



UFSCAR - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PEROXIRREDOXINA 2 NA MODULAÇÃO DA  
EXPRESSÃO DE OUTRAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS  
ERITROCITÁRIAS K562**

Carla Peres de Paula

São Carlos

2015



UFSCAR - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PEROXIRREDOXINA 2 NA MODULAÇÃO DA  
EXPRESSÃO DE OUTRAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS  
ERITROCITÁRIAS K562**

Carla Peres de Paula

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

Orientadores: Marcos Antônio de Oliveira e  
Anderson Ferreira da Cunha

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P324a Paula, Carla Peres de  
Avaliação do papel de peroxirredoxina 2 na  
modulação da expressão de outras enzimas  
antioxidantes em células eritrocitárias K562 / Carla  
Peres de Paula. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
82 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2015.

1. Peroxirredoxinas. 2. Hemácias. 3. Células  
K562. 4. Silenciamento gênico. I. Título.



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Carla Peres de Paula, realizada em 14/10/2015:

---

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha  
UFSCar

---

Prof. Dra. Ana Carolina Urbaczek  
USP

---

Prof. Dr. Andrei Leitão  
IQSC/USP

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força durante os momentos difíceis e por iluminar meus passos durante essa caminhada.

Agradeço meus pais e amigos pelo apoio, incentivo e preocupação diária, se não fosse por eles não estaria aqui.

Ao meu namorado pelo apoio todos os dias, amor, dedicação e paciência que me dá força para continuar seguindo, Te amo.

Agradeço meus orientadores Anderson Ferreira da Cunha e Marcos Antônio de Oliveira pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pelo voto de confiança e pela grande ajuda de ambos.

Agradeço pela valiosa contribuição dos professores Iran Malavazzi, Euclides Mateucci Jr., João Augustinho, Adriana Santos Duarte e Cintia do Couto Mascarenhas para a elaboração desse trabalho.

Agradeço a professora Fernanda de Freitas Anibal pela gentil disponibilização do laboratório de parasitologia para elaboração dos meus experimentos e pela ajuda. Sem ela o trabalho não seria possível. Agradeço também à todos os alunos do LAP em especial Débora Neris e Joice Rodolfo pela ajuda em todos os momentos.

Agradeço a todos do LBGA pela ajuda, conselhos, amizade e por não me deixarem desistir mesmo quando tudo estava dando errado. Em especial gostaria de agradecer a Karen e João pela ajuda nas análises de Real Time e Karina pela ajuda no Western Blot.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. À todos os funcionários do DGE.

Agradeço a banca examinadora pela disponibilidade em participar na avaliação do meu trabalho.

Agradeço também à CAPES e a FAPESP pelo amparo financeiro na forma de bolsa e manutenção do projeto.

## RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produtos gerados naturalmente pelo metabolismo celular e em baixos níveis fisiológicos desempenham importante papel na regulação intracelular, enquanto que em excesso podem causar diversos danos às células. Para combater esses danos, as células apresentam um complexo mecanismo de defesa incluindo diferentes enzimas que atuam como antioxidantes. Dentre estas enzimas e, principalmente em células como os eritrócitos, que são expostas a altos teores de oxigênio molecular, as Peroxirredoxinas (Prxs), se destacam pela abundância e grande reatividade com os seus substratos. Neste tipo celular, quando ocorrem doenças hemolíticas como a anemia falciforme e a beta talassemia, uma maior produção de EROs e conseqüentemente de danos oxidativos são observados, agravando sobremaneira o quadro clínico dos pacientes acometidos por estas doenças. Nessas doenças, a PRDX2 aparenta ser uma importante linha de defesa antioxidante, já que é a terceira proteína mais presente no citosol do eritrócito. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo a avaliação do papel de PRDX2 em células K562 diferenciadas para a expressão de características eritróides, através do silenciamento gênico de *PRDX2* utilizando shRNA. Foi possível a obtenção de uma inibição de 70% da expressão de *PRDX2*, a qual causou diminuição na proliferação, viabilidade e interação celular, mostrando a importância da PRDX2 na proteção oxidativa nesse tipo celular. Com o objetivo de avaliar a modulação do sistema antioxidante nestas células, analisamos também, o padrão de expressão gênica e proteica de todas as outras *PRDXs* além da expressão gênica de outras enzimas antioxidantes durante o processo de diferenciação. Verificamos que a inibição da expressão de PRDX2 afeta negativamente a expressão de PRDX5 e causa o aumento da expressão de seus redutores biológicos, o que aumentaria a reciclagem de PRDX2 compensando sua falta na célula. Esse dado é inédito na literatura e análises adicionais são necessárias para melhor compreender essa interação além dos mecanismos moleculares envolvidos na expressão de enzimas relacionadas na proteção contra EROS. A compreensão destes mecanismos parece importante para colaborar com o melhor entendimento da fisiopatologia de doenças hemolíticas, identificando possíveis alvos que auxiliem no manejo e que possam amenizar os efeitos da doença desses pacientes.

**Palavras-chave:** Peroxirredoxinas, hemácias, células K562, Silenciamento gênico.

## ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are products naturally generated by the cell metabolism and at low levels play an important physiological role in intracellular regulation, whereas in excess can cause damage to cells. To combat this damage, cells present a complex defense mechanism including different enzymes which act as antioxidants. Among these enzymes, and especially in cells such as erythrocytes, which are exposed to high levels of molecular oxygen, the Peroxiredoxins (Prxs), stand out for the abundance and great reactivity with its substrates. In this cell type, when occurs hemolytic diseases such as sickle cell anemia and beta thalassemia, increased production of ROS and consequently oxidative damage are observed, greatly aggravating the clinical picture of patients affected by these diseases. In these diseases, the PRDX2 appears to be a major line of antioxidant defense, as it is the third most present protein in the cytosol of the erythrocyte. Therefore, this study aimed to assess the role of PRDX2 in differentiated K562 cells for the expression of erythroid characteristics, through gene silencing using shRNA\_PRDX2. It was possible to obtain a 70% of the PRDX2 expression inhibition, which caused a decrease in the proliferation, cell viability and interaction, showing the importance of PRDX2 in oxidative protection on this cell type. In order to evaluate the modulation of antioxidant system in these cells, we also analyzed the pattern of gene and protein expression of all other PRDXs beyond the gene expression of other antioxidant enzymes during the process of differentiation. We found that inhibition of PRDX2 expression adversely affects the expression of PRDX5 and causes increased expression of their biological reducing agents, which increase the recycling PRDX2, compensating for their lack the cell. These data are not get described in the literature and additional analysis is needed to better understand this interaction beyond the molecular mechanisms involved in the expression of related enzymes in protection against ROS. Understanding these mechanisms seems important to work with a better insight of the pathophysiology of hemolytic diseases by identifying possible targets to assist in the management and can mitigate the effects of the disease in these patients.

**Key words:** Peroxiredoxins, erythrocytes, K562 cells, gene silencing.

## **Lista de Figuras**

**Figura 1** – Mecanismo catalítico de três tipos de peroxirredoxinas.

**Figura 2** – Modelo representativo da oligomerização e função de 2-Cys Prx.

**Figura 3** - Estrutura da molécula de hemoglobina HbA.

**Figura 4** – Grupamento de genes de  $\alpha$  e  $\beta$  globinas e a produção dos diferentes tipos de hemoglobinas durante o desenvolvimento humano.

**Figura 5** – Morfologia geral de uma célula K562.

**Figura 6** – Mapa do plasmídeo que será utilizado nos experimentos de transfecção e inibição gênica.

**Figura 7** – Cultivo de células K562.

**Figura 8** – Estrutura molecular do reagente benzidina e seu produto oxidado marrom.

**Figura 9** – Fotomicroscopia do acompanhamento da proliferação de células K562.

**Figura 10** – Minipreparação plasmidial de cultura celular contendo o plasmídeo pLKO.1 puro shRNA\_controle e shRNA\_PRDX2.

**Figura 11** - Viabilidade de células K562 expostas a 0, 2, 4 e 5  $\mu$ g de lipofectamina após 6 dias de exposição.

**Figura 12** - Viabilidade de células K562 para o teste de transfecção.

**Figura 13** - Viabilidade de células K562 após 10 dias do experimento de transfecção.

**Figura 14** - Amostras de RNA de células K562.

**Figura 15** - Análise da expressão gênica da PRDX2 em K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2.

**Figura 16** – Viabilidade, número de células e formação de aglomerados de células K562.

**Figura 17** – Mecanismo protetor de PRDX2 contra estresse oxidativo em eritrócito  $\beta$ -talassêmico.

**Figura 18** – Diferenciação de células K562.



**Figura 19** - Análise da expressão gênica da PRDX2 durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores.

**Figura 20** - Análise da expressão gênica de PRDX1 e PRDX3 durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores.

**Figura 21** - Análise da expressão gênica de PRDX4, PRDX5 e PRDX6 durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores.

**Figura 22** - Análise da expressão gênica de CATALASE, SOD e GPx durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores.

**Figura 23** - Análise da expressão gênica de TRX, TRXR1 e SRX durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores.

**Figura 24** – Extração proteica das culturas celulares K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2.

**Figura 25** – Western Blotting para detecção de PRDX2 usando GAPDH como controle endógeno.

**Figura 26** – Western Blotting para detecção de PRDX1, PRDX3, PRDX4, PRDX5 e PRDX6 usando GAPDH como controle endógeno.

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Informações dos vetores utilizados para a transfecção de shRNA.

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados na técnica de western blotting.

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

EROs - Espécies reativas de oxigênio

$O_2^{\bullet-}$  - Ânion superóxido

HO• - Radical hidroxila

RO<sub>2</sub>• - Peroxil

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

SOD - Superóxido Dismutase

CAT - Catalase

GPx - Glutathione Peroxidase

Prx – Peroxirredoxina

PRDXs – Peroxirredoxinas humanas

GSH – Glutathione

Tsa1p - *Thiol specific antioxidant protein*

Trx – Tiorredoxina

C<sub>P</sub> - Cisteína peroxidásica

C<sub>R</sub> - Cisteína de resolução

PREX - *PeroxiRedoxin classification index*

AhpC-Prx1 - *Alkyl hydroperoxide reductase subunit C* – Peroxirredoxina 1

BCP-PrxQ - *Bacterial comigratory protein* – Peroxirredoxina Q

Tpx – Tiorredoxina Peroxidase

AhpE - *Alkyl hydroperoxide reductase subunit E*

PDGF - Platelet-derived growth factor

EGF - *Epidermal growth factor*

NOXs - NADPH oxidase

L-OOH - Peróxido de ácido linoleico

Gower 1 – Hemoglobina embrionária do tipo ζ<sub>2</sub>ε<sub>2</sub>

Gower 2 - Hemoglobina embrionária do tipo α<sub>2</sub>ε<sub>2</sub>

Portland - Hemoglobina embrionária do tipo ζ<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>

HbA<sub>2</sub> – Hemoglobina de adulto do tipo α<sub>2</sub>δ<sub>2</sub>

HbA<sub>1</sub> ou HbA – Hemoglobina de adulto do tipo α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>

HbF - Hemoglobina fetal do tipo α<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>

G6PD - Deficiência glicose-6-fosfato desidrogenase

HPN - Hemoglobinúria paroxística noturna  
ERNs – Espécies reativas de Nitrogênio  
DEPC – *Diethylpyrocarbonate*  
LB – Meio Luria Bertani  
LMC - Leucemia mieloide crônica  
RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*  
DMEM – Meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
SBF – Soro Bovino Fetal  
DMSO - *Dimethyl sulfoxide* (solução criopreservante)  
BSA - *Bovine serum albumin*  
PBS – Tampão Fosfato-Salino  
EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid* (agente quelante)  
PCR - *Polymerase chain reaction*  
NP-40 - Reagente Nonidet P-40  
SDS - *Sodium dodecyl sulfate* (Agente desnaturante)  
TBS - *Tris Buffered Saline*  
HRP - *Horseradish Peroxidase*  
RISC - *RNA-induced silencing complex*  
TB – Meio *Terrific Broth*  
HE – Hemina  
HU – Hidroxiuréia  
BAC -  $\beta$ -ACTINA  
qRT-PCR - PCR em tempo real  
 $C_t$  - *Cycle threshold*  
NTCs - *No-template controls*  
cDNA – DNA complementar  
kDa – Kilodáltons  
DNA – Ácido desoxiribonucléico  
RNA – Ácido ribonucléico  
RPM – Rotações Por Minuto

## SUMÁRIO

<b>1.0 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 - Espécies Reativas de Oxigênio .....	12
1.2 - Defesas Celulares Contra Estresse Oxidativo .....	12
1.3 – Peroxirredoxinas .....	13
1.4 - Ciclo REDOX das peroxirredoxinas .....	14
1.5 – EROs e Sinalização Celular .....	16
1.6 – Células Eritrocitárias .....	17
1.7 – Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias .....	20
1.8 – Variantes estruturais da hemoglobina .....	22
1.9 – Eritrócitos, produção de EROs e mecanismos de defesa .....	22
<b>2.0 – JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>24</b>
<b>3.0 - OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.0 - METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
4.1 – Linhagens e plasmídeos .....	26
4.2 – Minipreparação plasmidial .....	28
4.3 – Transformação em bactéria competente .....	28
4.4 – Cultivo de células eritroleucêmicas K562 .....	29
4.5 – Transfecção das células K562 com shRNA utilizando Lipofectamina .....	31
4.6 – Diferenciação de K562 em células eritrocitárias .....	32
4.7 – Extração de RNA .....	34
4.8 – Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	34
4.9 – Real-Time PCR (qRT-PCR).....	35
4.10 - Western blotting .....	36
<b>5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
5.1 - Padronização do cultivo celular de K562.....	40
5.2 - Mini preparação plasmidial dos vetores utilizados para a transfecção .....	40
5.3 – Transfecção de células K562 utilizando o reagente lipofectamina .....	41
5.4 – Extração de RNA e síntese de cDNA .....	44
5.5 – Análise de expressão de <i>PRDX2</i> através de qRT- PCR.....	45
5.6 – Diferenciação de células K562.....	49
5.7 – Análise da expressão de enzimas antioxidantes durante a diferenciação em células K562 .....	52
5.8 – Extração de proteínas de células K562, K562 shRNA_controle e K562 shRNA_PRDX2 .....	56
5.9 – Western Blotting .....	58
<b>6.0 – CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
<b>7.0 – PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>63</b>
<b>8.0 – BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>64</b>

## 1.0 – INTRODUÇÃO

### 1.1 - Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (EROs) é um termo abrangente que descreve radicais livres derivados de  $O_2$  como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) e peroxil ( $RO_2^{\bullet}$ ) assim como, não radicais derivados de  $O_2$  como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxinitritos, peróxidos de lipídeos, dentre outros. EROs são produtos gerados naturalmente pela redução incompleta do oxigênio durante processos metabólicos, exposição a agentes externos ou como resposta secundária a diversas enfermidades [1–3].

A maioria dos estudos sugere que, a maior parte da produção de EROs intracelular é derivada da mitocôndria. Durante a produção de energia, até 5% de todo o produto da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial escapa na forma de radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) [4,5]. Estas moléculas ao receberem elétrons através de reações com metais divalentes pelas reações de Fenton e Haber Weiss podem formar radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ), que é extremamente reativo. Em baixos níveis fisiológicos, EROs estão envolvidas na regulação da proliferação celular, além de terem papel de "mensageiros" redox na sinalização intracelular [3,6,7]. Entretanto, quando essas espécies excedem a capacidade antioxidante das células, são responsáveis pela oxidação de biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, causando danos a organelas e podendo levar a morte celular [1,8–10].

