µg de proteína total de cada amostra. MSN apresenta em torno de 78kDa, enquanto que a proteína referência GAPDH possui cerca de 38kDa. À esquerda são apresentados os padrões de banda obtidos para cada uma das três situações analisadas (grupo controle (AA) comparado com o grupo de falciformes não tratados (SS Hu-); AA comparado a falciformes tratados com hidroxureia (SS Hu+); e SS Hu-comparado à SS Hu+). À direita, tem-se o gráfico que mostra que não houve diferença significativa na análise densitométrica entre os grupos, com $p\text{-value} > 0,05$ entre todas as situações comparadas. Figura adaptada com *plots* tratados pelo software *ImageLab*.

As proteínas ERM têm sido estudadas principalmente por controlarem a mobilidade celular, bem como a regulação da adesão célula-célula. No entanto, o papel dessas proteínas na regulação das vias de transdução de sinal é pouco compreendido. Recentemente, um grupo de pesquisa norte americano realizou novas observações que fornecem um avanço significativo para o entendimento da função das proteínas ERM no controle de várias vias de transdução de sinal, constatando, por exemplo, que a modulação de moesina é um potencial alvo terapêutico para distúrbios imunológicos relacionados a linfócitos T reguladores, sendo a tradução de MSN regulada por TGF- β (ANSA-ADOO *et al.*, 2017).

Como já explicitado na discussão referente à qPCR, a moesina, membro da superfamília de proteínas ERM, participa de diversas funções fisiológicas, sendo de grande importância para o adequado desacoplamento do complexo de adesão *MAP4K4-moesin-talin-beta-1-integrina* (VITORINO *et al.*, 2015). Logo, quando MSN é menos expresso (SS), haverá menor mobilidade das células endoteliais e ocorrerão falhas no desacoplamento do complexo de adesão. Além disso, a moesina é uma das proteínas mais importantes das células endoteliais, estando diretamente envolvida na angiogênese. Tais argumentos concordam com a análise dos transcritos mas sugerimos que regulações pós-transcricionais possam ser a principal causa para a incompatibilidade com os resultados de *Western Blot*. Não podemos descartar também a

possibilidade de que as diferenças de conteúdo proteico passassem a ser significativas se adotássemos uma amostragem maior.

6.3. Cultura de Células K562

Os experimentos que envolvem a cultura de células K562 foram realizados mas até o momento não foi possível fazer replicatas dos mesmos, o que inviabilizou as análises estatísticas. É válido ressaltar que já foi demonstrado que o aumento de espécies reativas de oxigênio é característico da anemia falciforme (ROMANELLO, 2018). Logo, através da adição de peróxido de hidrogênio, tínhamos a intenção de simular estes efeitos na linhagem K562, avaliando a expressão dos genes de interesse em condições mais próximas das células falciformes.

Para simplificar a apresentação dos resultados, abreviamos por “CT” a cultura de K562 que não teve adição de hemina ou hidroxiureia em nenhum dos dias de cultivo; “HE” para o cultivo feito com adição de somente hemina ao meio de cultura desde o dia inicial (D0); “HE+HU” refere-se à adição de hemina e hidroxiureia desde o dia 0; “HU” à adição exclusivamente de hidroxiureia a partir de D0; por fim, “*HE+HU” diz respeito ao cultivo em que também foi adicionado hemina no dia 0 mas hidroxiureia só foi adicionada no dia 2 a fim de avaliar o efeito do medicamento nos dias 3 e 4, com as células em um estágio mais avançado na linhagem eritroide devido à alta produção de hemoglobina.

A figura 11 mostra os resultados obtidos por qPCR para o gene *MSN* na ausência e na presença de agente oxidante (H_2O_2), apresentando o conteúdo transcrito relativo a *ACTB* para todos os tratamentos em cada dia.

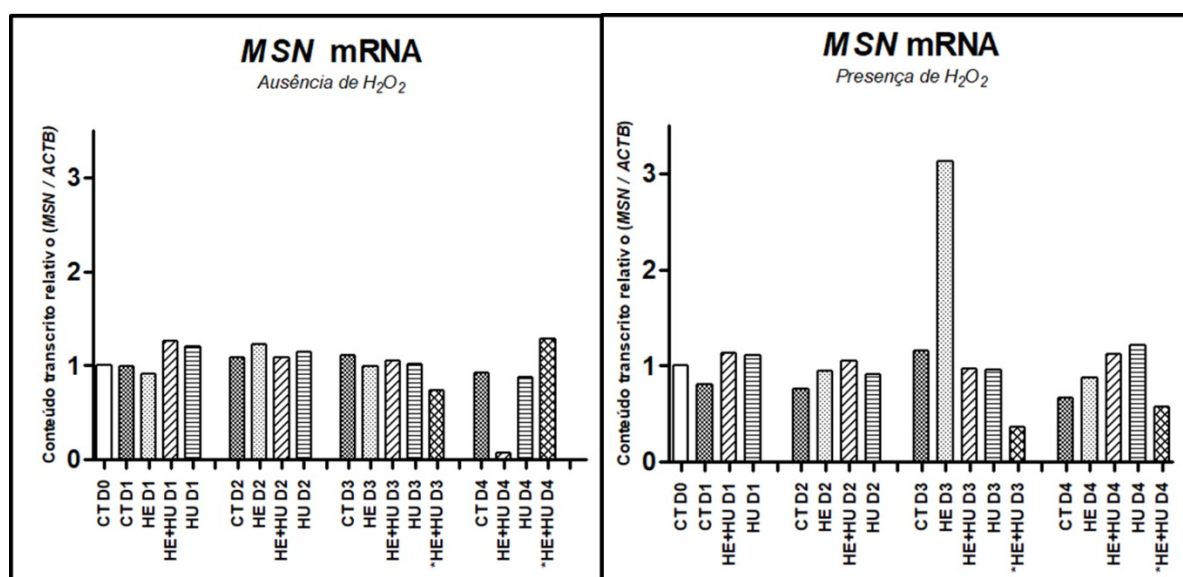


Figura 11. Resultado das análises de qPCR para o gene *MSN* em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo. À esquerda, têm-se os dados obtidos para os tratamentos sem a adição de H_2O_2 em nenhum dos dias. “CT” é representativo da cultura sem adição de hemina ou hidroxireia; “HE” refere-se ao tratamento somente com hemina desde o dia 0 (D0); “HE + HU” faz referência ao cultivo na presença tanto de hemina quanto de hidroxireia desde o início; “HU” corresponde ao tratamento exclusivo com hidroxireia; “*HE+HU” refere-se ao cultivo em que foi adicionado hemina no início do experimento e hidroxireia somente no dia 2, com resultados para D3 e D4. À direita, tem-se a representação dos resultados obtidos com a adição diária de H_2O_2 , sendo válidas as mesmas abreviações de tratamento supramencionadas.

Nota-se que não consta nos gráficos o resultado para “HE” no dia 4 na ausência de H_2O_2 e o mesmo acontece para “HE” no dia 1 na presença de H_2O_2 . Isso porque não foi possível obter uma boa duplicata de amplificação para tais amostras com nenhum dos pares de *primers* para os genes de interesse. Como a concentração desses transcritos estava muito baixa, nós tentamos refazer a transcrição reversa de tais amostras mas mesmo assim não obtivemos sucesso, portanto optamos por fazer a exclusão de ambas.

Para *MSN*, no que diz respeito à ausência de peróxido de hidrogênio (gráfico à esquerda da figura 11), podemos observar que os valores entre todos os tratamentos apresentam pouca variação até o dia 3. Por outro lado, do dia 3 para o dia 4, nota-se duas variações relevantes: uma queda abrupta nos transcritos do tratamento “HE+HU” e uma considerável crescente para “*HE+HU”. Por não haver uma duplicata, torna-se difícil esclarecer se tais alterações foram características pontuais do experimento ou até mesmo um erro na amostragem ou se estas se devem de fato ao efeito do respectivo tratamento. Nós sugerimos que, no caso de “HE+HU”, provavelmente trata-se de uma variante pontual do experimento em função do padrão gradualmente decrescente que se observa entre os dias 1 a 3, antes da grande redução de D3 para D4. Já para “*HE+HU”, nós acreditamos que a adição de hidroxireia à cultura somente no dia 2 esteja ligada diretamente à maior ativação da expressão de *MSN* quando a célula já está em um avançado estágio de diferenciação, o que condiz com a nossa hipótese inicial de que a hidroxireia induz a expressão de *MSN* e ameniza a adesão celular.

Já ao analisarmos o gráfico à direita da figura 11, podemos observar o padrão de expressão na presença de H_2O_2 . Com exceção de “HE”, que se sobressai no dia 3, os demais tratamentos apresentam pouca oscilação entre os quatro dias, além de mais uma vez observarmos a crescente de D3 para D4 para o tratamento “*HE+HU”. No caso específico de “HE” no dia 3, nós acreditamos que se trata também de uma variante pontual porque esperava-se observar um padrão entre os dias 2 e 4, que apresentam valores muito próximos.