### 1.2 - Defesas Celulares Contra Estresse Oxidativo

A produção intracelular de EROs é balanceada por um complexo sistema de defesa antioxidante que inclui enzimas como Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). SOD catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto que, a CAT e a GPx convertem o peróxido de hidrogênio em água [1,11]. Além destas enzimas já bem caracterizadas, as peroxirredoxinas (Prx), uma importante família de enzimas antioxidantes capazes de

catalisar a redução de hidroperóxidos através de cisteínas altamente reativas presentes em seus sítios ativos [11,12].

Uma variedade de outras moléculas não-enzimáticas, de baixa massa molecular também participam da eliminação de EROs, dentre elas o piruvato, ascorbato (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), flavonóides, carotenóides e a glutationa (GSH). Esta última está presente em concentrações milimolares dentro das células [1,13,14].

### 1.3 – Peroxirredoxinas

Dentre as três classes enzimáticas capazes de decompor hidroperóxidos, as Prx e as GPx se destacam uma vez que, além de decompor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também são capazes de decompor hidroperóxidos de lipídeos e peroxinitritos, o que aponta uma grande versatilidade na proteção celular contra hidroperóxidos [15].

A primeira Prx foi identificada com base na capacidade de proteger proteínas contra prejuízos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio em sistemas redutores contendo tióis [16–18]. A enzima foi denominada Tsa1p (*Thiol specific antioxidant protein*). Diversas isoformas foram identificadas nos mais diversos organismos e denominadas coletivamente como Prxs ou tiorredoxinas peroxidases, em razão do substrato redutor fisiológico ser na maioria das vezes a enzima tiorredoxina [12,17,19]. As Prx são enzimas altamente expressas, com múltiplas isoformas presentes na maioria dos organismos: em *Escherichia coli*, por exemplo, já foram descritas 3 isoformas, 5 em *Saccharomyces cerevisiae*, 6 em *Homo sapiens* e 9 em *Arabidopsis thaliana* [20]. Muitas exibem taxas de redução de peróxido muito elevadas na ordem de 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, utilizando uma conservada arquitetura do sítio ativo altamente especializado para a redução de peróxidos [21,22]. A elevada eficiência catalítica, bem como a abundância dessas proteínas nas células tornam-nas importantes *scavengers* de peróxido (capazes de neutralizar peróxidos formando compostos não reativos), sendo cada vez mais reconhecido que as Prxs desempenham um papel essencial na detoxificação e defesa contra agentes oxidantes prejudiciais à célula [11,22,23]. Além disso, as Prx estão implicadas em muitos processos diferentes como sinalização celular, proliferação, diferenciação, citotoxicidade de células *natural killer*, apoptose e permeabilidade da mitocôndria [24,25].

Adicionalmente à ampla distribuição das Prx entre os diferentes organismos, esta família de proteína pode ser encontrada nos mais diversos compartimentos celulares.

Como mencionado anteriormente em humanos já foram descritas 6 isoformas de Prxs, as quais já foram detectadas nos mais diversos ambientes celulares, sendo encontradas no citosol (PRDX1, PRDX2 e PRDX6), mitocôndria (PRDX3 e PRDX5), peroxissomo (PRDX5), Retículo endoplasmático (PRDX1 e PRDX4) e até mesmo no ambiente nuclear (PRDX1) [15,21,26,27].

#### 1.4 - Ciclo REDOX das peroxirredoxinas

O contexto estrutural e as propriedades bioquímicas das Prx são aspectos que fundamentam sua alta reatividade e abundância nas células. As Prx possuem um enovelamento característico na qual uma folha  $\beta$ , formada por quatro fitas, é circundada por quatro hélices  $\alpha$ , o qual é denominado *fold* tiorredoxina (Trx). Cabe ressaltar que apesar do enovelamento ter sido inicialmente descrito em Trx estudos demonstram que este é um enovelamento bastante ancestral, e adicionalmente às Prx, um grande número de proteínas apresenta este enovelamento [28–30].

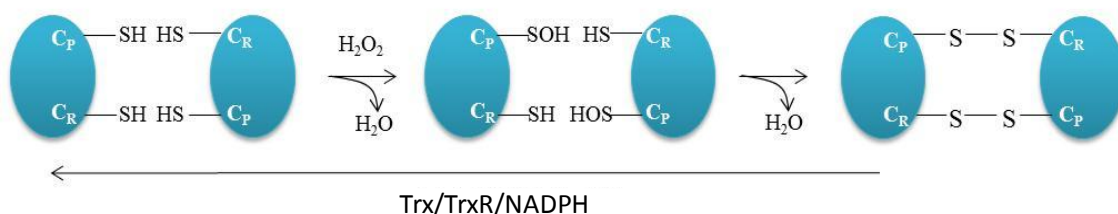
A atividade das Prx depende de um resíduo de cisteína contida num sítio ativo do motivo catalítico PxxxTxxC (onde P designa Prolina; T, Treonina; C, Cisteína e x designa qualquer aminoácido) [11,21]. Estudos demonstraram que, um segundo resíduo de cisteína está geralmente, mas não sempre, presente e conservado próximo à porção C-terminal, definindo classes de Prx contendo 1 ou 2 cisteínas [18]. Diversas classificações já foram propostas para as Prx levando em consideração diferentes aspectos destas enzimas [20,28,31,32]. Muitos trabalhos utilizam a classificação baseada no número de cisteínas envolvidas na catálise (1-Cys Prx e 2-Cys Prx) e pelo tipo de dissulfeto que é formado durante a catálise: inter ou intramolecular (2-Cys Prx típica ou atípica, respectivamente) [21,33]. Adicionalmente, as cisteínas da Prx podem ser classificadas de acordo com o seu papel no ciclo catalítico como cisteína peroxidásica ( $C_P$ ) ou cisteína de resolução ( $C_R$ ) [21] (**Figura 1**).

O ciclo catalítico das Prxs é iniciado pelo ataque da cisteína peroxidásica  $C_P$ -SH ao oxigênio do peróxido, clivando a ligação O-O do peróxido e formando ácido sulfênico no resíduo  $C_P$  ( $C_P$ -SOH) com liberação de  $H_2O$  no caso do  $H_2O_2$  e de derivado de álcool no caso de peróxidos de lipídeos [34]. A redução do ácido sulfênico determina se a enzima é um 1-Cys Prx ou 2-Cys Prx. As 1-Cys Prx possuem somente a  $C_P$  e sua forma oxidada ( $C_P$ -SOH) pode ser reduzida por ácido ascórbico ou tiorredoxina (**Figura 1C**) [35]. No caso das 2-Cys Prx o ácido sulfênico é atacado por uma segunda cisteína, denominada

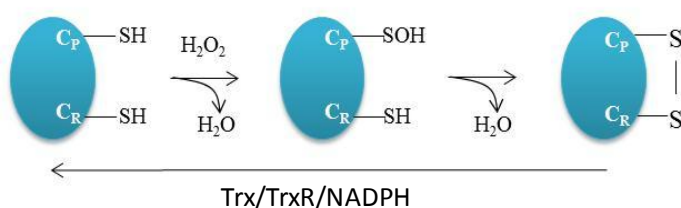


de cisteína de resolução ( $C_R$ ), liberando  $H_2O$  e formando uma ligação dissulfeto inter ou intramolecular (**Figura 1A** e **Figura 1B**) [35].

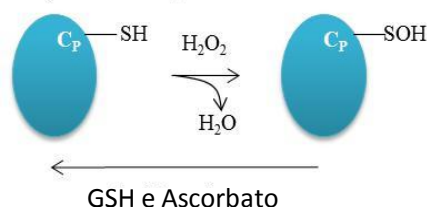
### A) Prx 2-Cys Típica



### B) Prx 2-Cys Atípica



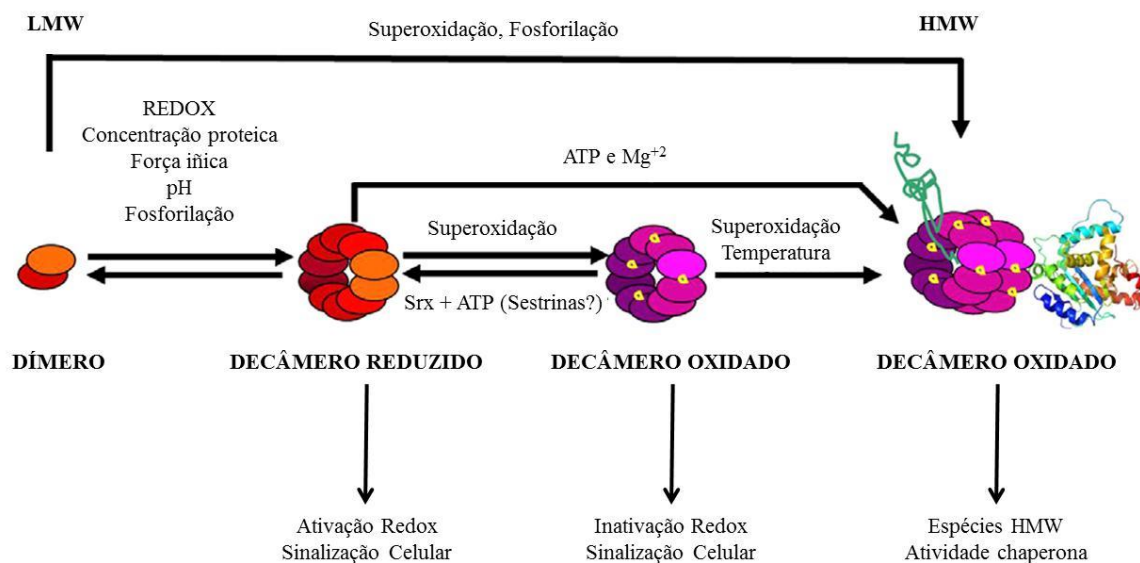
### C) Prx 1-Cys



**Figura 1 – Mecanismo catalítico de três tipos de Prxs.** A cisteína peroxidásica ( $C_P$ ) primeiramente reage com o peróxido. No caso da 2-Cys Prx típica, a  $C_P$  reage com a cisteína de resolução  $C_R$  presente na segunda unidade do dímero formando uma ligação intermolecular (**A**), enquanto que na 2-Cys Prx atípica a  $C_R$  está localizada na mesma cadeia polipeptídica formando uma ligação intramolecular (**B**). O ácido sulfênico derivado da 1-Cys Prx é diretamente regenerado por um doador de elétrons para a forma tiol (**C**) (Adaptado de: Barranco-Medina *et al.*, 2009 [33]).

Recentemente foi proposta uma nova classificação de Prx baseada em sequências funcionalmente importantes em torno dos resíduos chave para a atividade da proteína e em semelhanças e diferenças entre: interface de oligomerização, sensibilidade REDOX, especificidade para doador de elétrons, sensibilidade de inativação com diferentes níveis de peróxido e especificidade de substrato oxidante [23]. Para tanto, foi criada uma base de dados (*PREX - PeroxiRedoxin classification indEX*), contendo 3516 sequências de Prx e propõe uma classificação em 6 subfamílias: AhpC-Prx1, BCP-PrxQ, Tpx, Prx5, Prx6 e AhpE. [36]

A conformação oligomérica da maioria das Prx é dimérica [32,33,37], com raras exceções [38]. Entretanto, quando as 2-Cys Prx típicas (subclasse AhpC-Prx1) são expostas a altas concentrações de peróxido, a C<sub>P</sub> fica superoxidada, assumindo a forma de cisteína ácido sulfínico (C<sub>P</sub>-SO<sub>2</sub>H) ou ácido sulfônico (C<sub>P</sub>-SO<sub>3</sub>H) após o ataque do ácido sulfênico (C<sub>P</sub>-SOH) por outras moléculas de peróxido, impedindo a formação do dissulfeto com a C<sub>R</sub>. A redução da Prx hiperoxidada é realizada pela ação da sulfirredoxina (SRX). Entretanto, se a hiperoxidação persistir, as Prxs se oligomerizam e formam decâmeros, sendo que a união de decâmeros parece estar relacionada com atividade de chaperona molecular e função de sinalização celular [21,39,40] (**Figura 2**).



**Figura 2 – Modelo representativo da oligomerização e função de 2-Cys Prx.** Em resposta a diferentes fatores, especialmente sob condições redutoras, dímeros se oligomerizam para hexâmeros, octâmeros e decâmeros. Se a hiperoxidação persistir, Prxs podem se organizar em espécies de alto peso molecular com atividade de chaperona (Adaptado de: Barranco-Medina *et al.*, 2009 [33]).

## 1.5 – EROs e Sinalização Celular

As células produzem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em resposta a diversos estímulos e muitos estudos têm demonstrado que esta molécula, ativa várias vias de sinalização [3,7,9,41,42]. Outros estudos têm demonstrado que muitas das respostas a fatores de crescimento, hormônio e citocinas inflamatórias envolvem sinalização Redox com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geralmente proposto como um mensageiro secundário. Por exemplo, em células estimuladas por

fatores de crescimento como PDGF ou EGF, a produção de  $H_2O_2$  é requerida para a propagação de sinalização de fatores de crescimento [2,3].

Assim como a mitocôndria, diversas enzimas incluindo NADPH oxidase (NOXs), Xantina Oxidase, Óxido nítrico Sintase e constituintes peroxissomais também geram EROs espontaneamente [1]. O peróxido de hidrogênio, diferente de outras moléculas mensageiras, age não se ligando a efetores, mas sim oxidando seus resíduos críticos, principalmente cisteínas [7]. A oxidação de tióis de proteínas pode alterar sua atividade, sua forma e conseqüentemente suas características de ligação aos seus substratos ou mesmo a outras proteínas [2].

Até então, ainda não está claro como uma molécula tóxica como o  $H_2O_2$  é capaz de oxidar proteínas efetoras seletivamente sem causar dano em outras proteínas e lipídeos. Sabe-se que muitos tipos de EROs não migram grandes distâncias de sua fonte de produção, por conta de sua instabilidade e reatividade inerente, além da capacidade de tamponamento redox da célula [12], isso significa que essas espécies devem reagir com biomoléculas próximas à sua fonte de produção [3]. Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que o  $H_2O_2$  pode atravessar a membrana celular através de canais que auxiliam o transporte de forma ordenada e em níveis adequados, seja de forma intra ou extracelular. Desta forma a resposta celular ao peróxido de hidrogênio não é necessariamente local [3,8].

Em relação aos peróxidos orgânicos, já foi demonstrado que o peróxido de ácido linoleico (L-OOH) também é capaz de ativar reguladores de expressão e estão associados à diferenciação e especialização celular uma vez que durante o processo de diferenciação ou maturação celular ocorre o remodelamento ou mesmo destruição de membranas celulares e organelas subcelulares [43,44].