Com relação a uma comparação geral entre os gráficos a fim de avaliar o efeito de H_2O_2 , até onde se sabe, a expressão de *MSN* não é diretamente influenciada pelo estresse oxidativo, o que justifica o padrão similar que é observado entre os dois gráficos da figura 8.

A figura 12 representa o conteúdo transcrito relativo para o gene *PBXIP1*. No gráfico à esquerda, que diz respeito aos dados obtidos na ausência de H_2O_2 , podemos observar diferentes oscilações entre os tratamentos. Em comum, temos que a quantificação de transcritos de quase todos os tratamentos é reduzida consideravelmente do dia 3 para o dia 4, com exceção de “*HE+HU”, em que mais uma vez observamos um aumento ao ser adicionado hidroxiiureia em um estágio mais avançado de diferenciação (D2). Tem-se também destaque para o tratamento “HU”, que apresenta um grande pico no dia 1, seguido de considerável regressão até o dia 4. Cabe-se observar que este pico não é observado no gráfico da presença de peróxido, sugerindo que o estresse oxidativo de alguma forma possa estar interferindo na indução de *PBXIP1* por hidroxiiureia.

Sabe-se que, após a adição do indutor de diferenciação eritroide, o pico de produção das globinas ocorre entre os dias 2 e 3, padrão que foi seguido por *PBXIP1* para a cultura controle e para os cultivos que incluíam hemina em seu tratamento. Como *PBXIP1* age diretamente na proliferação e diferenciação eritroide, era de fato esperado que o aumento das globinas e consequentemente do grau de diferenciação fosse acompanhado pelo aumento da expressão de *PBXIP1*.

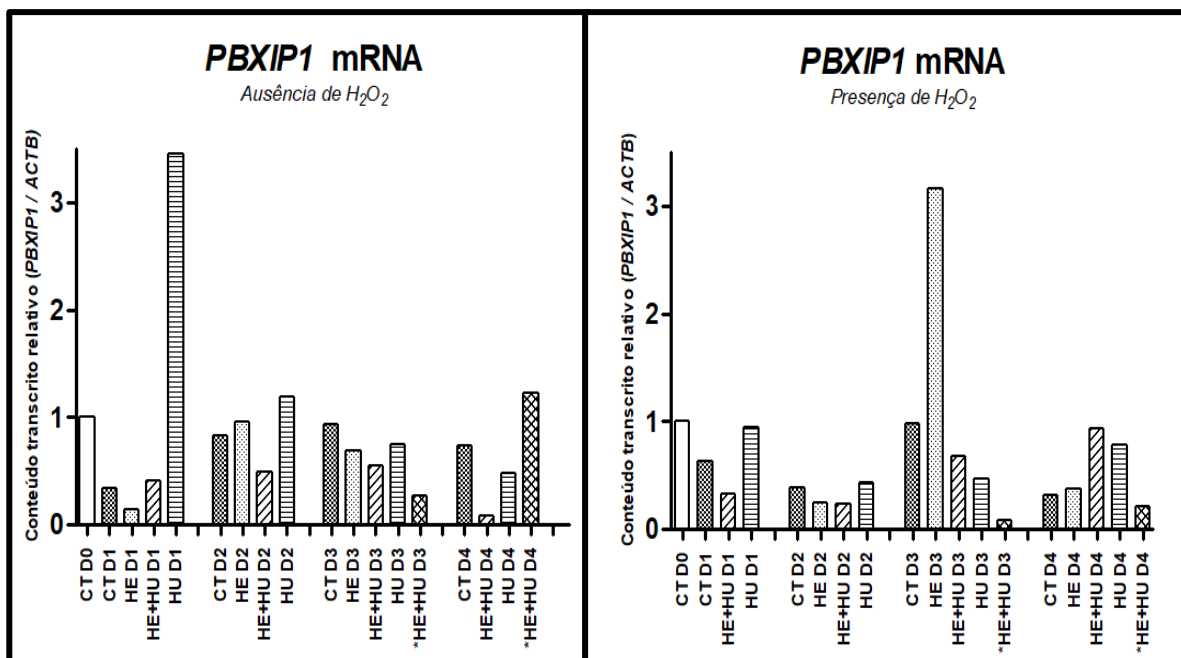


Figura 12. Resultado das análises de qPCR para o gene *PBXIP1* em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo. À esquerda, têm-se os dados obtidos para os tratamentos sem a adição de H₂O₂ em nenhum dos dias. “CT” é representativo da cultura sem adição de hemina ou hidroxureia; “HE” refere-se ao tratamento somente com hemina desde o dia 0 (D0); “HE + HU” faz referência ao cultivo na presença tanto de hemina quanto de hidroxureia desde o início; “HU” corresponde ao tratamento exclusivo com hidroxureia; “*HE+HU” refere-se ao cultivo em que foi adicionado hemina no início do experimento e hidroxureia somente no dia 2, com resultados para D3 e D4. À direita, tem-se a representação dos resultados obtidos com a adição diária de H₂O₂, sendo válidas as mesmas abreviações de tratamento supramencionadas.

No que diz respeito à presença de peróxido de hidrogênio no cultivo, os menores valores correspondem ao dia 2. Não conseguimos identificar um padrão entre os tratamentos mas destaca-se a quantificação de “HE” no dia 3. Se o contraste não fosse tão grande, sugeriríamos que tamanha expressão está ligada a maior indução da diferenciação pela hemina e ao alto conteúdo de hemoglobina no dia 3, porém, a queda abrupta que ocorre no dia 4 indica que é mais provável que se trate de algum erro ou variante experimental.

Ao compararmos os dois gráficos da figura 12, podemos observar que a adição de H₂O₂ leva a uma redução da expressão de *PBXIP1* para todos os tratamentos nos dois primeiros dias. Na sequência, possivelmente por já estarem melhor adaptadas ao estresse, as células aumentam a velocidade de crescimento nos dias 3 e 4, bem como a expressão de *PBXIP1*.

A figura 13 apresenta os resultados transcricionais obtidos para o gene *ATF4*. Com exceção de “HU D1” e “HE+HU D4”, há pouca variação entre os dias e também entre os tratamentos tanto na ausência quanto na presença de peróxido. Desta forma, para esse gene, não foi possível estabelecer uma associação com o tratamento com hidroxureia, mas é possível notar que a presença de H₂O₂ levou a um aumento do conteúdo transcrito para a maior parte das situações analisadas, o que corrobora com a literatura no que diz respeito à indução da expressão de *ATF4* por estresse oxidativo.

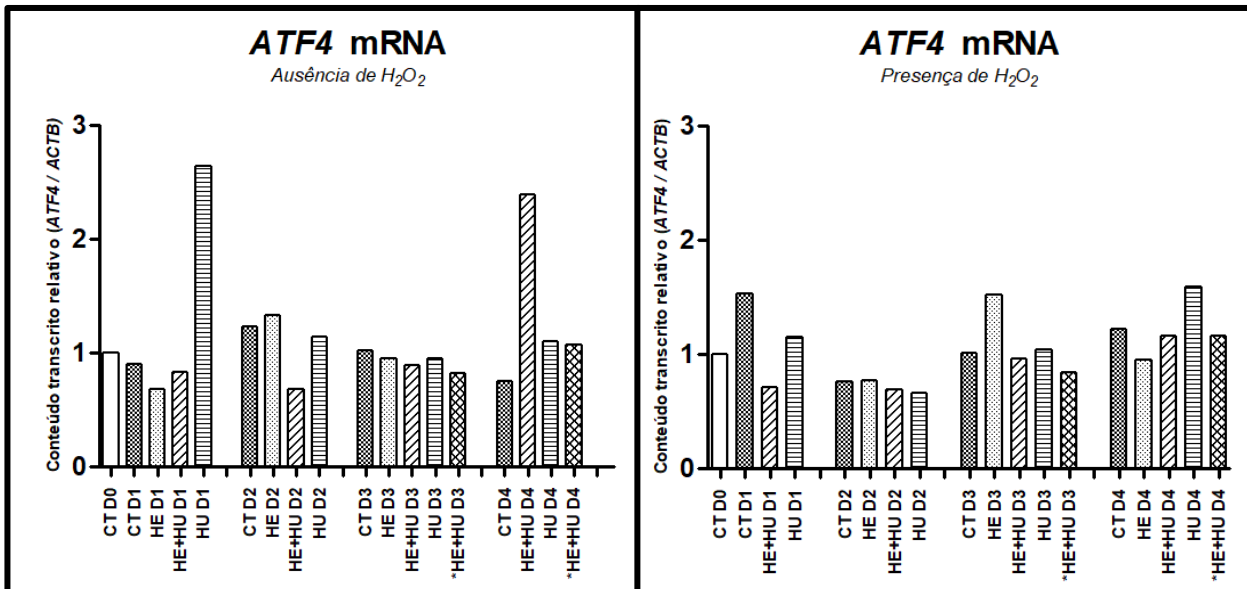


Figura 13. Resultado das análises de qPCR para o gene *ATF4* em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo. À esquerda, têm-se os dados obtidos para os tratamentos sem a adição de H₂O₂ em nenhum dos dias. “CT” é representativo da cultura sem adição de hemina ou hidroxiureia; “HE” refere-se ao tratamento somente com hemina desde o dia 0 (D0); “HE + HU” faz referência ao cultivo na presença tanto de hemina quanto de hidroxiureia desde o início; “HU” corresponde ao tratamento exclusivo com hidroxiureia; “*HE+HU” refere-se ao cultivo em que foi adicionado hemina no início do experimento e hidroxiureia somente no dia 2, com resultados para D3 e D4. À direita, tem-se a representação dos resultados obtidos com a adição diária de H₂O₂, sendo válidas as mesmas abreviações de tratamento supramencionadas.