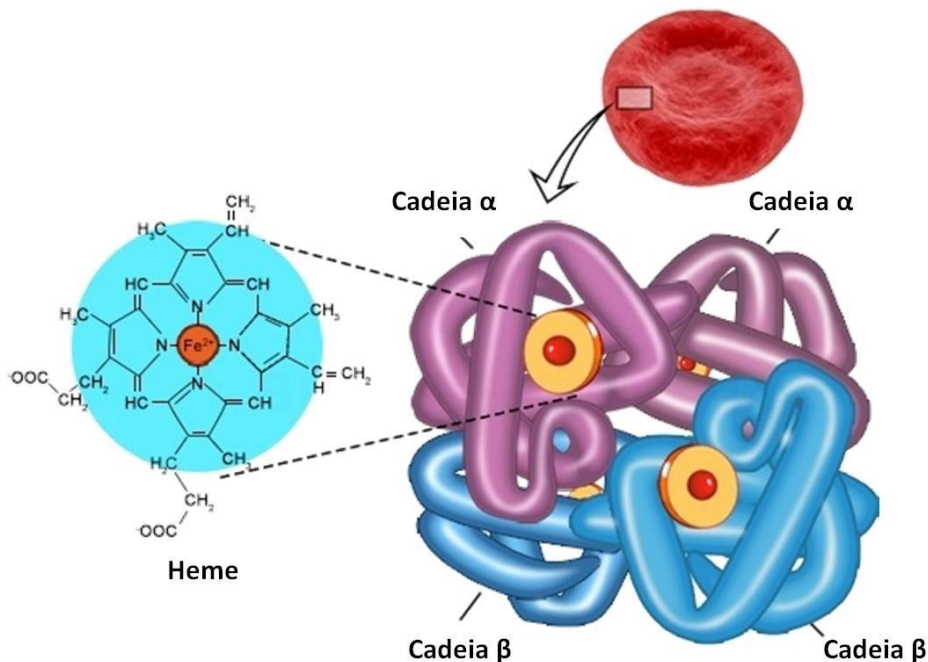
Diante disso, as Prxs parecem ser essenciais candidatos na transdução de sinais mediada por peróxidos já que são capazes de decompor uma grande gama de peróxidos, possuem uma elevada atividade e, além disso, apresentam alterações estruturais dependentes do grau de oxidação da proteína, o qual pode estar relacionado com a interação com parceiros biológicos distintos [40].

## **1.6 – Células Eritrocitárias**

Os eritrócitos representam o tipo celular sanguíneo mais abundante, e nos vertebrados constituem o principal meio de transporte de oxigênio dos pulmões/brânquias a todos os tecidos do corpo através do sangue [45]. Células eritrocitárias maduras apresentam-se como um disco bicôncavo achatado com um diâmetro de 8 micrômetros e espessura de 2 micrômetros, tendo uma média de tempo de vida de  $120 \pm 20$  dias [46]. O constituinte citoplasmático mais abundante é a hemoglobina (95% das proteínas citoplasmáticas) e suas membranas são constituídas por 50% de proteínas, 40% de lipídeos e 10% de carboidratos [47].

Por conta da ausência das organelas celulares particularmente o núcleo e a mitocôndria, células eritrocitárias perdem a habilidade de sintetizar aminoácidos e ácidos graxos e, portanto esse tipo celular possui uma capacidade limitada de metabolismo, suficiente apenas para sobreviver, e são continuamente removidas de circulação e substituídas por células novas formadas na medula óssea [46,48].

A principal função da hemoglobina é absorver, transportar e distribuir o oxigênio para os diversos tecidos do organismo. Possui uma estrutura globular e quaternária, constituída de quatro subunidades iguais, duas a duas, compostas de dois pares de cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas, sendo um par denominado de cadeias tipo alfa e o outro de cadeias do tipo não-alfa ou beta. Sua estrutura é ligada a um átomo de ferro, a ferroprotoporfirina IX (grupo heme), que possui a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o oxigênio nos tecidos (**Figura 3**) [49,50]. As cadeias alfa possuem 141 aminoácidos, sendo que as cadeias beta possuem 146 aminoácidos.



**Figura 3 - Estrutura da molécula de hemoglobina HbA.** A hemoglobina é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas do tipo alfa e duas do tipo beta, cada uma associada a um grupamento heme, contendo um átomo de ferro ao qual se liga o oxigênio de modo reversível.

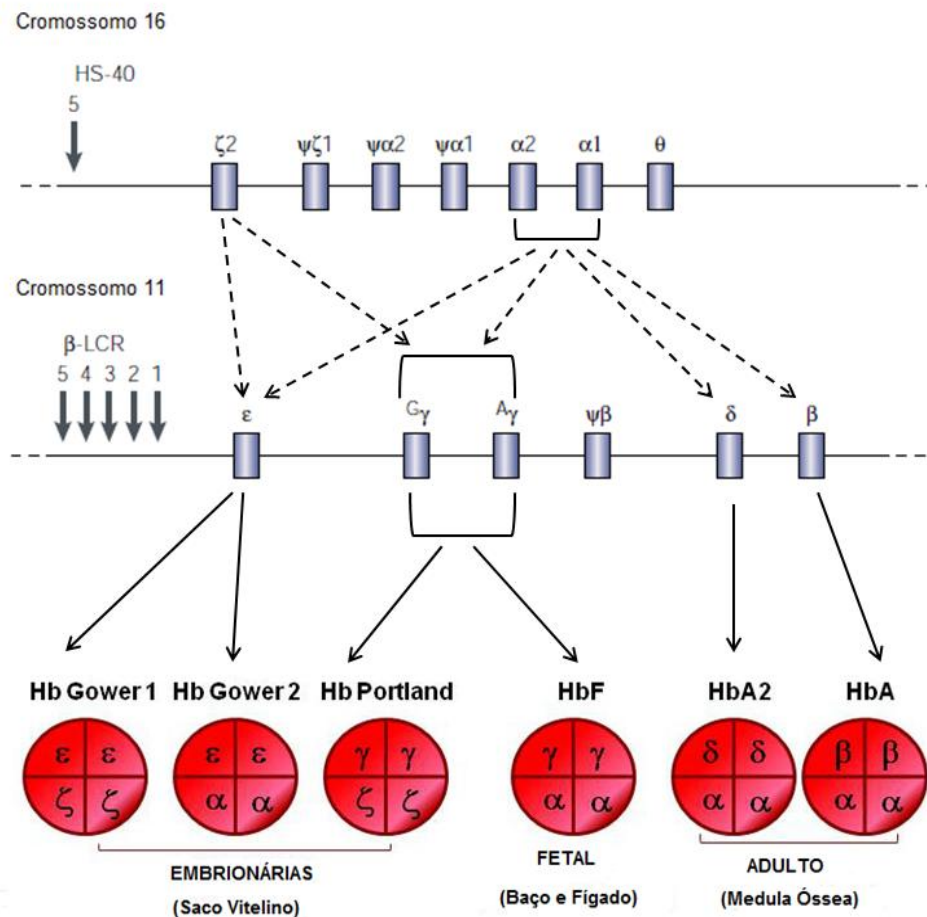
A síntese das cadeias globínicas é controlada por genes distintos, localizados em dois grupamentos cromossômicos diferentes. O grupamento  $\alpha$  está situado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e possui um gene zeta embrionário ( $\zeta_2$ ), os pseudogenes psi zeta ( $\psi\zeta_1$ ), psi alfa 2 ( $\psi\alpha_2$ ), psi alfa 1 ( $\psi\alpha_1$ ), dois genes alfa ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , que não apresentam diferenças em sua região codificante) e um gene teta ( $\theta$ ) de função indeterminada, arranjados no sentido  $5' \rightarrow 3'$ , na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento ontogenético[51,52].

O grupamento  $\beta$  está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5), é composto pelo gene embrionário épsilon ( $\epsilon$ ), pelos genes gama-alanina ( $\gamma^A$ ) e gama-glicina ( $\gamma^G$ ) que são característicos do período fetal, pelo pseudogene beta ( $\psi\beta$ ) e pelos genes delta ( $\delta$ ) e beta ( $\beta$ ), que são ativados apenas no final do período fetal e se expressam completamente após pós-nascimento. Estes genes estão dispostos no cromossomo também na ordem em que são expressos (**Figura 4**) [53,54].

No decorrer do desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem mudanças na expressão desses genes, que são os responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobinas humanas [55].

Nas fases embrionárias e fetal do desenvolvimento humano e após o nascimento, encontramos seis tipos diferentes de hemoglobinas. As hemoglobinas expressas na fase

embrionária são: Gower 1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), que deixam de ser produzidas no início da fase fetal quando predomina a expressão da hemoglobina fetal (HbF) ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Conforme aproxima-se o nascimento, a síntese de HbF diminui, sendo compensada pela formação das hemoglobinas do adulto: HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) e HbA<sub>1</sub> ou HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) (**Figura 4**). Após aproximadamente 28 semanas de vida, as concentrações das hemoglobinas alcançam as proporções do adulto, sendo representadas por cerca de 96-98% de HbA; 2-3,7% de HbA<sub>2</sub> e < 1 % de HbF [49,50].



**Figura 4 –** Grupamento de genes de  $\alpha$  e  $\beta$  globinas e a produção dos diferentes tipos de hemoglobinas durante o desenvolvimento humano [51].

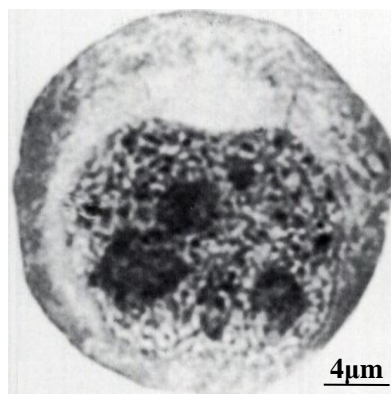
### 1.7 – Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias

A linhagem de células K562 foi inicialmente estabelecida através de efusão pleural de uma paciente de 53 anos com Leucemia Mielóide Crônica (CML) em 1975 por Lozzio & Lozzio [56]. Durante anos essa célula foi considerada como uma

linhagem granulocítica [57–59]. Entretanto estudos posteriores demonstraram que K562 sintetiza hemoglobinas do tipo fetal e embrionária e que essa síntese é fortemente aumentada pelo tratamento com hemina, hidroxiuréia entre outros agentes. Adicionalmente à presença de hemoglobina, as células K562 tem algumas características em comum com células eritróides humanas, como Glicoproteínas de superfície [57,59,60]. Diante desses achados, a linhagem K562 foi classificada como uma linhagem eritroleucêmica, equivalente a um precursor de células eritróides e megacariocíticas [58].

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm utilizado a célula K562 como modelo biológico *in vitro* para reproduzir as características de células eritróides ou megacariocíticas, auxiliando a elucidar os mecanismos ainda não conhecidos nesses tipos celulares [61–64]. Esta plasticidade torna as células K562 excelentes modelos experimentais envolvendo o estudo de células eritróides, o que é de fundamental importância para o entendimento de doenças como talassemias e anemia falciforme.

As células K562 possuem um diâmetro de aproximadamente 20 $\mu$ m, possuem um citoplasma basofílico sem grânulos e dois ou mais nucléolos proeminentes [60] (**Figura 5**).



**Figura 5 – Morfologia geral de uma célula K562.** Podem ser observados seus nucléolos proeminentes e ausência de grânulos (Modificado de Koeffler & Golde, 1980 [60]).

Quando estimulada por agentes como hemina e hidroxiuréia, essas células passam por uma diferenciação celular, produzindo cerca de 10x mais hemoglobina do tipo fetal e embrionária [63–69].

## **1.8 – Variantes estruturais da hemoglobina**

Atualmente já foram descritas mais de 900 variantes estruturais de hemoglobinas, compondo em sua grande maioria anomalias genéticas que afetam as propriedades físicas, químicas e estruturais da molécula [50,70]. A maioria dessas variações está relacionada à alguma doença hematológica, como a Anemia falsiforme, beta e alfa talassemias, deficiência glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), esferocitose hereditária, hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) [50,70,71]. Dentre as principais fisiopatologias dessas doenças estão em geral, instabilidade estrutural da hemoglobina, em muitos casos polimerização, hemólise e conseqüentemente comprometimento no transporte de oxigênio pelos tecidos do organismo.

Nessas doenças hematológicas, algumas respostas fisiológicas são muito comuns, como a inflamação, liberação de mediadores citotóxicos e quimiotáticos como mecanismo para conter, destruir e remover as causas das alterações celulares. Foi observado então que, após diversas respostas celulares, ocorre um “surto” ou explosão metabólica no indivíduo, caracterizada pelo aumento do consumo de ATP, aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons e da geração de EROs e ERNs (Espécies reativas de Nitrogênio). Esse aumento da produção de EROs e ERNs favorece os danos celulares já presentes nessas doenças, como danos nas membranas celulares, danos ao DNA, desestabilidade celular e hemólise, o que é agravado pelo acúmulo de ferro causado por grande parte dessas doenças [50,70,72–79].

## **1.9 – Eritrócitos, produção de EROs e mecanismos de defesa**

Diversos estudos comprovam que a modulação das EROs tem uma relação muito estreita com a fisiopatologia de diversas doenças hematológicas, tais como G6PD, HPN, alfa e beta talassemias [50,76,80–83].

Experimentos realizados em meados dos anos 60 [84] já demonstravam que Glutathione peroxidase juntamente com a Catalase aparentam constituir a principal linha de defesa enzimática contra os danos causados pelo  $H_2O_2$  em eritrócitos. Juntamente com essas enzimas, a PRDX2 tem um importante papel na defesa contra danos oxidativos nos eritrócitos. A PRDX2 além de ser considerada uma enzima altamente reativa, é a terceira proteína mais abundante no citoplasma do eritrócito, tendo sido



inicialmente caracterizada como uma proteína associada à membrana já que se liga reversivelmente a parede da membrana e está ligada na regulação do canal de  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$  [85,86]. Estudos realizados recentemente demonstraram que a expressão da PRDX2 se mostrou mais alta em eritrócitos de humanos e ratos com  $\beta$ -thalassemia, uma doença genética caracterizada pela diminuição ou ausência da cadeia  $\beta$  da hemoglobina que leva ao acúmulo de cadeias livres de  $\alpha$ -globina associado à diminuição da produção de heme e altos níveis de EROs [61,85,87–89]. Desta forma, a PRDX2 tem sido vista como uma importante linha de defesa contra os danos oxidativos causados pelo aumento de produção de EROs em certas anomalias nos eritrócitos. Entretanto, para outras Prxs existentes no citosol das células eritrocitárias (PRDX1 e PRDX6) ainda há poucos estudos que abordam suas funções fisiológicas bem como sua relação com o aumento de EROs neste tipo celular.

Diversos estudos têm demonstrado a importância da PRDX2 em outros tipos celulares, Smith-Pearson, *et al.* 2008 [90], demonstrou que em células de gliomas PRDX2 é superexpressa e ao ser suprimida sua expressão altera significativamente o estado REDOX da célula, aumentando significativamente o nível de EROS intracelular e os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  extracelular.

Além disso, nesse estudo, eles também analisaram o efeito da supressão de PRDX2 na expressão de outras enzimas relacionadas à proteção contra EROs e verificaram que nem PRDX1, PRDX3, CATALASE, GPx ou SOD tiveram suas expressões alteradas enquanto que a molécula GSH (Glutathiona) presente em abundância nas células e sua enzima redutora Glutathiona Redutase tiveram suas atividades reduzidas. De forma similar, esse trabalho tem como objetivo avaliar de que maneira a inibição da expressão da PRDX2 afeta a expressão de outras enzimas relacionadas à proteção do estresse oxidativo em células com características eritróides.