Já para *SNCA*, a figura 14 nos mostra o mesmo padrão para os dias 1, 2 e 3 em ambos os gráficos, com redução da expressão gênica em todos os tratamentos no dia 1 em decorrência da presença de H₂O₂. Pela nossa hipótese inicial, esperávamos que a adição de HU levasse à redução da expressão de *SNCA*. Apesar de não observarmos esse resultado ao avaliarmos a cultura “HU” - na qual adicionou-se hidroxiureia desde o início do cultivo -, essa redução é vista ao analisarmos “*HE+HU”, principalmente na ausência de H₂O₂. É importante salientar também que o gene *SNCA* mostrou-se pouco expresso em K562, a ponto de não ser possível fazer a detecção da proteína por *Western Blotting* em inúmeras tentativas mesmo ao utilizar a concentração máxima de conteúdo proteico.

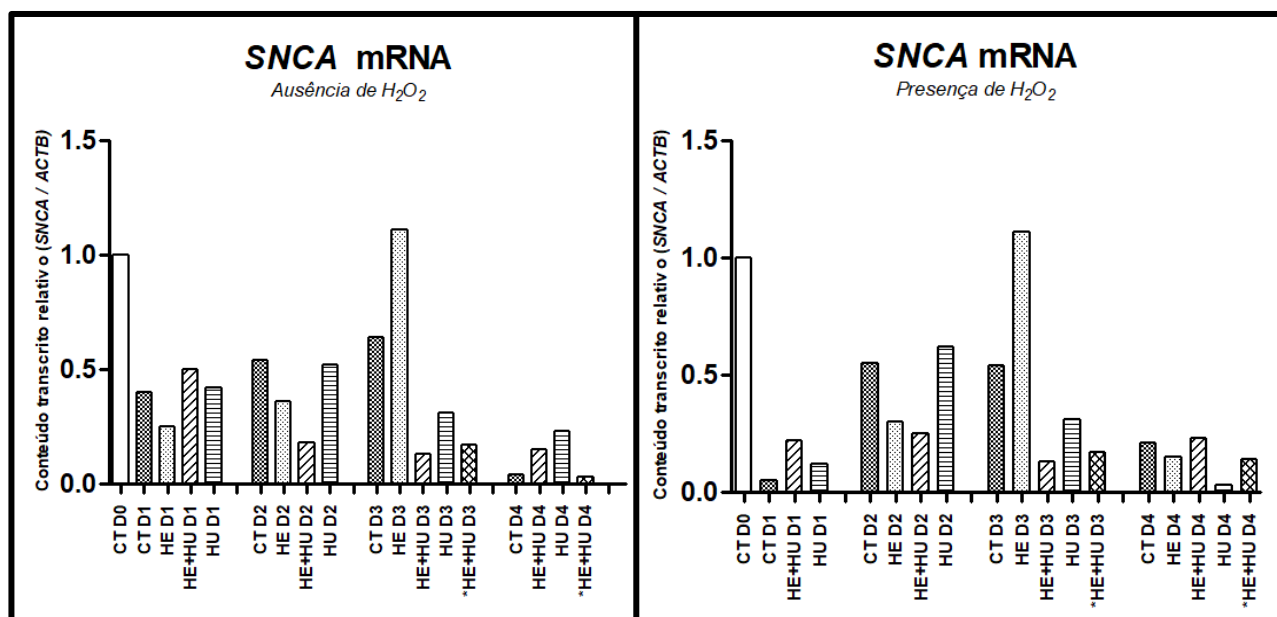


Figura 14. Resultado das análises de qPCR para o gene SNCA em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo. À esquerda, têm-se os dados obtidos para os tratamentos sem a adição de H_2O_2 em nenhum dos dias. “CT” é representativo da cultura sem adição de hemina ou hidroxiureia; “HE” refere-se ao tratamento somente com hemina desde o dia 0 (D0); “HE + HU” faz referência ao cultivo na presença tanto de hemina quanto de hidroxiureia desde o início; “HU” corresponde ao tratamento exclusivo com hidroxiureia; “*HE+HU” refere-se ao cultivo em que foi adicionado hemina no início do experimento e hidroxiureia somente no dia 2, com resultados para D3 e D4. À direita, tem-se a representação dos resultados obtidos com a adição diária de H_2O_2 , sendo válidas as mesmas abreviações de tratamento supramencionadas.

No que diz respeito às análises de conteúdo proteico, foi possível fazer a quantificação de todas as amostras coletadas para P-MSN e PBXIP1 (figuras 15 e 16, respectivamente). Já para ATF4, devido ao volume limitado de algumas amostras, só foi possível avaliar entre os dias 1 e 3 (figura 17). Como mencionado, SNCA não pôde ser visualizado mesmo após realizarmos diferentes testes devido à baixa concentração dessa proteína na linhagem K562.

Mais especificamente, na figura 15 nós podemos observar que quase não houve variações entre os dias de cultivo ou entre os diferentes tratamentos, como mostram tanto os gráficos quanto o padrão de bandas. É válido salientar que o anticorpo para MSN fosforilada foi utilizado em todo o experimento, visto que a ativação da função de desacoplador do complexo de adesão depende da fosforilação de um resíduo de tirosina na proteína. Comparando o efeito do peróxido de hidrogênio, observa-se um aumento da quantificação de P-MSN na presença de H_2O_2 , com destaque para “CT” e “HU”. Ao compararmos os gráficos das figuras 10 e 15, observamos um padrão muito similar entre o conteúdo transcrito e traduzido para P-MSN.

Na figura 16, podemos observar o peróxido de hidrogênio induzindo a expressão de PBXIP1. Apesar de os gráficos serem similares, vê-se mais proteína na presença de H₂O₂, principalmente no dia 4. Ademais, nota-se pouca oscilação na quantificação entre os diferentes tratamentos de um mesmo dia, o que sugere que provavelmente a indução da diferenciação e o tratamento com HU não levam a uma expressão diferencial de PBXIP1 na linhagem K562, mas a reação das células ao aumento do estresse oxidativo pode estar levando à ativação de PBXIP1.

Para a proteína ATF4 (figura 17), mais uma vez a presença de peróxido aparenta induzir a tradução, levando a variações na quantificação que podem ser vistas no gráfico referente à adição de H₂O₂, enquanto que na ausência de peróxido há um padrão muito semelhante para os diferentes tratamentos em cada dia de cultivo.

Diante da apresentação dos resultados, a limitação de nossos dados para a cultura de células K562 acaba por causar prejuízos para uma discussão aprofundada dos resultados obtidos, visto que, como já mencionado, não se sabe até que ponto as discrepâncias e padrões observados tratam-se de uma quantificação real ou de características pontuais ou até mesmo erro experimental. Porém, foi possível observar que a adição de peróxido de hidrogênio e o consequente aumento do estresse oxidativo acaba por alterar o padrão de expressão natural da célula, induzindo ou reprimindo a expressão de determinados genes possivelmente como um mecanismo de defesa.

Acreditamos que a realização de replicatas experimentais levará a resultados mais conclusivos, assim como metodologias mais direcionadas à função das proteínas de interesse. Como exemplo, propomos o monitoramento da adesão celular mediante a inibição ou superexpressão de *MSN*, gene que mostrou-se promissor em nossa pesquisa e cuja função está muito associada com a vasclusão dos pacientes com anemia falciforme.