## **1.0 – JUSTIFICATIVA**

O aumento da produção de EROs tem sido relacionado a diversas anormalidades em eritrócitos, podendo agravar o quadro das doenças pelo aumento dos danos oxidativos nas células. Para combater esses danos, mecanismos antioxidantes são de grande importância. As PRDXs têm sido vistas como importantes agentes que previnem o dano oxidativo nos eritrócitos, sendo a PRDX2 a terceira proteína mais abundante nas células eritrocitárias.

Até então existem poucos trabalhos que demonstram a relação entre a expressão de PRDXs nos eritrócitos, bem como a interação proteica e da modulação de expressão entre estas enzimas. Compreender estas relações é de extrema importância para uma futura identificação de possíveis alvos de tratamento e um melhor entendimento da fisiopatologia de diversas doenças hematológicas.

## 2.0 - OBJETIVOS

### Objetivos Gerais

Inibir a expressão gênica e proteica de PRDX2 através do silenciamento gênico utilizando RNA de interferência, através da técnica de lipofecção. Avaliar o nível de expressão das demais proteínas relacionadas na proteção contra o estresse oxidativo.

### Objetivos específicos

- (1) Padronização do cultivo de células K562;
- (2) Transfecção de shRNA em células K562 utilizando lipofectamina;
- (3) Seleção das células transfectadas por meio do antibiótico puromicina;
- (4) Avaliar a taxa de inibição gênica de *PRDX2* nas células transfectadas;
- (5) Diferenciar as células K562 não transfectadas, K562 transfectadas com shRNA\_controle e K562 transfectadas com shRNA\_PRDX2 em células eritrocitárias utilizando hemina e hidroxuéria como estímulos;
- (6) Avaliar a taxa de expressão gênica das *PRDXs* nos diferentes tempos durante a diferenciação utilizando qRT-PCR;
- (7) Avaliar a taxa de expressão proteica das *PRDXs* nos diferentes tempos durante a diferenciação utilizando western blotting.

## 4.0 - METODOLOGIA

### 4.1 – Linhagens e plasmídeos

#### Linhagens de *Escherichia coli*

**DH5  $\alpha$**  - F  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*rk<sup>-</sup>*, *mk<sup>+</sup>*) *phoA**supE44*  $\lambda$  *thi<sup>-1</sup> gyrA96 relA1*

**NEB 5  $\alpha$**  - *fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*) U169 *phoA glnV44*  $\Phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*) M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

#### Linhagem de célula eritroleucêmica

**K562** – Célula com características eritróides derivada de paciente com leucemia mieloide crônica em fase blástica (ATCC, Philadelphia, USA).

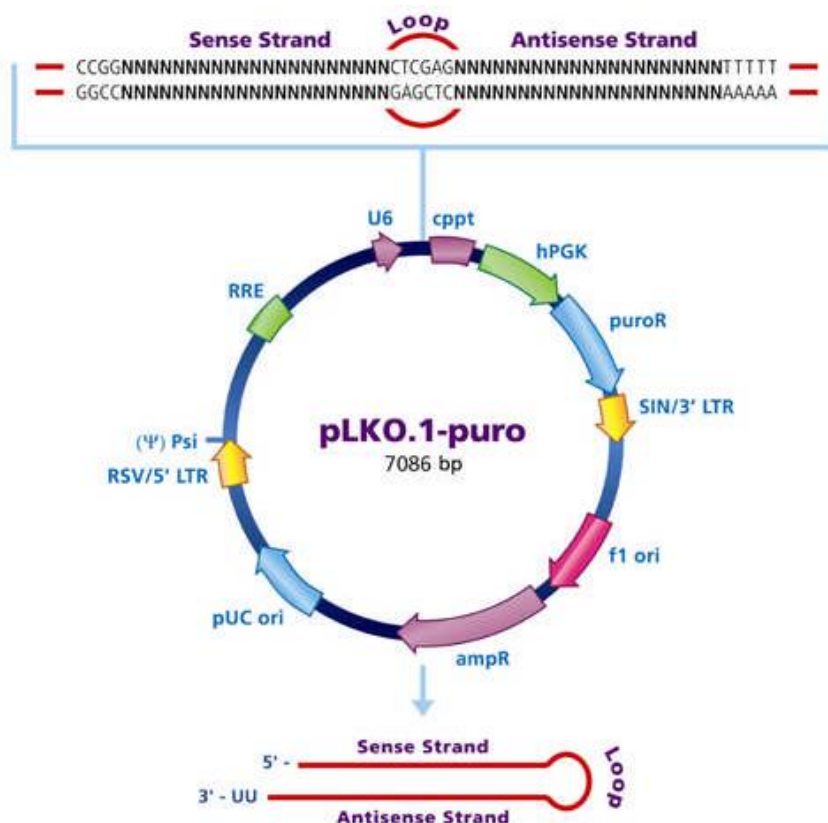
#### Plasmídeo

Como sugerido pelo fabricante, o plasmídeo utilizado como controle negativo de inibição gênica (SHC002-SIGMA-ALDRICH) consiste em um vetor que carrega o shRNA sem alvo. A utilização desse vetor proporciona uma ferramenta importante, uma vez que se a transfecção for eficiente haverá a internalização do shRNA no núcleo da célula, a ativação da via RISC (RNA- *Induced silencing complex*) mas não haverá inibição gênica, uma vez que esse shRNA não tem nenhum gene humano como alvo. A sequência do short-hairpin contém 5 pares de bases incompatíveis com qualquer gene humano.

**pLKO.1-puro** - Vetor carreador do shRNA.

U6 (U6 Promoter); cppt (Central polypurine tract); hPGK (Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter); puroR (Puromycin resistance gene for mammalian selection) SIN/3 $\phi$  LTR (3' self inactivating long terminal repeat); f1 ori (f1 origin of replication); ampR (Ampicillin resistance gene for bacterial selection); pUC ori (pUC

origin of replication); 5' LTR 5' (long terminal repeat); Psi (RNA packaging signal); RRE (Rev response element) (**Figura 6**).



**Figura 6** – Mapa do plasmídeo que será utilizado nos experimentos de transfecção e inibição gênica. Informação fornecida pelo fabricante, catálogo SHC002.

Adicionalmente foi gerado o mapa completo do plasmídeo pLKO.1-puro (Em **Anexo 1**) utilizando a sequência do vetor vazio e a ferramenta de análises de vetores do site Addgene, esse mapa poderá servir para posteriores análises como digestão do plasmídeo ou ampliações específicas.

### Sequências dos shRNAs

O plasmídeo contendo shRNA\_controle foi adquirido da empresa SIGMA-ALDRICH, em estoque congelado a -20°C contendo 1µg de DNA plasmidial em tampão EDTA à 20ng/µl.

O plasmídeo contendo shRNA\_PRDX2 possui as mesmas características do plasmídeo contendo shRNA\_controle entretanto possui um shRNA com alvo específico

para PRDX2. Este foi adquirido pela SIGMA-ALDRICH em estoque congelado a -80°C contendo bactérias *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  transformadas com o plasmídeo de interesse em meio TB (Terrific Broth), ampicilina a 100 $\mu$ g/ml em glicerol 15%.

**Tabela 1.** Informações dos vetores utilizados para a transfecção de shRNA.

Numero do catálogo Descrição	vetor	Inserto	Sequência do Inserto	Estoque
<b>SHC002</b> Controle shRNA não compatível com mamífero	pLKO.1-puro TRC1/1.5	shRNA não compatível com genes de mamíferos	CCGGCAACAAGATGAAG AGCACCAACTC- GAGTTGGTGCTCTTCATC TTGTTGTTTTT	Vetor estocado em tampão Tris-EDTA (TE)
<b>SHCLNG NM_005809</b> Gene de interesse PRDX2	pLKO.1-puro TRC1/1.5	shRNA compatível com PRDX2 de humano	CCGGGCCTGGCAGTGAC ACGATTA ACTCGA- GTTAATCGTGTC ACTGCC AGGCTTTTTTG	Vetor transformado em bactéria estocado em Glicerol

#### 4.2 – Minipreparação plasmidial

Para obter o plasmídeo das colônias desejadas foi utilizada a mini preparação plasmidial utilizando o kit da GE (*Illustra TriplePrep Kit - GE*) seguindo as orientações do fabricante. O DNA plasmidial foi ressuspensionado em água DEPC e estocado em freezer -20°C.

#### 4.3 – Transformação em bactéria competente

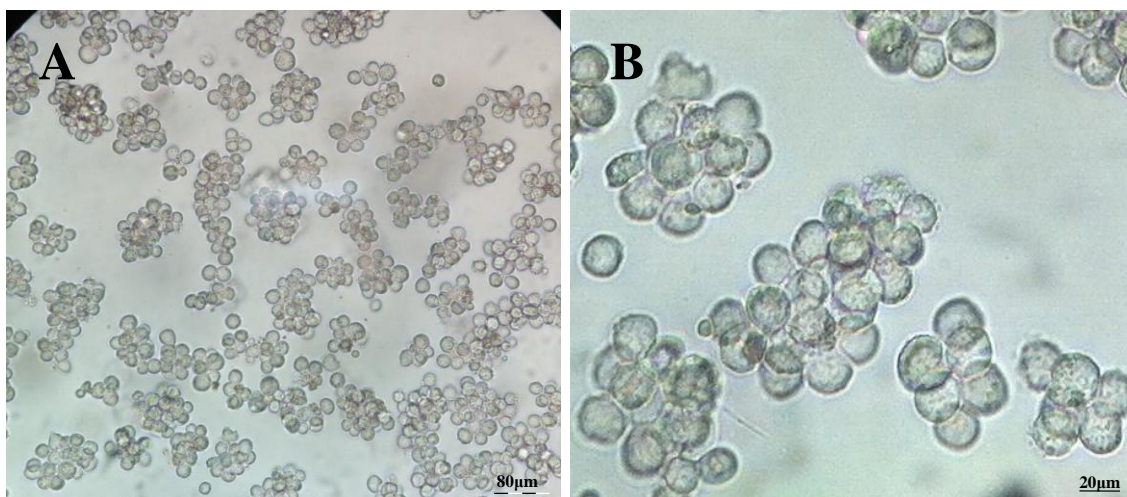
O vetor shRNA\_controle foi transformado em bactéria quimiocompetente NEB5- $\alpha$  utilizando utilizado 1,5 $\mu$ g de DNA plasmidial. As células competentes foram descongeladas no gelo por 10 minutos, foi adicionado o DNA plasmidial e deixado no gelo por 10 minutos. Após os 10 minutos, o tubo foi passado imediatamente para o

banho Maria a 42°C e deixado 90 segundos a fim de causar choque térmico nas células. Foi colocado novamente no gelo por 1-2 minutos, adicionado 800µl de meio LB à temperatura ambiente e incubado no shaker a 37°C/180g por 1 hora. O conteúdo foi centrifugado (4.000g/5 minutos/temp. ambiente) e o sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas 100µl. O pellet foi ressuspensionado no restante do meio e plaqueado em placa de petri contendo meio LB sólido (2% ágar e 100µg/ml de ampicilina). A placa foi deixada em estufa a 37°C *overnight* e no dia seguinte foram selecionadas colônias isoladas, que foram crescidas em meio líquido com ampicilina. A cultura foi utilizada para realizar um estoque com 15% de glicerol, o qual foi guardado em freezer -80°C.

#### 4.4 – Cultivo de células eritroleucêmicas K562

A linhagem celular K562 foi gentilmente cedida pela Dra. Adriana Duarte do Laboratório de Biologia Molecular da Unicamp e todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados no Laboratório de Parasitologia (Departamento de Morfologia e Parasitologia - UFSCar), espaço que foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Fernanda Anibal.

K562 são células que proliferam em suspensão e após se adaptarem ao meio, dobram de número a cada 24 horas [57,58] e apresentam-se como aglomerados celulares em formato de “cachos de uva” (**Figura 7**).



**Figura 7 – Cultivo de células K562.** (A) Células em suspensão de aproximadamente 20µm que foram aglomerados celulares em forma de “cachos de uva” (aumento 20X). (B) detalhe para a formação de aglomerados (aumento 40X) (Fotos da autora).

Foi utilizado o meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), o qual é considerado um excelente meio de cultivo para diferentes células como HeLa, Jurkat, MCF-7, PC12, PBMC e K562 entre outras. A cultura celular foi mantida em frascos de poliestireno em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Ao meio foi adicionado antibióticos penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e fungicida anfotericina B (0,25µg/ml). A preparação do meio está descrita no **Anexo 2**.

Foi utilizado o Soro Bovino Fetal (SBF) como complemento do meio de cultura, este contém fatores de crescimento, hormônios, proteínas, peptídeos, nucleosídeos e lipídeos importantes para a proliferação celular. Após o descongelamento foi utilizado 20% de soro por um dia a fim de promover um meio ambiente rico para a recuperação ao estresse causado durante o congelamento e descongelamento das células (detalhes em **Anexo 2**). Após esse período, o meio foi trocado a fim de diminuir a concentração de soro bovino fetal, que induziria a diferenciação e retirar o DMSO (solução criopreservante) o qual é tóxico à célula. De 2 em 2 dias, aproximadamente, as células foram observadas quanto a sua confluência, número, morfologia e possíveis contaminações, adicionando-se meio fresco suplementado com 10% de soro bovino fetal e trocando-o quando julgar necessário (em casos de mudança de pH ou precipitação de células mortas).

Após aproximadamente 1 semana de cultivo, quando obtivemos um número de células suficiente, foi realizado o congelamento de parte das células. Foi utilizada como solução criopreservante, DMSO 10% e soro bovino fetal 90%. A cada tubo criopreservante foi adicionado 1ml de solução criopreservante contendo 2x10<sup>6</sup> células/ml com viabilidade acima de 80%. Os tubos foram armazenados em ultrafreezer a -80°C por 12-24 horas e transferidos para o nitrogênio líquido (Detalhes em **Anexo 2**).

A contagem das células foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer. E para calcular a viabilidade celular, foi utilizado o reagente azul de tripan (Trypan Blue), na concentração final de 0,1%. Este reagente não atravessa membranas íntegras e assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul. Dessa forma células



viáveis aparecem com coloração branco/transparente enquanto que células mortas ou danificadas apresentam uma coloração azul, a proporção entre o número de células vivas e mortas nos fornece uma porcentagem da viabilidade celular.

#### **4.5 – Transfecção das células K562 com shRNA utilizando Lipofectamina**

A técnica de transfecção tem sido eficientemente realizada a partir de diferentes métodos, que são divididos em métodos biológicos como o uso de vetores virais, métodos físicos como a eletroporação e métodos químicos como a utilização de lipossomos.

Os lipossomos foram descritos originalmente por Bangham & Home (1964) [91] depois de ser verificado através de microscopia eletrônica que fosfolipídios em solução formavam vesículas compostas de bicamadas concêntricas intercaladas por compartimentos de água. [92]. Os lipossomos foram então estudados como modelo de membrana e como veículos para o transporte de moléculas, tais como anticorpos, insulina e albumina. Sendo assim, diferentes lipossomos passaram a ser estudados quanto a sua eficiência de transfecção de RNA e DNA para dentro da célula.

Lipofectamina é uma formulação de lipossomos catiônicos e co-lipídios neutros (*helper lipid*), que se complexam com moléculas de ácido nucleico de carga negativa, permitindo que essas entrem na célula [93]. A mistura dos dois tipos de lipídios é tratada por cavitação para a formação de lipossomos unilamelares de aproximadamente 100nm de diâmetro.

Após 1 semana de cultivo, alcançamos um número de  $1 \times 10^5$  células/ml em cerca de 20-50ml de células ( $2-5 \times 10^6$ ) células com 90% de viabilidade e 50-90% de confluência. O procedimento de transfecção foi iniciado, no dia da transfecção foram preparados  $2 \times 10^5$  células em 500µl de meio em cada poço em uma placa de 24 poços. Para cada amostra de transfecção, foram preparados complexos de DNA-Lipofectamina. Primeiramente, o DNA (vetor contendo shRNA) foi diluído em 50µl de Opti-MEM (Meio de cultura com soro reduzido ideal para diluições durante a transfecção utilizando lipofectamina) e misturado gentilmente. Em outro tubo foi misturada a lipofectamina em 50µl de Opti-MEM e a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos.

Após 5 minutos foi misturado o DNA diluído com a lipofectamina diluída, totalizando um volume de 100µl. O complexo DNA-lipofectamina foi então incubado à

temperatura ambiente por 20 minutos e, em seguida, foi adicionado em cada poço contendo a cultura celular.

A placa foi incubada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24-48 horas. Passados dois dias, as células foram observadas em microscópio invertido. Foi adicionado meio fresco aos poços e antibiótico puromicina (2µg/ml) para seleção das células transfectadas. A placa então foi incubada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. O antibiótico foi adicionado a cada dois dias até que todas as células do controle negativo (as quais não foi adicionado o DNA) tenham morrido.

#### **4.6 – Diferenciação de K562 em células eritrocitárias**

Células com 90% de viabilidade e 70-90% de confluência em proliferação por 1 semana após a transfecção, foram utilizadas para a diferenciação. A diferenciação das células foi acompanhada durante 4 dias (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>), além do dia anterior à indução de diferenciação (D<sub>0</sub>). Foram utilizados frascos de 50 mL contendo 10ml de cultura celular à 2x10<sup>6</sup> células/ml para cada dia das seguintes culturas:

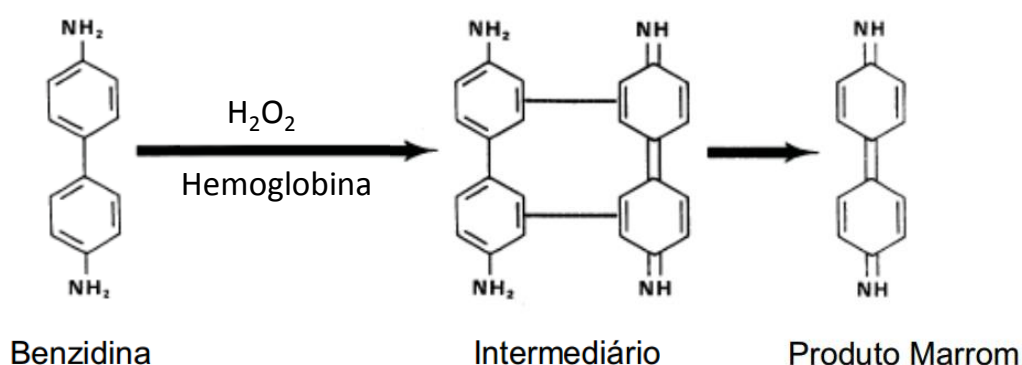
- a) Células K562 não transfectadas e não diferenciadas (controle negativo);
- b) Células K562 não transfectadas diferenciadas (controle positivo);
- c) Células K562 transfectadas com shRNA\_controle diferenciadas;
- d) Células K562 transfectadas com shRNA\_PRDX2 diferenciadas.

Em cada frasco de cultura a ser diferenciada, foi adicionado 50µM de hemina e 100µM de hidroxíureia para iniciar a diferenciação celular. A cada dia, o material de cada frasco foi coletado e centrifugado, o precipitado celular foi ressuspensionado em 1 ml de PBS, do qual 100µl foi utilizado para corar as células a fim de identificar a expressão de hemoglobina e os 900µl restantes foram centrifugados novamente e ressuspensionados em 1ml de TRIzol para posterior extração de RNA e análise de expressão gênica.

Para a análise de expressão proteica, a diferenciação foi repetida e dessa o material coletado foi utilizado para a extração de proteínas totais.

*Determinação de expressão de hemoglobina utilizando o método de benzidina*

Hemina e hidroxiuréia, tem sido estudados como dois agentes responsáveis pela diferenciação eritróide em células K562. Eles exercem grande efeito sobre a maturação de células K562 e promovem a síntese das hemoglobinas fetal e embrionária. Para determinação da expressão de hemoglobinas, foi utilizado o método colorimétrico de benzidina [94]. Esse método é amplamente utilizado na literatura para detectar hemoglobina em amostras. O método de benzidina baseia-se na catálise da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela hemoglobina presente na amostra. O oxigênio formado oxida a benzidina, alterando sua estrutura fazendo com que fique com coloração marrom (**Figura 8**).



**Figura 8** – Estrutura molecular do reagente benzidina e seu produto oxidado marrom (Adaptados de [95]).

As células em solução foram centrifugadas e o precipitado celular foi ressuspendido em 1ml de PBS. Em um tubo eppendorf foi adicionado 100µl da solução contendo as células, 10µl de benzidina e 50µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os eppendorfs foram incubados no escuro à temperatura ambiente por 25 minutos. A solução foi pipetada em uma lâmina, adicionada uma lamínula sobre a gota e observado imediatamente ao microscópio de luz. Células diferenciadas têm a capacidade de expressar hemoglobina a qual é corada pelo corante benzidina e aparecem com uma coloração marrom escura. Essas células são comparadas às células não diferenciadas que aparecem com uma cor transparente, muitas vezes levemente marrom, por conta da expressão basal de hemoglobina em células não diferenciadas.

#### 4.7 – Extração de RNA

Para obtenção do RNA de células K562 utilizou-se o método de extração a partir do reagente TRIzol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente as amostras contendo células K562 ressuspensas em TRIzol® foram descongeladas no gelo, e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 200µL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e a mistura foi agitada por 15 segundos, e então foi realizada nova incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500µL de isopropanol gelado. Foi adicionado 500µL de isopropanol, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido pela centrifugação por 10 minutos a 15.000g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1ml de etanol 75% gelado, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 15.000g à 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, ressuspendido em água livre de RNase e incubado a 42°C por 10 minutos.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e avaliadas quanto à integridade em gel desnaturante de agarose. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

#### 4.8 – Síntese de DNA complementar (cDNA)

Primeiramente, a fim de retirar possíveis contaminações com moléculas de DNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNase seguindo as orientações do fabricante. Para o tratamento foi utilizado 1,0µg de RNA, foi adicionado 1,0µL da enzima *DNase I* (1 u/µL) (Fermentas, ThermoScientific), 1,0µL *DNase I reaction buffer* com MgCl<sub>2</sub> 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, MgCl<sub>2</sub> 20mM, KCl 500mM) e a reação foi completada para um volume final de 10µL.

A reação foi incubada por 30 minutos à 37°C e foi paralisada com a adição de 1,0µL de EDTA 50mM seguida pela incubação por 10 minutos a 65°C.

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA tratado com *DNase I*, através da reação de transcrição reversa, usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse*

*Transcription Kits* (Applied Biosystems) seguindo as orientações do fabricante. A cada amostra de RNA tratado, foi adicionado 2,0 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTP Mix (100 mM de cada), 2,0 µl de 10X RT Random *Primers*, 1,0 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL), 1,0 µl de inibidor de RNase completando com 3,2 µl de H<sub>2</sub>O livre de nuclease.

A síntese de cDNA foi realizada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e paralisada através de incubação a 85°C por 5 minutos.

#### 4.9 – Real-Time PCR (qRT-PCR)

A técnica é baseada no monitoramento óptico da fluorescência do produto de PCR ciclo a ciclo e pode ser usada na quantificação da expressão gênica. Alíquotas de cDNA foram usadas como molde da PCR. Foram utilizados *primers* construídos especificamente para os genes de interesse (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX4*, *PRDX5*, *PRDX6*, *SOD*, *CATALASE*, *GPx*, *TRX*, *TRXR1* e *SRX*), e como controle, *primers* para amplificação do gene *β-ACTINA* (BAC) que foi testado anteriormente quanto a sua aplicação como endógeno, não mostrando variação entre as condições testadas. A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) onde utilizamos o reagente SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os *primers* foram desenhados através do programa "Primer Express" (Applied Biosystems). A quantificação dos resultados foi realizada conforme descrição do fabricante e se baseia na derivação da fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Após a síntese, realizamos a padronização da concentração de cada *primer* utilizando uma amostra de cDNA de células K562 como molde. Para tal, utilizamos as concentrações 100, 150 e 300 nM de *primers forward* e *reverse* para verificar a combinação de concentração que apresentasse a maior amplificação (maior fluorescência) e menor formação de dímeros utilizando a menor concentração de *primers* possível. Sabendo-se a melhor concentração dos *primers* partimos para a elaboração da curva de eficiência da reação, foram realizadas diluições seriadas partindo das amostras de cDNA utilizando as mesmas concentrações de *primers* determinadas na padronização dos *primers*. Como a amplificação é exponencial, deve haver uma diferença de um Ct na amplificação de cada uma das diluições de 1:2 por exemplo, e ao traçarmos uma reta relacionando a potência da diluição e o Ct obtemos a curva da

eficiência do *primer*, a qual deve apresentar o valor de R2 mais próximo possível de 1 (100%).

Posteriormente foram avaliadas as expressões gênicas em células silenciadas e comparadas a células não silenciadas para os genes de interesse. Foram considerados como inibidas as culturas que apresentaram uma diminuição de pelo menos 70% da produção de RNA mensageiro.

#### **4.10 - Western blotting**

A fim de avaliar a expressão proteica das culturas K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 foi realizada a técnica de Western Blotting para verificar se existe correlação entre os níveis de RNA mensageiro e a expressão das proteínas.

##### *Extração e quantificação de proteínas*

As proteínas totais foram extraídas do pellet das culturas celulares K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 utilizando o reagente Nonidet P-40 (NP-40). Os pellets das culturas foram previamente congelados em freezer -80°C na presença do inibidor de protease 1X (*cOmplete tablets mini edta-free easypack*).

Para a extração das proteínas totais, o pellet celular foi descongelado no gelo, e homogeneizado. Foi acrescentado 300µl de solução de lise (NP-40 1%, NaCl 150mM e TRIS-HCl 50mM pH 8,0), o extrato celular foi agitado, e incubado no gelo por 30 minutos para permitir a ação detergente do reagente NP-40. Após o tempo de incubação o extrato foi centrifugado (20 minutos/12.000g/4°C) a fim de separar a porção insolúvel da porção solúvel contendo as proteínas totais.

As proteínas foram quantificadas no espectrofotômetro iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio- Rad) de acordo com o método de Lowry [96]. Após estabelecer a mesma concentração de proteínas para todas as amostras (645µg/poço), foram adicionados a elas tampão desnaturante *Laemmli* (100 mM tris-HCl pH6.8, 4% p/v SDS, 20% v/v glicerol, 0,2% de azul de bromofenol, 1M de DTT) e estas foram desnaturadas em banho-maria a 100°C por 5 min.

### *Eletroforese SDS-PAGE*

As proteínas foram separadas através de eletroforese em gel SDS-PAGE expostas a condições desnaturantes e redutoras. Os géis de poliacrilamida utilizados na eletroforese possuíam 4 % (gel de entrada) e 12% (gel de separação), com 1,5 mm de espessura. Foram adicionados 645µg de proteína por poço.

A corrida foi realizada a 150 volts, em um tempo de aproximadamente 1 hora e 30 min. (*The Mini Trans-Blot cell* - Bio- Rad). O tampão de corrida utilizado era composto por Trisma base (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1g%).

Ao gel de eletroforese foi adicionado o marcador de peso molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific), a fim de possibilitar a identificação por peso molecular das proteínas de interesse.

### *Transferência gel-membrana*

Após a corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% v/v metanol, SDS 0,1%) por 20 minutos, a membrana e os filtros de transferência também foram incubados no tampão citado acima por 5 minutos.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio- Rad) a 100 Volts durante 1 hora e meia pelo método submerso (*Mini Trans-Blot® Cell*– Bio- Rad). Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 4 horas com 9% p/v de leite desnatado em TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, pH=8, contendo 0,1% v/v de Tween 20). Ao fim do bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T por 4X de 5 min. Cada.

### *Incubação com o anticorpo primário e secundário*

Após a lavagem, a membrana foi incubada com os anticorpos primários (**Tabela 2**) a 4°C, sob agitação, overnight. Após incubação com anticorpo primário a membrana foi novamente lavada com TBS-T por 4X de 5 min. cada e incubada com anticorpo secundário conjugado com a enzima HRP (**Tabela 2**) por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação. Todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão TBS-T.

Após incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada novamente utilizando o tampão TBS-T por 4X de 5 min. cada.

### Revelação da membrana

A membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent - GE Healthcare ) o qual contém Luminol e Peróxido de hidrogênio. A enzima HRP reage com o peróxido de hidrogênio liberando O<sub>2</sub> que oxida o luminol liberando energia em forma de fóton que pode ser detectada através de um aparelho detector quimioluminescente. As bandas foram visualizadas e fotografadas usando o aparelho ChemiDoc da Bio-Rad, por curtos intervalos de tempo para obtenção de uma imagem adequada.

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados na técnica de Western Blotting.

Anticorpo	Tipo	Reatividade	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor
<i>Primários</i>					
Anti- PRDX1	Monoclonal	Human	Mouse	1: 1.000	Abnova
Anti- PRDX2	Monoclonal	Human	Mouse	1: 1.000	Abnova
Anti- PRDX3	Monoclonal	Human	Mouse	1: 1.000	Abnova
Anti- PRDX4	Monoclonal	Human	Mouse	1: 1.000	Abnova
Anti- PRDX5	Monoclonal	Human	Mouse	1: 1.000	Abnova
Anti- PRDX6	Monoclonal	Human	Mouse	1: 1.000	Abnova
Anti- GAPDH	Policlonal	Human, Dog, mouse	Goat	1: 4.500	Biorbyt
<i>Secundários</i>					
Goat anti-Mouse IgG (HRP)	Policlonal	Mouse	Goat	1: 20.000	Biorbyt
Rabbit anti-Goat IgG (HRP)	Policlonal	Goat	Rabbit	1: 20.000	Biorbyt

Para as análises dos dados foi utilizado o programa ImageJ (*National Institutes of Health, Maryland, EUA*), o qual gera valores numéricos a partir dos pixels da imagem de cada banda proteica. O programa gera picos que representam as regiões de maior densidade óptica e utiliza equações integrais simples para transformar os picos em valores numéricos. Os valores obtidos foram utilizados para normalizar cada amostra utilizando o GAPDH como normalizador e então a amostra K562

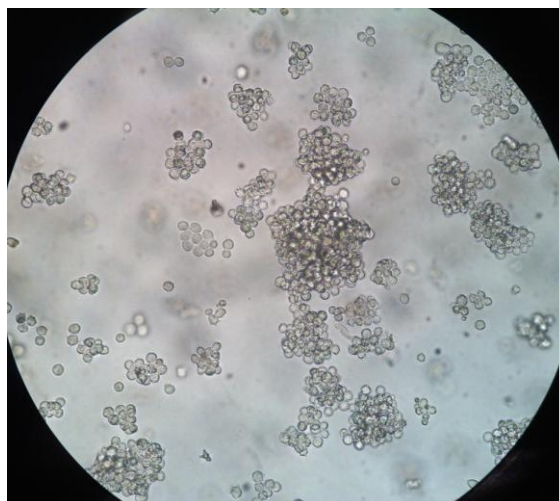


shRNA\_controle do dia 0 de diferenciação foi usada como controle para analisar o aumento ou diminuição da expressão da proteína de interesse em K562 shRNA\_PRDX2, sendo que valores acima de 1 significam aumento na expressão e valores abaixo de 1 significam diminuição na expressão.