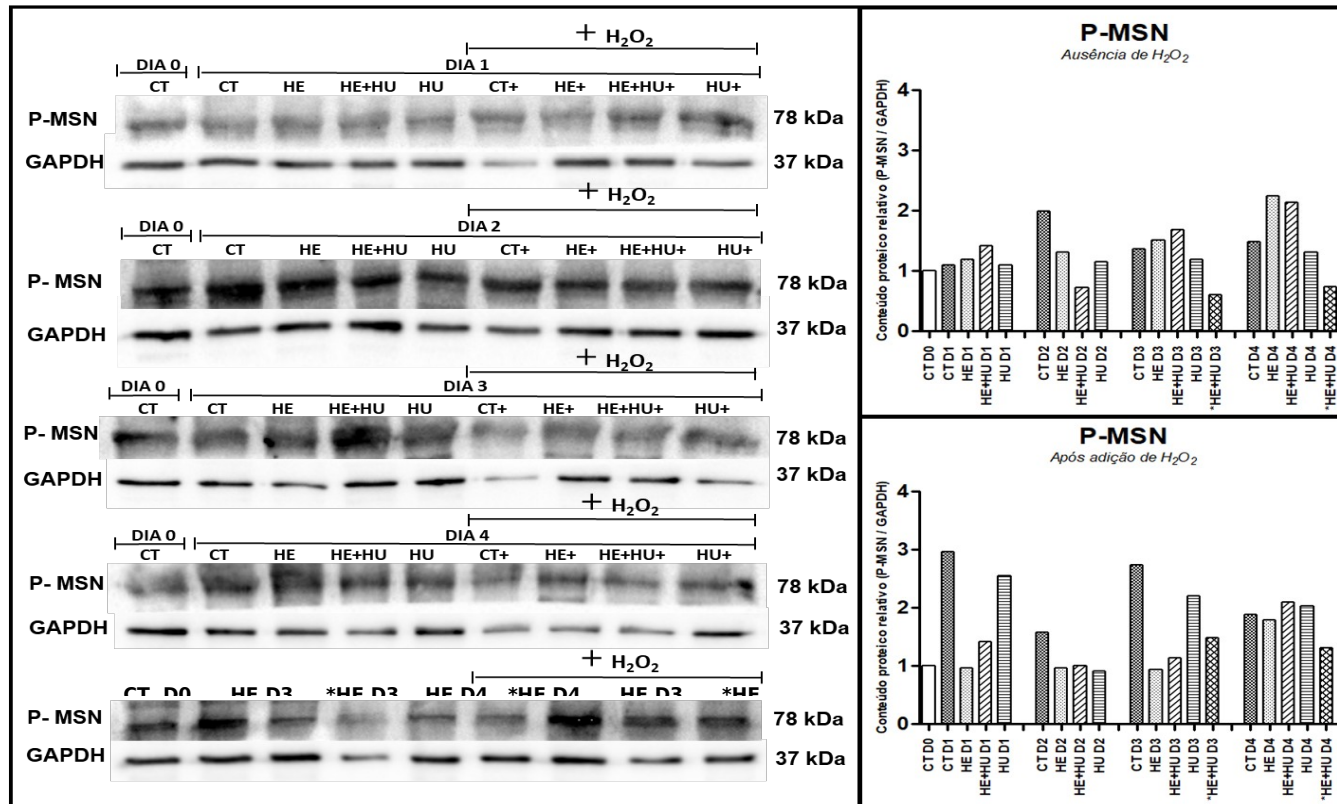


Figura 15. Resultado das análises do conteúdo proteico de P-MSN em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo. As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 15% (p/v), utilizando 50µg de proteína total de cada amostra. P-MSN apresenta em torno de 78kDa, enquanto que a proteína referência GAPDH possui cerca de 38kDa. À esquerda são apresentados os padrões de banda obtidos para cada um dos dias de coleta. “CT” é representativo da cultura sem adição de hemina ou hidroxiureia; “HE” refere-se ao tratamento somente com hemina desde o dia 0 (D0); “HE + HU” faz referência ao cultivo na presença tanto de hemina quanto de hidroxiureia desde o início; “HU” corresponde ao tratamento exclusivo com hidroxiureia; “*HE+HU” refere-se ao cultivo em que foi adicionado hemina no início do experimento e hidroxiureia somente no dia 2, com resultados para D3 e D4. À direita, tem-se os gráficos que mostram a quantificação proteica relativa na ausência e presença de H₂O₂, obtida por análise densitométrica. Figura adaptada com *plots* tratados pelo *software ImageLab*.

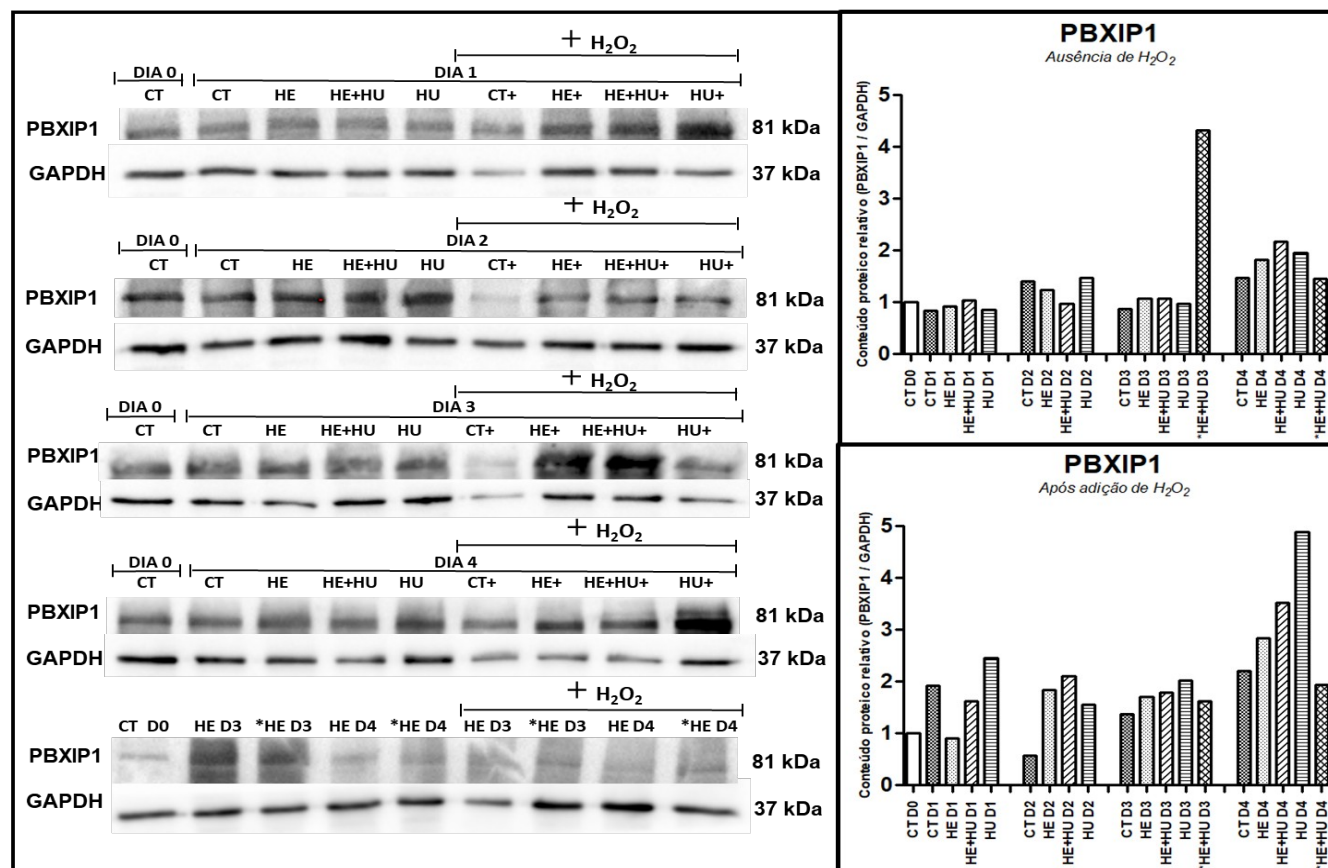


Figura 16. Resultado das análises do conteúdo proteico de PBXIP1 em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo. As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 15% (p/v), utilizando 50µg de proteína total de cada amostra. PBXIP1 apresenta em torno de 81kDa, enquanto que a proteína referência GAPDH possui cerca de 38kDa. À esquerda são apresentados os padrões de banda obtidos para cada um dos dias de coleta. “CT” é representativo da cultura sem adição de hemina ou hidroxiureia; “HE” refere-se ao tratamento somente com hemina desde o dia 0 (D0); “HE + HU” faz referência ao cultivo na presença tanto de hemina quanto de hidroxiureia desde o início; “HU” corresponde ao tratamento exclusivo com hidroxiureia; “*HE+HU” refere-se ao cultivo em que foi adicionado hemina no início do experimento e hidroxiureia somente no dia 2, com resultados para D3 e D4. À direita, tem-se os gráficos que mostram a quantificação proteica relativa na ausência e presença de H₂O₂, obtida por análise densitométrica. Figura adaptada com *plots* tratados pelo *software ImageLab*.