## 5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Padronização do cultivo celular de K562

Após o estabelecimento da condição ideal de proliferação celular, as células K562 se apresentaram em fase exponencial de crescimento celular em uma semana. Em fase exponencial, as células K562 dobram de número a cada 24 horas e apresentam-se como aglomerados em formato de “cachos de uva”, como pode ser observado na **figura 9**.



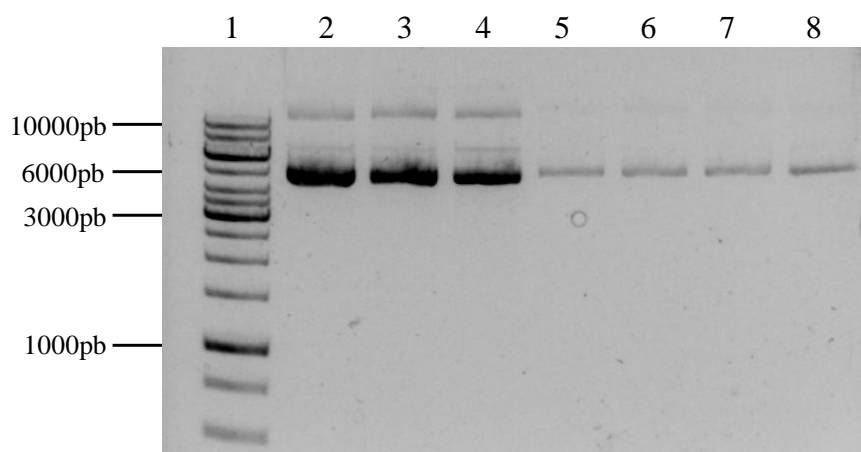
**Figura 9 – Fotomicroscopia do acompanhamento da proliferação de células K562.** Proliferação celular de K562 em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, no sétimo dia de cultivo celular. Podemos observar a formação de aglomerados celulares “cachos” (Aumento de 20X).

Após 1 semana conseguimos uma quantidade de aproximadamente  $2-5 \times 10^5$  células/ml com um volume final de cerca de 50ml. As células apresentaram cerca de 90% de viabilidade e 50-90% de confluência, suficiente para início de experimento de transfecção celular.

### 5.2 - Mini preparação plasmidial dos vetores utilizados para a transfecção

A integridade dos plasmídeos extraídos foi verificada através de gel de agarose 1% e, como pode ser visualizado na **figura 10**, verificam-se estruturas de

aproximadamente 7000pb. Os plasmídeos foram estocados a -20°C para posterior utilização.

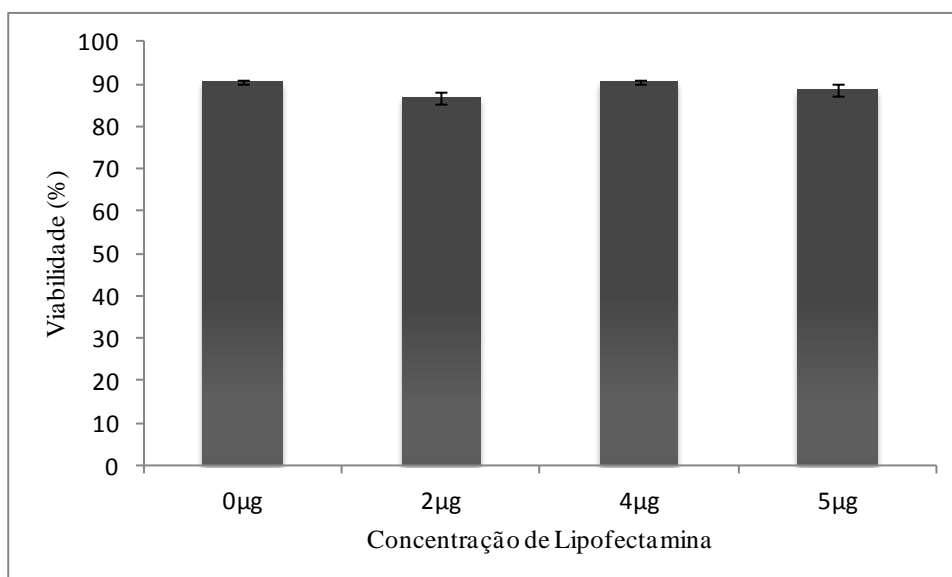


**Figura 10 – Minipreparação plasmidial de cultura celular contendo o plasmídeo pLKO.1 puro shRNA\_controle e shRNA\_PRDX2.** Gel de agarose 1%. **1** - Marcador molecular 1kb Gene Ruler; **2, 3 e 4** – Minipreparação plasmidial contendo shRNA\_controle; **5, 6, 7 e 8** – Minipreparação plasmidial contendo shRNA\_PRDX2.

### 5.3 – Transfecção de células K562 utilizando o reagente lipofectamina

Alguns dos fatores que influenciam na eficiência da transfecção são: A concentração de fatores que podem se tornar tóxicos ou inibir a reação como o DNA e a lipofectamina, origem e tipo celular, tempo de proliferação, número e confluência das células, degradação do DNA no núcleo por endonucleases, entre outros fatores.

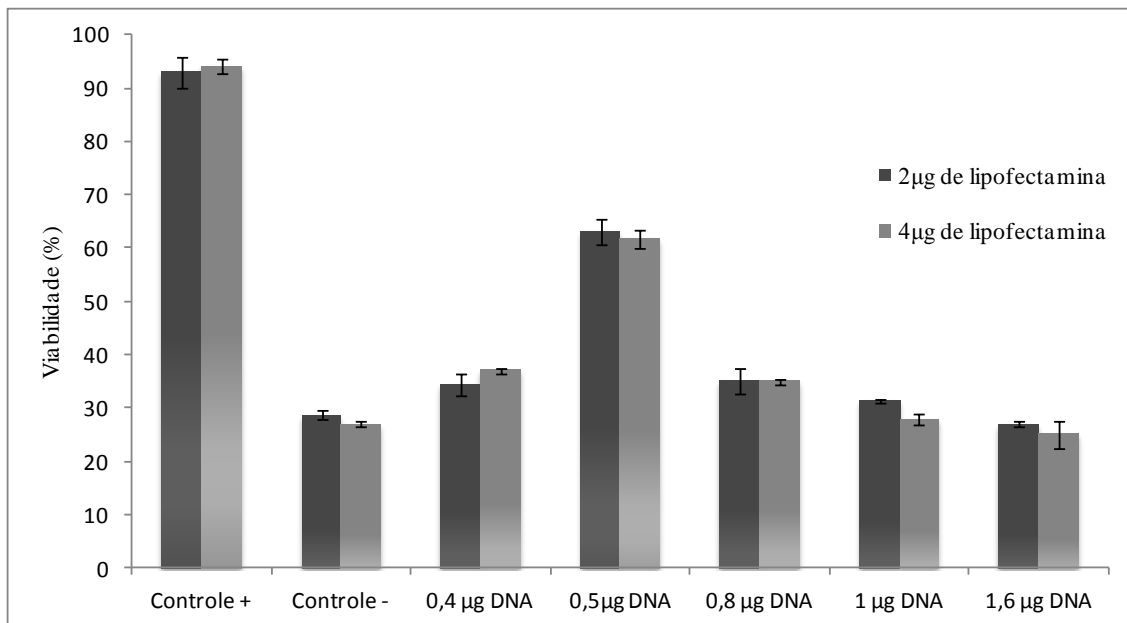
A fim de verificar a possível toxicidade da lipofectamina para as células a serem transfectadas, foi realizado um teste onde as células K562 em fase ótima de proliferação foram expostas a diferentes concentrações de lipofectamina (sugeridas pelo fabricante). Os valores testados foram 0, 2, 4 e 5µg de lipofectamina (1µg/µl) diluídos em um volume final de 50µl de meio de cultura Opti-MEN e adicionados em  $2 \times 10^5$  células em poços de 500µl numa placa de 24 poços. Após 6 dias, foi verificada a viabilidade das células e se estas mantinham a proliferação como as que não haviam sido expostas a lipofectamina (**Figura 11**).



**Figura 11 - Viabilidade de células K562 expostas a 0, 2, 4 e 5µg de lipofectamina após 6 dias de exposição.**

Assim como as células que não foram expostas a lipofectamina (0µg), a viabilidade das células expostas a 2, 4 e 5µg de lipofectamina mantinham sua viabilidade acima de 80% após 6 dias de exposição. Dessa forma consideramos que nenhum dos valores sugeridos pelo fabricante foram tóxicos para a célula K562 a ser transfectada.

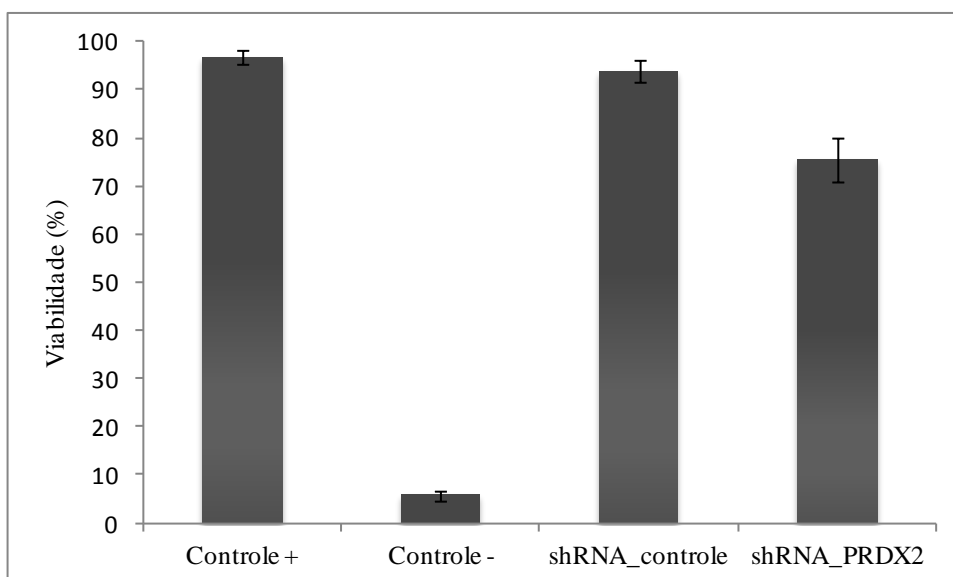
Após o teste de toxicidade do reagente lipofectamina, partimos para a padronização de reação de transfecção, inicialmente utilizando o plasmídeo contendo shRNA\_controle. A reação foi realizada em células K562 seguindo as orientações do fabricante para esse tipo celular, foi utilizado 2 e 4µg de lipofectamina combinada com diferentes concentrações de DNA (0.4, 0.5, 0.8, 1 e 1.6µg). Como controle positivo foi utilizada a cultura K562 não transfectada e sem tratamento com antibiótico puromicina, já o controle negativo, utilizamos células K562 não transfectadas tratadas com antibiótico puromicina (**Figura 12**).



**Figura 12 - Viabilidade de células K562 para o teste de transfecção.** Teste de transfecção utilizando 2 e 4 µg de lipofectamina complexadas com 0,4, 0,5, 0,8, 1 e 1,6 µg de DNA. Viabilidade das células transfectadas foi verificada após 1 semana e comparadas às culturas controle positivo e negativo.

A partir da **Figura 12** podemos identificar que utilizando 0,5 µg de DNA e 2 ou 4 µg de lipofectamina, as células apresentam uma viabilidade de cerca de 60% e formação de “aglomerados celulares” mostrando que estavam proliferando eficientemente, enquanto que utilizando as demais concentrações testadas, as células apresentavam viabilidade abaixo de 40%.

Uma vez padronizada a condição ideal para a transfecção, passamos a realizar o experimento em um volume maior de cultura celular (10ml) e além do plasmídeo contendo shRNA\_controle passamos a fazer os experimentos utilizando o plasmídeo contendo o shRNA\_PRDX2. A viabilidade foi acompanhada durante 10 dias e o resultado é apresentado na **Figura 13**.



**Figura 13 - Viabilidade de células K562 após 10 dias do experimento de transfecção.** O controle positivo representa as células não transfectadas e sem tratamento com puromicina; O controle negativo representa as células não transfectadas mas tratadas com puromicina. As células transfectadas estão representadas como shRNA\_controle e shRNA\_PRDX2.

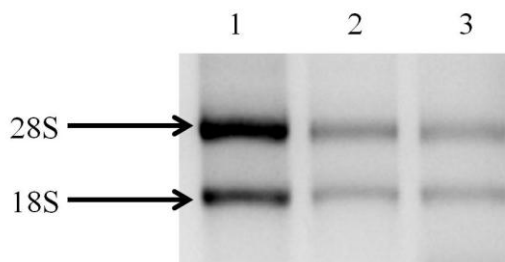
Como visto na **Figura 13**, após 10 dias de proliferação celular e tratamento com puromicina, foi possível a obtenção de culturas transfectadas apresentando mais de 80% de viabilidade. Cultura de células K562 transfectadas com shRNA\_controle obtiveram uma viabilidade 93%, enquanto que células transfectadas com shRNA\_PRDX2 obtiveram uma viabilidade 75%, enquanto que no controle negativo da reação as células apresentaram-se na grande maioria mortas. Isso demonstra que o experimento de transfecção foi bem sucedido, os plasmídeos contendo o shRNA\_controle e shRNA\_PRDX2 estão internalizados conferindo resistência às células.

Apesar de sabermos que os plasmídeos estão inseridos de forma desejada conferindo resistência às células transfectadas, não é garantido que os shRNAs estejam sendo expressos e encontrando seus respectivos alvos de forma eficiente. Dessa forma, foi realizada a análise da expressão gênica utilizando qRT-PCR das células não transfectadas, transfectadas com shRNA\_controle e shRNA\_PRDX2, utilizando *primers* de *PRDX2*.

#### 5.4 – Extração de RNA e síntese de cDNA

Foi realizada a extração do RNA das amostras de célula K562, K562 transfectadas com shRNA\_controle e transfectadas com shRNA\_PRDX2. Pode-se

observar que as amostras de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S (**figura 14**).



**Figura 14** - Gel desnaturante de agarose à 1,2%, com amostras de RNA de células K562. 1) Extração de RNA de células K562; 2) Extração de RNA de células K562 shRNA\_controle; 3) Extração de RNA de células K562 shRNA\_PRDX2.

Após a extração do RNA, as amostras foram tratadas com DNase e a síntese do cDNA foi realizada através da reação de transcrição reversa. A fim de verificar a eficiência da reação da transcriptase reversa foi realizada uma reação de qRT-PCR utilizando as amostras de cDNA e *primers* do gene endógeno BAC, o qual verificou que todas as amostras estavam amplificando eficientemente.

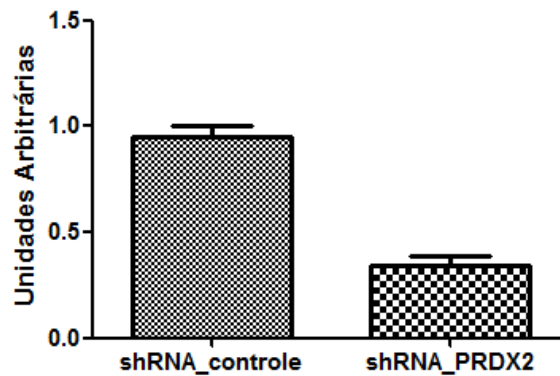
Adicionalmente foi realizada a padronização da concentração dos *primers* e o teste de eficiência das reações de qRT-PCR, as quais apresentaram entre 95-105% de eficiência. Os detalhes estão apresentados no **Anexo 3**.

### 5.5 – Análise de expressão de *PRDX2* através de qRT- PCR

A fim de avaliar o nível de expressão gênica de *PRDX2* em células K562, K562 transfectada com shRNA\_controle e shRNA\_PRDX2 foram realizadas análises de qRT-PCR dessas culturas utilizando os *primers* de *PRDX2* e como controle endógeno foram utilizados *primers* de BAC nas concentrações pré-determinadas e apresentadas no **Anexo 3**.

As amostras foram amplificadas em duplicatas e em todos os ensaios foram feitos controles negativo para verificar possíveis contaminações. A quantificação dos resultados foi realizada utilizando a derivação da fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Como pode ser visto na **Figura 15**, foi possível a obtenção de uma inibição de 70% da expressão de *PRDX2*

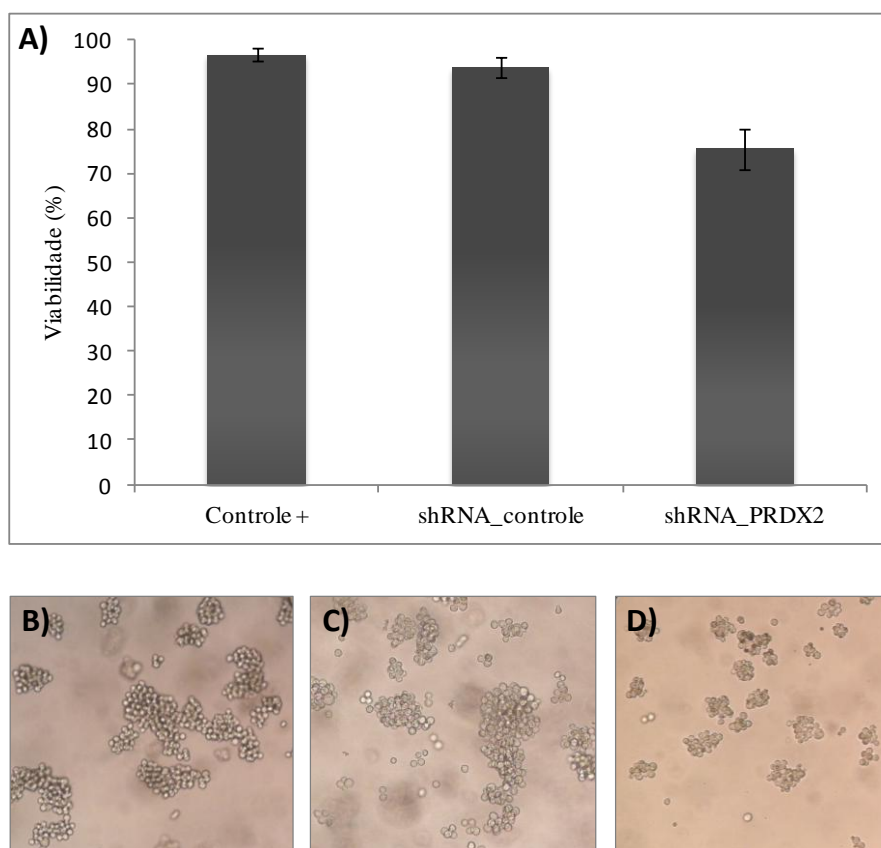
em células transfectadas com shRNA\_PRDX2 comparadas as células transfectadas com shRNA\_controle.



**Figura 15** - Análise da expressão gênica da PRDX2 em K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2. As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism.

Podemos constatar que com uma inibição de 70% na expressão de *PRDX2* em células K562 transfectadas com shRNA\_PRDX2, já podemos observar uma significativa mudança na proliferação e viabilidade celular (**Figura 16**).



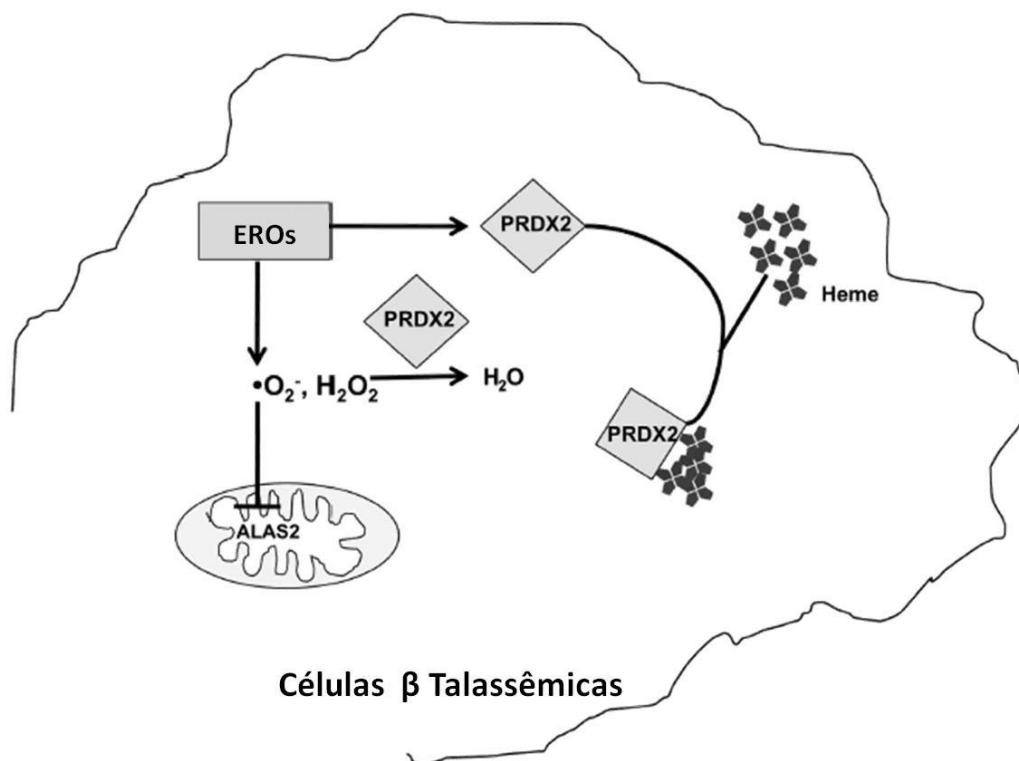


**Figura 16 – Viabilidade, número de células e formação de aglomerados de células K562.** **A)** Viabilidade de células K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2; **B)** Formação de aglomerados de células K562 não transfectadas ( $9 \times 10^5$  células/ml); **C)** Formação de aglomerados de células K562 transfectadas com shRNA\_controle ( $8,5 \times 10^5$  células/ml); e **D)** Diminuição da formação de aglomerados de células K562 transfectadas com shRNA\_PRDX2 ( $4,3 \times 10^5$  células/ml) (aumento de 20X).

Após 2 semanas de proliferação em condições idênticas de células K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2, as células transfectadas com shRNA\_PRDX2 apresentam uma proliferação mais lenta e menor viabilidade (**Figura 16 A**), demonstrada por um número baixo de células ( $4,3 \times 10^5$  células/ml) (**Figura 16 D**) comparado ao número de células de K562 não transfectadas e K562 transfectada com shRNA\_controle ( $9$  e  $8,5 \times 10^5$  células/ml respectivamente) (**Figura 16 B e C**). Além disso, essa diferença pode ser observada pela diminuição da formação de aglomerados celulares nas células com *PRDX2* inibida (**Figura 16 D**). Esses fatos já foram observados anteriormente [61] e demonstram a importância da *PRDX2* na proteção antioxidante nas células K562 mesmo antes da diferenciação, fato que nos incentiva a investigar melhor o papel da *PRDX2* e das outras *PRDXs* nesse tipo celular.

Já foi demonstrado que em vários tipos celulares, *PRDX2* é induzida pelo estresse oxidativo e que a superexpressão de *PRDX2* protege células contra o dano oxidativo [97,98].

Estudos realizados recentemente [61] comprovaram um nível aumentado de PRDX2 mRNA/Proteína durante a eritropoiese em células precursoras  $\beta$ -talassemicas. Isso sugere uma proteção de PRDX2 nesse tipo celular, que é caracterizado por um ambiente altamente oxidativo. De fato, quando precursores eritróides normais são expostos a estresse oxidativo, é observada a superexpressão de PRDX2 e consequente recuperação celular [61]. Esses fatos suportam um papel protetor de células eritrocitárias contra danos oxidativos. Usando PRDX2 recombinante foi demonstrado que PRDX2 se liga especificamente ao grupo heme e diminui sua atividade peroxidase, adicionalmente a afinidade com o grupamento heme de PRDX2 é maior do que já reportado por outras Prxs. Esses achados sugerem que em células com altos níveis de EROs e acúmulo de heme, PRDX2 pode diminuir sua atividade peroxidase e passar a ter como alvo o grupo heme acumulado diminuindo os danos celulares causados por ambos os substratos (**Figura 17**) [61].

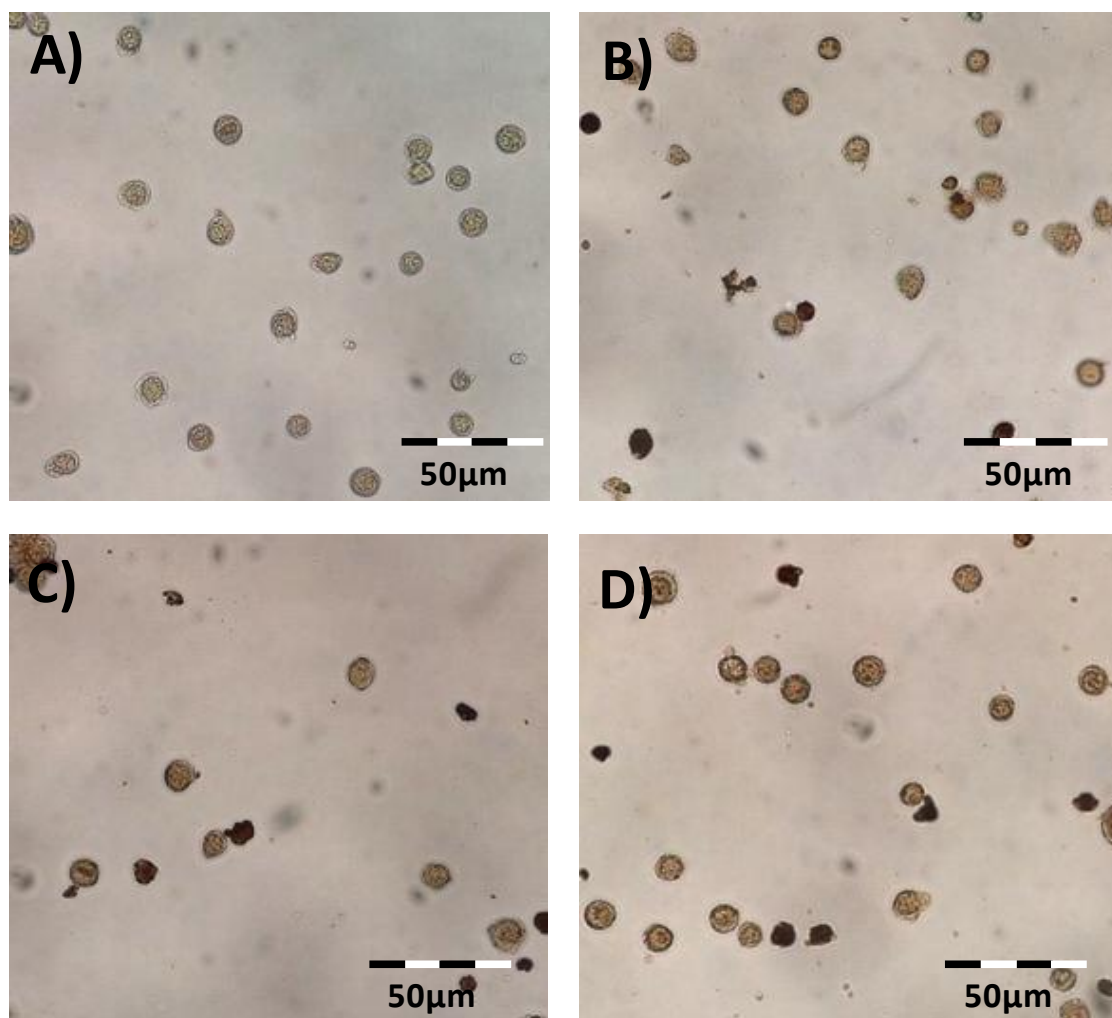


**Figura 17 – Mecanismo protetor de PRDX2 contra estresse oxidativo em eritrócito  $\beta$ -talassêmico.** No mecanismo proposto, PRDX2 além da atividade peroxidase contra EROs, se liga ao heme como mecanismo contra danos oxidativos causados pelo acúmulo de ferro em ambiente altamente oxidativo (Adaptado de [61]).

Esse segundo papel de PRDX2 na proteção contra danos oxidativos em células eritrocitárias  $\beta$ -Talasêmicas, nos incentiva a continuar investigando o papel das PRDXs nesse tipo celular uma vez que essas podem ter diferentes funções na proteção ao dano oxidativo.

## 5.6 – Diferenciação de células K562

A partir da obtenção de células transfectadas, realizamos a indução da diferenciação das células em células com características eritrocitárias. A diferenciação de K562 (**Figura 18B**), K562 shRNA\_controle (**Figura 18C**) e K562 shRNA\_PRDX2 (**Figura 18D**) foi acompanhada por 4 dias (D<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>), além do dia anterior à diferenciação (D<sub>0</sub>) e comparadas às células K562 não diferenciadas (**Figura 18A**).

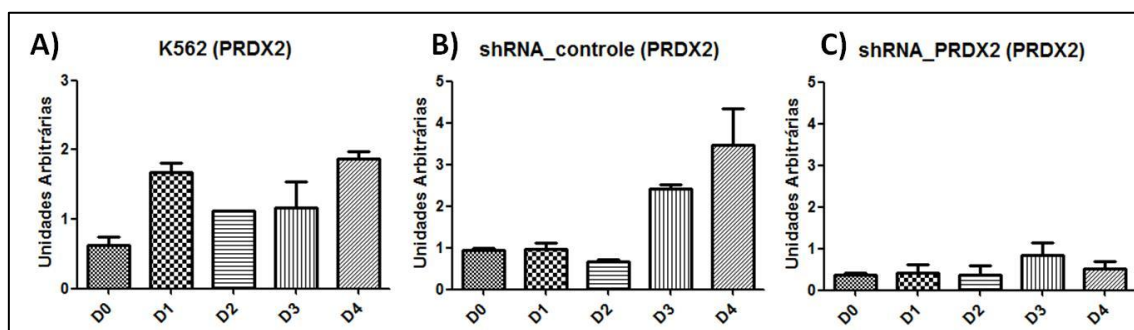


**Figura 18 – Diferenciação de células K562 utilizando hemina (HE) e hidroxauréia (HU) como indutores. A)** Fotomicroscopia de células K562 não diferenciada; **B)** Fotomicroscopia de células K562 após 4 dias de diferenciação com HU e HE; **C)** Fotomicroscopia de células K562 shRNA\_Controlé após 4 dias de diferenciação com HU e HE; **D)** Fotomicroscopia de células K562 shRNA\_PRDX2 após 4 dias de diferenciação com HU e HE (aumento de 20X).