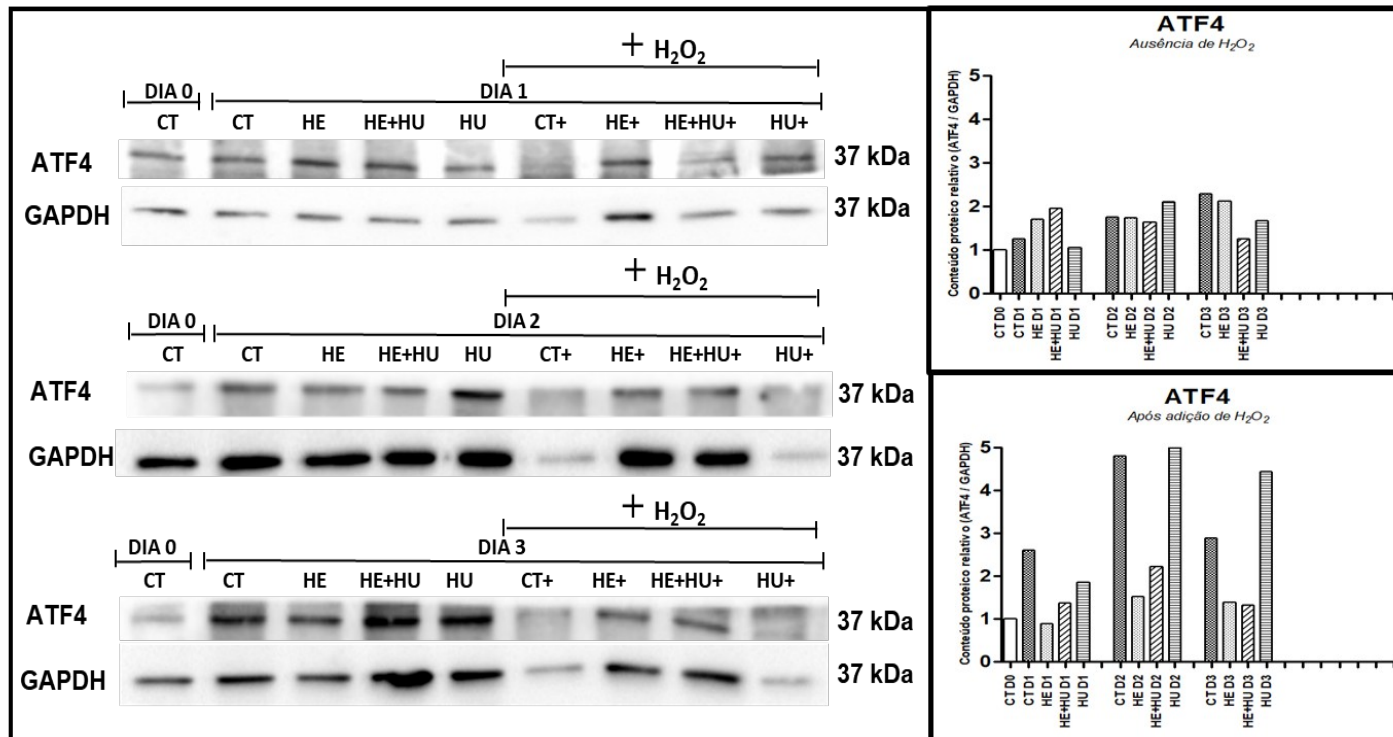


Figura 17. Resultado das análises do conteúdo proteico de ATF4 em K562 na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio no cultivo. As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 15% (p/v), utilizando 50µg de proteína total de cada amostra. ATF4 apresenta em torno de 37kDa, enquanto que a proteína referência GAPDH possui cerca de 38kDa. À esquerda são apresentados os padrões de banda obtidos para cada um dos dias de coleta. “CT” é representativo da cultura sem adição de hemina ou hidroxiureia; “HE” refere-se ao tratamento somente com hemina desde o dia 0 (D0); “HE + HU” faz referência ao cultivo na presença tanto de hemina quanto de hidroxiureia desde o início; “HU” corresponde ao tratamento exclusivo com hidroxiureia; “*HE+HU” refere-se ao cultivo em que foi adicionado hemina no início do experimento e hidroxiureia somente no dia 2, com resultados para D3 e D4. À direita, tem-se os gráficos que mostram a quantificação proteica relativa na ausência e presença de H₂O₂, obtida por análise densitométrica. Figura adaptada com *plots* tratados pelo *software ImageLab*.

7. CONCLUSÃO

No que diz respeito às amostras de sangue dos pacientes, nossos resultados sugerem que a hidroxireia atue como indutora da tradução de PBXIP1, estimulando o crescimento e diferenciação das células hematopoiéticas, quadro benéfico para os pacientes falciformes. É válido ressaltar que não pôde ser detectada diferença estatística significativa entre os grupos nas análises de qPCR, mas, por outro lado, as diferenças foram notáveis no que diz respeito à quantificação proteica tanto entre falciformes não tratados e tratados quanto entre o grupo de indivíduos saudáveis e falciformes tratados com hidroxireia, sendo aumentada no grupo de pacientes tratados em ambas as comparações.

Através das análises focadas em SNCA, obtivemos resultados que indicam uma redução da expressão e conteúdo protéico de α -sinucleína em função do tratamento com hidroxireia, o que sugere que HU possa atuar reduzindo estímulos apoptóticos e amenizando o processo inflamatório dos anêmicos falciformes. Mais uma vez, apesar de poder ser observada uma forte tendência, a análise dos grupos por qPCR não apresentou diferença estatística significativa, enquanto que nas análises por *Western Blot* esta foi relevante entre falciformes tratados e não tratados e entre indivíduos saudáveis e falciformes tratados, sendo reduzida no grupo de pacientes tratados em ambos os casos.

A moesina participa de diversas funções fisiológicas, com ênfase na adesão celular e na retração de membranas e microtúbulos, sendo de grande importância para o adequado desacoplamento do complexo de adesão. Diferente dos demais, os resultados obtidos para MSN sugerem uma forte associação do gene com a doença, e não somente com o tratamento com hidroxireia. Aparentemente, os pacientes falciformes que não recebem tratamento com hidroxireia apresentam menor conteúdo proteico de MSN, o que pode estar fortemente associado com o aumento da ocorrência de adesão celular e consequentes crises vaso-oclusivas vivenciadas por esses indivíduos. A estatística dos dados mostrou-se significativa tanto no que diz respeito à transcrição quanto à tradução quantificada entre os grupos.

Para ATF4, não foi possível analisar a quantificação proteica entre os grupos, mas os resultados obtidos por qPCR evidenciam a superexpressão desse gene em pacientes não tratados com hidroxireia em relação tanto ao grupo de indivíduos saudáveis quanto ao grupo de falciformes tratados. Assim, sabendo que a ativação de ATF4 é induzida em condições de estresse e hipóxia – quadro recorrente quando se trata das células falciformes –, sugere-se que o tratamento com hidroxireia possivelmente melhore as condições de oxigenação e assim reduza a expressão de ATF4 para um nível bem próximo ao de indivíduos saudáveis. Ainda, sabe-se que ATF4 induz a expressão de fatores de crescimento durante o processo de espessamento da camada dos vasos sanguíneos e, por outro lado, a hidroxireia exerce efeitos anti-angiogênicos, prevenindo a progressão da neovascularização desregulada e manifestações associadas à falcização dos eritrócitos, o que sugere uma justificativa para que os pacientes tratados com hidroxireia apresentem menor expressão de ATF4.

Já nos ensaios com cultura de células K562, foi possível observar que a adição de peróxido de hidrogênio e o consequente aumento do estresse oxidativo acaba por alterar o

padrão de expressão natural da célula, induzindo ou reprimindo a expressão de determinados genes possivelmente como um mecanismo de defesa. Devido à ausência de replicatas, não foi possível chegar a observações conclusivas a respeito do efeito da hidroxiureia na expressão dos quatro genes de interesse em K562, mas acreditamos que a realização de replicatas experimentais levará a resultados mais evidentes, assim como metodologias mais direcionadas à função das proteínas de interesse. Como exemplo, propomos o monitoramento da adesão celular mediante a inibição ou superexpressão de *MSN*, gene que mostrou-se promissor em nossa pesquisa e cuja função está muito associada com a vasoclusão dos pacientes com anemia falciforme.

As principais conclusões deste trabalho estão sumarizadas na figura 18.

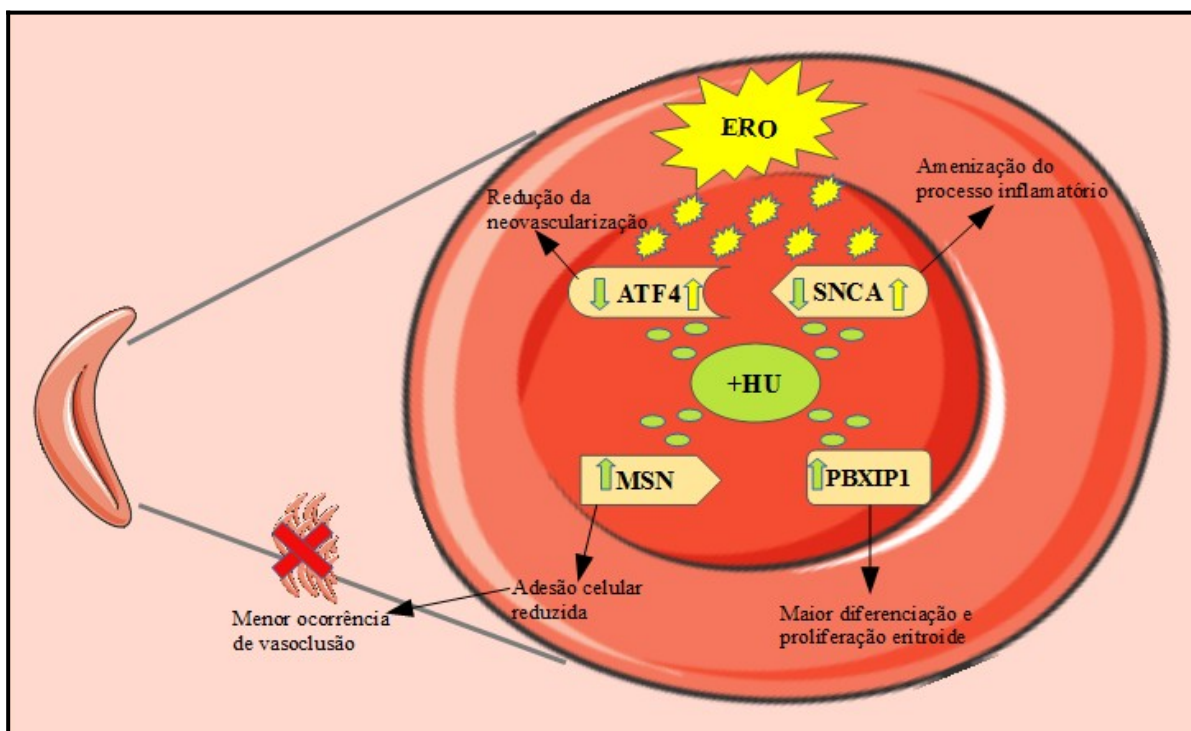


Figura 18. Principais efeitos do tratamento com HU sobre a expressão de *MSN*, *PBXIPI*, *SNCA* e *ATF4* e consequências relacionadas. O tratamento com HU ativa positivamente a produção tanto de *MSN* quanto de *PBXIPI*, enquanto afeta negativamente a expressão de *SNCA* e *ATF4*. Com a ativação de *MSN*, é esperada uma diminuição da adesão celular, levando à consequente diminuição das crises vaso-oclusivas tão comuns na anemia falciforme. A ativação de *PBXIPI* auxiliaria no estímulo da diferenciação de células hematopoéticas, repovoando o sistema circulatório com novos eritrócitos e consequentemente reduzindo as complicações causadas pelos eventos apoptóticos das células falcizadas. A diminuição na produção de *SNCA* tem um papel de suma importância, uma vez que reduz os efeitos inflamatórios que são os fatores de maior gravidade nesta doença, responsáveis por grande parte das sinalizações apoptóticas desencadeadas nestas células. Por último, a redução de *ATF4* reduziria a neovascularização e espessamento dos vasos, aumentando a circulação sanguínea e contribuindo também na amenização tanto de processos inflamatórios quanto apoptóticos. Ademais, sugerimos que o aumento do estresse oxidativo pela adição de H_2O_2 ao meio de cultura também influencia a expressão de nossos genes e afeta o potencial efeito da hidroxiureia, Figura criada pela autora pela adaptação de imagens da Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License (<<http://smart.servier.com>>).

8. REFERÊNCIAS

- ABRAMOVICH, C. *et al.* Functional cloning and characterization of a novel nonhomeodomain protein that inhibits the binding of PBX1-HOX complexes to DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 34, p. 26172-26177, 2000.
- ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 78-86, 2018.
- ALMEIDA C. B. *et al.* Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**, v. 120, n. 14, p. 2879-2888, 2012.
- AMERI, K. *et al.* Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1876-1882, 2004.
- ANSA-ADDO, E. A. *et al.* Membrane-organizing protein moesin controls Treg differentiation and antitumor immunity via TGF- β signaling. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 4, p. 1321-1337, 2017.
- ANTONARAKIS, S. E.; KAZAZIAN, H. H.; ORKIN, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Human Genetics**, v. 69, n. 1, p. 1-14, 1985.
- BARAZIA, A. *et al.* Hydroxyurea with AKT2 inhibition decreases vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**, v. 126, n. 22, p. 2511-2517, 2015.
- BECKER, K. *et al.* Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 163-189, 2004.
- BI, M. *et al.* ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 19, p. 3470-3481, 2005.
- BIANCHI, M. D. L. P.; Antunes, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, 12(2), 123-130, 1999.
- BIANCHI, N. *et al.* Involvement of miRNA in erythroid differentiation. **Epigenomics**, v. 4, n. 1, p. 51-65, 2012.
- BOUNDURANT M. C., KOURY M. J. Origin and development of blood cells. In: **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th ed. p. 145- 168, 1999.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 762-769, 1997.
- BUNN H. F., FORGET B. G. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. 1. ed. **W.B. Saunders Company**, 1986.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- BUTLER, M. O.; HIRANO, N. Human cell-based artificial antigen-presenting cells for cancer immunotherapy. **Immunological reviews**, v. 257, n. 1, p. 191-209, 2014.
- CHENG, L. *et al.* Overexpression of HPIP as a biomarker for metastasis and prognosis prediction in endometrial cancer patients. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 33, n. 8, p. e22959, 2019.
- CIBELLI, G.; SCHOCH, S.; THIEL, G. Nuclear targeting of cAMP response element binding protein 2 (CREB2). **European Journal of Cell Biology**, v. 78, n. 9, p. 642-649, 1999.
- COKIC, V. P. *et al.* Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231-239, 2003

COSTA, C. A. *et al.* Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells: abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50980–50984, 2002.

COSTA, F. C. *et al.* Gene expression profiles of erythroid precursors characterise several mechanisms of the action of hydroxycarbamide in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 136, n. 2, p. 333-342, 2007.

COUCH, Y. *et al.* The acute inflammatory response to intranigral α -synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 1, 2011.

CUNHA A. F. *et al.* Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia. In: LOGIE, C. **Point Mutation**. 1. Ed. Intech, 2012.

DAGNELL, M. *et al.* Thioredoxin reductase 1 and NADPH directly protect protein tyrosine phosphatase 1B from inactivation during H₂O₂ exposure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 35, p. 14371-14380, 2017.

DAS, D. K. *et al.*, Oxygen radicals: systemic events and disease processes. **Free Radical Research**, v. 11, n. 6, p. 349-350, 1991.

DELON, J.; KAIBUCHI, K., GERMAIN, R. N. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. **Immunity**, v. 15, n. 5, p. 691-701, 2001.

DESSYPRIS, E. N. Erythropoiesis. In: **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th ed. p. 169- 193, 1999.

DREXLER, H. G.; MATSUO, Y.; MACLEOD, R. A. F. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of erythroleukemia. **Leukemia research**, v. 28, n. 12, p. 1243-1251, 2004.

FADER, C. M. *et al.* Hemin induces mitophagy in a leukemic erythroblast cell line. **Biology of the Cell**, v. 108, n. 4, p. 77-95, 2016.

FAURE, S. *et al.* ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. **Nature Immunology**, v. 5, n. 3, p. 272, 2004.

FENG, Y. *et al.* HPIP is upregulated in colorectal cancer and regulates colorectal cancer cell proliferation, apoptosis and invasion. **Scientific reports**, v. 5, p. 9429, 2015.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, 43.1: 61-68, 1997.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 609-619, 2008.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Iron overload in hematological disorders. **Press. Medicale** 46, e296–e305, 2017.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of clinical investigation**, 117.4: 850-858, 2007.

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n.1, p. 51-56, 2003.

GIASSON, B. I. *et al.* Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 636-640, 2003.

GLADWIN, M. T.; OFORI-ACQUAH, Solomon F. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 24, p. 3689-3690, 2014.

GROSSO, R. A. et al. Hemin induces autophagy in a leukemic erythroblast cell line through the LRP1 receptor. **Bioscience reports**, v. 39, n. 1, 2019.

GUARDA, C. C. *et al.* Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

GROSVELD, F.; DILLON, N.; HIGGS, D. The regulation of human globin gene expression. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 6, n. 1, p. 31-55, 1993.

HAMDA, C. B. *et al.* A common molecular signature of patients with sickle cell disease revealed by microarray meta-analysis and a genome-wide association study. **PLoS one**, v. 13, n. 7, p. e0199461, 2018.

HARDING, H. P. *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular Cell**, v. 6, n. 5, p. 1099-1108, 2000.

HASSON, Carla *et al.* The role of hydroxyurea to prevent silent stroke in sickle cell disease: Systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 98, n. 51, p. e18225, 2019.

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Long-range regulation of α globin gene expression during erythropoiesis. **Current Opinion in Hematology**, v. 15, n. 3, p. 176-183, 2008.

HOFFMAN R. *et al.* Hematology: Basic Principles and Practice. 2nd ed. New York, Churchill Livingstone – **ELSEVIER**, 2008.

HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. Human hemoglobin genetics. New York: **Springer Science & Business Media**, p. 467, 1986.

IKUTA, T.; AUSENDA, S.; CAPPELLINI, M. D. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMPdependent protein kinase pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1847-1852, 2001.

JAKES, R.; SPILLANTINI, M. G.; GOEDERT, M. Identification of two distinct synucleins from human brain. **FEBS letters**, v. 345, n. 1, p. 27-32, 1994.

JI, Q. *et al.* Hematopoietic PBX-interacting protein mediates cartilage degeneration during the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 313, 2019.

KADRI, Z. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for *TIMP-1* gene transactivation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 17, p. 7412-7422, 2005.

KARP, G. Expressão da informação genética: da transcrição à tradução. **Biologia celular molecular**, cap. 11, p. 439-493, ed. 1, 2005.

KATO, G. J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American Journal of Hematology**, v. 24, n. 9, p. 618-625, 2009.

KATO, Gregory J. et al. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 750-760, 2017.

KOEFLER, H. P.; GOLDE, D. W. Human myeloid leukemia cell lines: a review. 1980.

KOKOURAKI, P.; DOXAKIS, E. Constitutive translation of human α -synuclein is mediated by the 5'-untranslated region. **Open Biology**, v. 6, n. 4, p. 160022, 2016.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, v. 227, p. 680-85, 1970.

LANKES, W. T.; FURTHMAYR, H. Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 19, p. 8297-8301, 1991.

- LEE, B. R.; KAMITANI, T. Improved immunodetection of endogenous α -synuclein. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e23939, 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LOPES, F. C. M. *et al.* In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea. **Microvascular Research**, v. 94, p. 106-113, 2014.
- LOPES, F. C. M. *et al.* Key endothelial cell angiogenic mechanisms are stimulated by the circulating milieu in sickle cell disease and attenuated by hydroxyurea. **Haematologica**, v. 100, n. 6, p. 730-739, 2015.
- LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 20, p. 2395-2407, 2002.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p; 265-276, 1951.
- LOZZIO, C. B.; LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. 1975.
- MADAN, R. *et al.* Differential tissue and subcellular expression of ERM proteins in normal and malignant tissues: cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma. **Head & neck**, v. 28, n. 11, p. 1018-1027, 2006.
- MALABANAN, K. P. *et al.* Activation transcription factor-4 induced by fibroblast growth factor-2 regulates vascular endothelial growth factor-A transcription in vascular smooth muscle cells and mediates intimal thickening in rat arteries following balloon injury. **Circulation research**, v. 103, n. 4, p. 378-387, 2008.
- MANAVATHI, B. *et al.* Functional regulation of pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 (PBXIP1/HPIP) in erythroid differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 8, p. 5600-5614, 2012.
- MANITI, O.; CARVALHO, K.; PICART, C. Model membranes to shed light on the biochemical and physical properties of ezrin/radixin/moesin. **Biochimie**, v. 95, n. 1, p. 3-11, 2013.
- NAGEL, R. L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine**, v.2, n.1, p. 53-62, 1984.
- NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrocitos falcemicos e talassemicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 18, p. 75-81, 1996.
- NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. Sao Paulo: Sarvier, 1997.
- MASUOKA, H. C.; TOWNES, T. M. Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. **Blood**, v. 99, n. 3, p. 736-745, 2002.
- MICHIE, K. A. *et al.* Two Sides of the Coin: Ezrin/Radixin/Moesin and Merlin Control Membrane Structure and Contact Inhibition. **International journal of molecular sciences**, 20(8), 2019.
- MIGLIACCIO, A. R.; PAPAYANNOPOULOU, T. Erythropoiesis. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management**. Cambridge University Press, p. 52-71, 2001.
- MORRIS, C.L.; RUCKNAGEL, D. L.; JOINER, C. H. Deoxygenation-Induced Changes in Sickle Cell-sickle Cell Adhesion. **Blood**, v. 81, p. 3138-3145, 1993.
- NAKAI, M. *et al.* Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 1, p. 104-110, 2007.

OHOKA, N. *et al.* TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4–CHOP pathway and is involved in cell death. **The EMBO journal**, v. 24, n. 6, p. 1243-1255, 2005.

PAIKARI, A.; SHEEHAN, V. A. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 180, n. 2, p. 189-200, 2018.

PEREIRA, M. *et al.* Acute iron deprivation reprograms human macrophage metabolism and reduces inflammation in vivo. **Cell reports**, 28(2), 498-511, 2019.

PERUTZ, M. F. *et al.* Structure of hemoglobin. **Nature**, v.185, p. 416-420, 1960.

ROGERS, Stephen C. *et al.* Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. **Blood**, v. 121, n. 9, p. 1651-1662, 2013.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v.112, n.10, p. 3927-3938, 2008.

SCHERZER, C. R. *et al.* GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene α -synuclein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 31, p. 10907-10912, 2008.

SERJEANT, G. R.; SERJEANT, B. E. Sickle cell disease. New York: **Oxford University Press**, 3rd edition, 2001.

SONATI, M. F.; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. 40-51, 2008.

SONG, M. S. *et al.* Voltage-gated K⁺ channel, Kv3. 3 is involved in hemin-induced K562 differentiation. **PLoS one**, v. 11, n. 2, 2016.

SOUZA, P. C. **Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da hemoglobina S em eritrócitos de doentes falcêmicos**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1999.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Baillieres Clin Haematol** 11, 163-184, 1998.

STEINBERG, M. H. *et al.* Disorders of Hemoglobin. **Cambridge University Press**. 2001.

STEINBERG, M. H.; BRUGNARA, C. Pathophysiological-Based Approaches to Treatment of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 89-112, 2003.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v.129, n.4, p. 465-81, 2005.

SULTANA, C. *et al.* Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. **Blood**, v. 10, p. 3924-3935, 1998.

SUTTON, M.; BOUHASSI, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, n. 1, p. 66-69, 1989.

TACHIBANA, K.; HAGHPARAST, S. M. A.; MIYAKE, J. Inhibition of cell adhesion by phosphorylated Ezrin/Radixin/Moesin. **Cell Adhesion & Migration**, v. 9, n. 6, p. 502-512, 2015.

TELEN, M.; KAUFMAN, R. The mature erythrocyte. In: GREER, J. P. *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology**. Lippincott Williams & Wilkins: p. 217–247, 1999.

TSIFTSOGLU, A. S.; VIZIRIANAKIS, I. S.; STROUBOULIS, J. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. **IUBMB Life**. v.61, n.8, p. 800-830, 2009.

VEKILOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia?. **British journal of haematology**, v. 139, n. 2, p. 173-184, 2007.

VITORINO, P. *et al.* MAP4K4 regulates integrin-FERM binding to control endothelial cell motility. **Nature**, v. 519, n. 7544, p. 425, 2015.

WANG, X. *et al.* The estrogen receptor-interacting protein HPIP increases estrogen-responsive gene expression through activation of MAPK and AKT. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 6, p. 1220-1228, 2008.

WANG, X. *et al.* Heme-bound iron activates placenta growth factor in erythroid cells via erythroid Krüppel-like factor. **Blood**, The Journal of the American Society of Hematology, v. 124, n. 6, p. 946-954, 2014.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v.79, n.8, p.704-712, 2001.

WINTERBOURN, C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Seminars in Hematology**, v. 27, p. 41-50, 1990.

ZAGO, M. A.; SILVA, J. W. A.; FRANCO, R. F. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. **Ciência e Cultura**, v.51, n.3/4, p. 226-234, 1999.

ZAGO M. A., FALCÃO R. P., PASQUINI R. Hematologia: fundamentos e práticas. Editora: **Atheneu**, São Paulo, p. 1442, 2005.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZAWAWI, K. H. *et al.* Moesin-induced signaling in response to lipopolysaccharide in macrophages. **Journal of Periodontal Research**, v. 45, n. 5, p. 589-601, 2010.

ZHANG, S. *et al.* HRI coordinates translation by eIF2 α P and mTORC1 to mitigate ineffective erythropoiesis in mice during iron deficiency. **Blood**, v. 131, n. 4, p. 450-461, 2018.

ZHOU, Bo *et al.* Comprehensive, integrated, and phased whole-genome analysis of the primary ENCODE cell line K562. **Genome research**, v. 29, n. 3, p. 472-484, 2019.

APÊNDICE A

Tabela 2. Características dos *primers* utilizados

Gene	Primers desenhados	Amplicon (pb)	Concentração (F/R)*nM	Threshold	Slope	R ²	Eficiência (%)
ATF4	F: CCAAGCACTTCAAACCTCATG	149	300	0,083909	-3,387	0,999	97,354
	R: ATCCATTTTCTCCAACATCCAAT C		300				
SNCA	F: CAGTAGCCCAGAAGACAGTG	132	300	0,109654	-3,293	0,981	101,239
	R: GATCCACAGGCATATCTTCCAG		300				
ACTB	F: AGGCCAACC GCGAGAAG	79	300	0,098701	-3,291	0,978	101,311
	R: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA		150				
PBXIP1	F: GGACTTCATCTTCAGCCACTTC	77	300	0,101129	-3,361	0,999	98,383
	R: TCTGTGAGTGCTTGTCCTTC		150				
MSN	F: ACTTGAGCAGGAACGGAAG	150	150	0,086892	-3,339	0,981	98,46
	R: AGCTCTGCCATTTCCAAGG		300				

APÊNDICE B

Tabela 3. Dados dos anticorpos utilizados

Proteína	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
ATF4	Anticorpo Policlonal Anti-ATF4 Código: SAB2500130 Sigma-Aldrich Hospedeiro: cabra Diluição: 1:3.000	Donkey-anti-goat IgG – HRP Código: sc - 2020 Santa Cruz Biotechnology Diluição: 1:10.000
GAPDH	Anticorpo Monoclonal GAPDH Código: orb18774 Biorbyt® Hospedeiro: cabra Diluição: 1:5.000	Donkey-anti-goat IgG – HRP Código: sc - 2020 Santa Cruz Biotechnology Diluição: 1:10.000
MSN	Anticorpo Monoclonal Moesin Código: Q480 Cell Signaling Technology® Hospedeiro: coelho Diluição: 1: 2.200	Goat-anti-rabbit IgG – HRP Código: A0545 Sigma - Aldrich Diluição: 1:6.700
PBXIP1	Anticorpo Monoclonal PBXIP1 Código: orb312572 Biorbyt® Hospedeiro: coelho Diluição: 1:2.000	Goat-anti-rabbit IgG – HRP Código: A0545 Sigma - Aldrich Diluição: 1:5.000
P-MSN	Anticorpo Policlonal Anti-phospho-Moesin/Ezrin/Radixin (pThr558) Código: SAB4504260 Sigma Aldrich Hospedeiro: coelho Diluição: 1:2.000	Goat-anti-rabbit IgG – HRP Código: A0545 Sigma - Aldrich Diluição: 1:5.000
SNCA	Anticorpo Policlonal Alpha-synuclein Código: 10842-1-AP ProteinTech® Hospedeiro: coelho Diluição: 1:3.000	Goat-anti-rabbit IgG – HRP Código: A0545 Sigma - Aldrich Diluição: 1:5.000

APÊNDICE C
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO / LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E
GENÉTICA APLICADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

(Resolução 466/2012 do CNS)

**EFEITO DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE
ATF4, MSN, PBXIP1 E SNCA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E EM CÉLULAS
K562**

A finalidade deste termo é trazer informações para o voluntário sobre a pesquisa **“EFEITO DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE ATF4, MSN, PBXIP1 E SNCA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E EM CÉLULAS K562”**. O estudo em questão se propõe a analisar a expressão de alguns genes a partir da amostra de pacientes com anemia falciforme tratados e não tratados com hidroxiureia, um medicamento que, de forma ainda não bem elucidada, aumenta o nível de hemoglobina fetal e leva à ativação ou inibição de determinados genes, resultando na melhora do quadro clínico do paciente. O objetivo deste trabalho é estudar alguns destes genes e relacioná-los com os observados entre indivíduos tratados e não tratados.

Você, que não é acometido pela doença, está sendo convidado a ser um voluntário do grupo controle, através do qual compararemos se a expressão de alguns genes de doentes tratados com hidroxiureia se assemelha a de indivíduos saudáveis, que não tem anemia falciforme. Caso queira participar, você deverá doar 3 frascos (4 colheres de sopa cada) de sangue. A coleta de sangue será realizada em ambiente confortável e privativo por profissional habilitado em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de antissepsia preconizados para este tipo de procedimento. A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde do paciente. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Além disso, você deverá responder um pequeno questionário. Você terá direito à total privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo, havendo risco mínimo de vazamento de informação devido ao acesso restrito aos dados. Para isso, na sua ficha clínica não aparecerá nenhum nome que o identifique, apenas um número que somente o pesquisador principal saberá a quem se refere.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que você possa ter sobre este termo e sobre o projeto. Os resultados deste projeto poderão ser apresentados em congressos ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

Você terá ampla liberdade de se recusar a participar do estudo ou retirar seu consentimento ou amostra biológica em qualquer fase deste, sem

que isto afete os seus cuidados médicos no presente ou no futuro, ou traga qualquer tipo de prejuízo com as Instituições envolvidas. Você terá também direito a esclarecimentos sobre o estudo a qualquer hora e permissão para contatar o CEP da UFSCar no caso de quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou quanto aos pesquisadores.

Ao aceitar participar da pesquisa, você não receberá compensação financeira, mas caso haja gastos de sua parte (com transporte, alimentação etc.), estes serão ressarcidos. Ainda, você terá direito à indenização por qualquer tipo de dano resultante da sua participação na pesquisa.

Como benefícios indiretos, os dados obtidos nessa pesquisa poderão servir para podermos compreender melhor a genética envolvida no tratamento da anemia falciforme com hidroxiureia, possibilitando-nos vislumbrar inclusive novos alvos de tratamento para essa doença. Desta forma, mesmo não possuindo a doença, você poderá ajudar imensamente inúmeras pessoas que sofrem com os sintomas da anemia falciforme.

Você receberá uma via deste termo, rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal. Você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação agora ou a qualquer momento.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@ufscar.br

Endereço para contato (24 horas por dia e sete dias por semana):

Pesquisador Responsável: **Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha**

Universidade Federal de São Carlos, CCBS, Departamento de Genética e Evolução.

Endereço: **Rodovia Washington Luis, km 235, Monjolinho, São Carlos, SP-**

Contato telefônico: **(16) 3306-9768** e-mail: **anderf2611@ufscar.br**

Local e data:

_____ Nome do Pesquisador	_____ Assinatura
_____ Nome do Participante	_____ Assinatura do Participante

Autorização para armazenamento de material biológico:

() **Sim** () **Não**

Assinatura do Participante

APÊNDICE D
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO / LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E
GENÉTICA APLICADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PORTADOR
(Resolução 466/2012 do CNS)

EFEITO DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE
ATF4, MSN, PBXIP1 E SNCA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E EM CÉLULAS
K562

A finalidade deste termo é trazer informações para o voluntário sobre a pesquisa **“EFEITO DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE ATF4, MSN, PBXIP1 E SNCA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E EM CÉLULAS K562”**. O estudo em questão se propõe a analisar a expressão de alguns genes a partir da amostra de pacientes com anemia falciforme tratados e não tratados com hidroxureia, um medicamento que, de forma ainda não bem elucidada, aumenta o nível de hemoglobina fetal e leva à ativação ou inibição de determinados genes, resultando na melhora do quadro clínico do paciente. O objetivo deste trabalho é estudar alguns destes genes e relacioná-los com os observados entre indivíduos tratados e não tratados.

Caso queira participar, você deverá doar 3 frascos (4 colheres de sopa cada) de sangue. A coleta de sangue será realizada em ambiente confortável e privativo por profissional habilitado em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de antissepsia preconizados para este tipo de procedimento. A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde do paciente. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Além disso, serão levantados alguns dados de seu prontuário médico e você deverá responder um pequeno questionário. Você terá direito à total privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo, havendo risco mínimo de vazamento de informação devido ao acesso restrito aos dados. Para isso, na ficha de exame clínico não aparecerá nenhum nome que o identifique, apenas um número que somente o pesquisador principal saberá a quem se refere.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que você possa ter sobre este termo e sobre o projeto. Os resultados deste projeto poderão ser apresentados em congressos ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

Você terá ampla liberdade de se recusar a participar do estudo ou retirar seu consentimento ou amostra biológica em qualquer fase deste, sem que isto afete os seus cuidados médicos no presente ou no futuro, ou traga qualquer tipo de prejuízo com as Instituições envolvidas. Você terá também direito a esclarecimentos sobre o estudo a qualquer hora e permissão para

contatar o CEP da UFSCar no caso de quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou quanto aos pesquisadores.

Ao aceitar participar da pesquisa, você não receberá compensação financeira, mas caso haja gastos de sua parte (com transporte, alimentação etc.), estes serão ressarcidos. Ainda, você terá direito à indenização por qualquer tipo de dano resultante da sua participação na pesquisa.

Como benefícios indiretos, os dados obtidos nessa pesquisa poderão servir para podermos compreender melhor a genética envolvida no tratamento da anemia falciforme com hidroxíureia, possibilitando-nos vislumbrar inclusive novos alvos de tratamento para essa doença. Além disso, você terá a oportunidade de conversar com especialista no assunto e esclarecer dúvidas que ainda tenha sobre a sua doença.

Você receberá uma via deste termo, rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal. Você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação agora ou a qualquer momento.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@ufscar.br

Endereço para contato (24 horas por dia e sete dias por semana):

Pesquisador Responsável: **Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha**

Universidade Federal de São Carlos, CCBS, Departamento de Genética e Evolução.

Endereço: **Rodovia Washington Luis, km 235, Monjolinho, São Carlos, SP-**

Contato telefônico: **(16) 3306-9768** e-mail: **anderf2611@ufscar.br**

Local e data:

Nome do Pesquisador

Assinatura

Nome do Participante

Ass. do Participante/Responsável

Autorização para armazenamento de material biológico:

() Sim () Não

Assinatura do Participante/Responsável