Após 4 dias de diferenciação, foi observado que células K562 não transfectadas, K562 transfectadas com shRNA\_controle e shRNA\_PRDX2 diferenciadas apresentaram uma coloração marrom/marrom escura enquanto que as células K562 não diferenciadas apresentaram uma coloração levemente bege. Esse resultado demonstra que as células diferenciadas apresentaram-se positivas para a coloração de benzidina, demonstrando que houve a diferenciação e consequente expressão de hemoglobina.

Adicionalmente, as amostras de culturas K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 foram coletadas durante a diferenciação, o RNA dessas células foi extraído e então foi sintetizado o cDNA como já apresentado nos **Resultados e Discussão**. Foi realizada a análise da expressão gênica de *PRDX2* nas 3 culturas durante

os 4 dias de diferenciação (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>) além do dia anterior à diferenciação (D<sub>0</sub>) (**Figura 19**) utilizando o programa GraphPad Prism.



**Figura 19 - Análise da expressão gênica da PRDX2 durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores.** A) Expressão de PRDX2 durante a diferenciação de células K562; B) Expressão de PRDX2 durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e C) Expressão de PRDX2 durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. D<sub>0</sub>: Dia anterior à diferenciação; D<sub>1</sub>: Dia 1 da diferenciação; D<sub>2</sub>: Dia 2 da diferenciação; D<sub>3</sub>: Dia 3 da diferenciação; D<sub>4</sub>: Dia 4 da diferenciação.

A partir das análises de expressão gênica de PRDX2 nos 4 dias de diferenciação podemos observar um padrão nas células não inibidas (K562 e K562 shRNA\_controle) (**Figura 19A e B**), essas apresentam uma diminuição na expressão de PRDX2 no meio da diferenciação (D<sub>2</sub>) e um aumento progressivo da expressão no final da diferenciação (D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>). Enquanto a cultura inibida (K562 shRNA\_PRDX2) (**Figura 19C**) apresentou uma expressão de PRDX2 baixa todos os dias o que já era esperado com uma inibição de 70% de PRDX2.

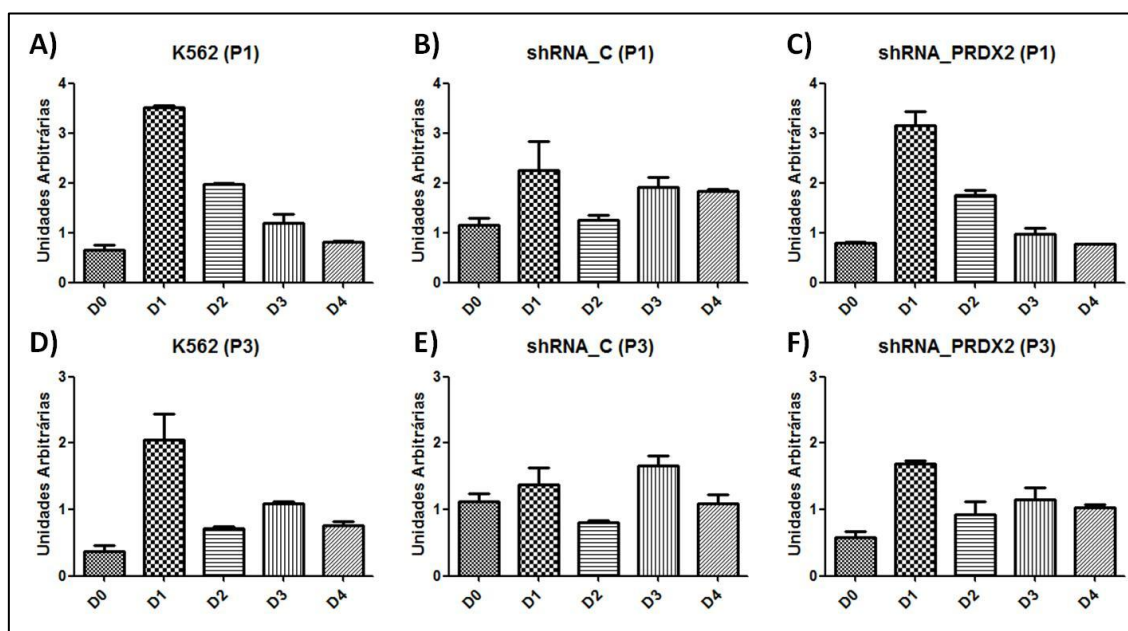
A diferenciação celular de K562 mediada por hemina induz a síntese de Ferritina H, uma proteína muito importante na manutenção e disponibilização do ferro para síntese do grupamento heme [99]. Foi descrito anteriormente que a indução de células K562 tem uma íntima relação com agentes oxidantes, os quais atuam na modulação da síntese de ferritina H, inclusive já foi descrito que a indução da diferenciação de K562 pode ser alcançada apenas pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Ferro, os quais geram espécies oxidantes [64,65,69]. Esses dados demonstram que a diferenciação de K562 mediada por hemina necessita da presença de agentes oxidantes e que a expressão de enzimas antioxidantes nessa etapa levaria na interrupção da diferenciação, fatos que podem explicar a baixa expressão de PRDX2 no dia 2 da diferenciação. Adicionalmente o aumento progressivo da sua expressão no final da diferenciação, pode ser explicado pela

necessidade da expressão de agentes que combatam os danos causados pela presença dos agentes oxidantes no começo da diferenciação.

### 5.7 – Análise da expressão de enzimas antioxidantes durante a diferenciação em células K562

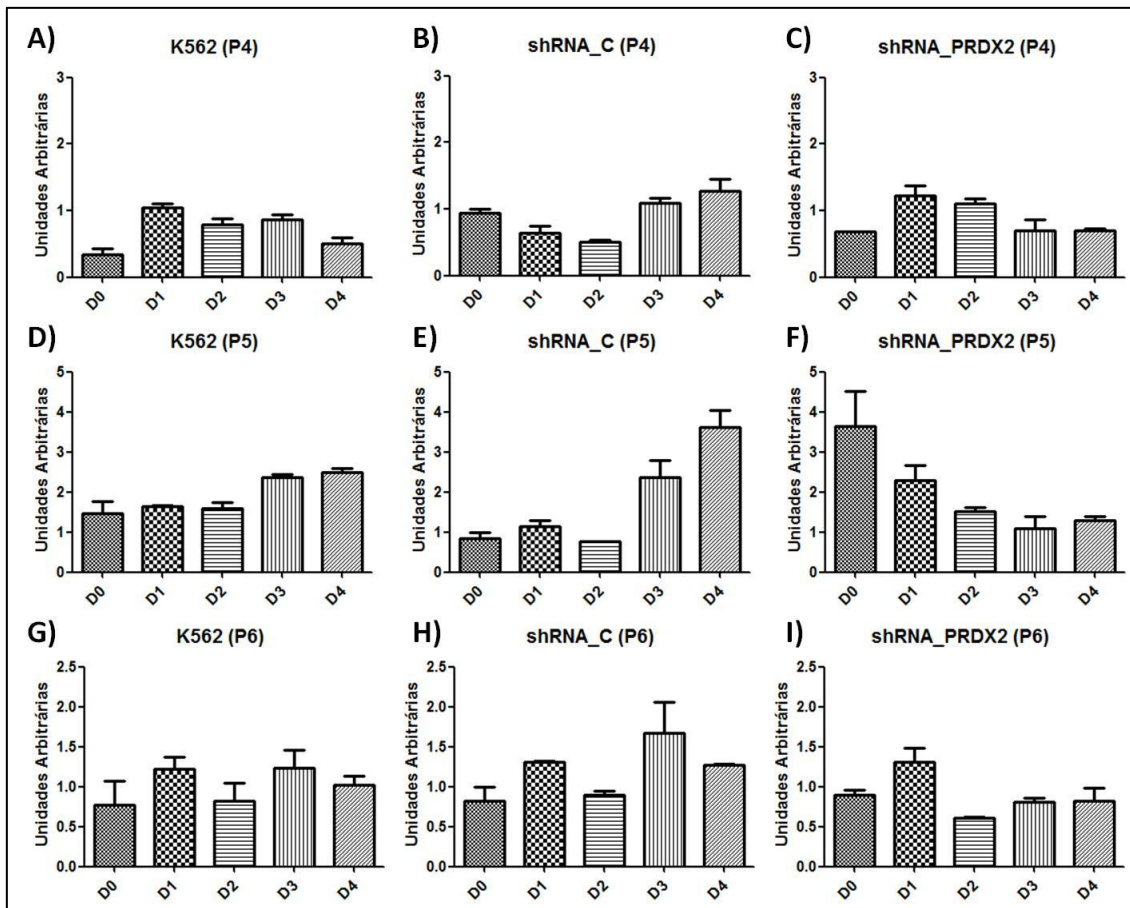
Adicionalmente foi realizada a análise utilizando o programa GraphPad Prism de expressão das outras *PRDXs* em células K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 a fim de verificar o padrão de expressão dessas enzimas em células K562 durante a diferenciação, além da identificação de possíveis alterações da expressão das demais *PRDXs* frente a inibição da expressão de *PRDX2*.

Foram realizadas as análises da expressão gênica de *PRDX1*, *PRDX3* (Figura 20), *PRDX4*, *PRDX5* e *PRDX6* (Figura 21) em células K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2.



**Figura 20 - Análise da expressão gênica de *PRDX1* e *PRDX3* durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxipurina como indutores.** A) Expressão de *PRDX1* durante a diferenciação de células K562; B) Expressão de *PRDX1* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e C) Expressão de *PRDX1* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. D) Expressão de *PRDX3* durante a diferenciação de células K562; E) Expressão de *PRDX3* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e F) Expressão de *PRDX3* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. D<sub>0</sub>: Dia anterior à diferenciação; D<sub>1</sub>: Dia 1 da diferenciação; D<sub>2</sub>: Dia 2 da diferenciação; D<sub>3</sub>: Dia 3 da diferenciação; D<sub>4</sub>: Dia 4 da diferenciação.

A partir dos resultados obtidos, é possível observar que a expressão de *PRDX1* (Figura 20 A, B e C) e *PRDX3* (Figura 21 D, E e F) não foi alterada pela inibição da expressão de *PRDX2*, uma vez que o padrão de expressão encontrado em células K562 se repete em células K562 shRNA\_PRDX2. Todas as culturas apresentaram uma expressão baixa no dia 0 de diferenciação, um aumento acentuado no dia 1 e uma expressão intermediária nos demais dias.

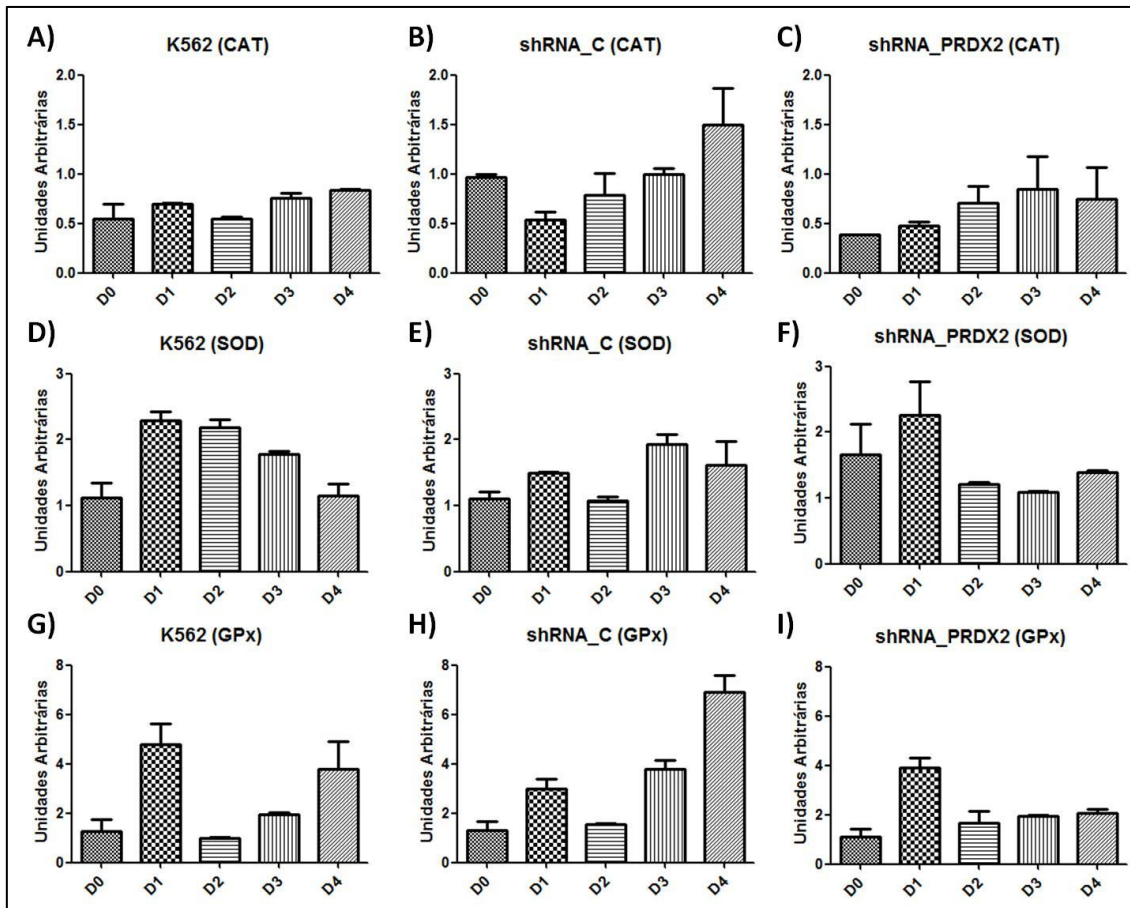


**Figura 21 - Análise da expressão gênica de *PRDX4*, *PRDX5* e *PRDX6* durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores. A)** Expressão de *PRDX4* durante a diferenciação de células K562; **B)** Expressão de *PRDX4* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e **C)** Expressão de *PRDX4* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. **D)** Expressão de *PRDX5* durante a diferenciação de células K562; **E)** Expressão de *PRDX5* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e **F)** Expressão de *PRDX5* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. **G)** Expressão de *PRDX6* durante a diferenciação de células K562; **H)** Expressão de *PRDX6* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e **I)** Expressão de *PRDX6* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. D<sub>0</sub>: Dia anterior à diferenciação; D<sub>1</sub>: Dia 1 da diferenciação; D<sub>2</sub>: Dia 2 da diferenciação; D<sub>3</sub>: Dia 3 da diferenciação; D<sub>4</sub>: Dia 4 da diferenciação.

A partir dos resultados obtidos, é possível observar que a expressão de *PRDX4* (**Figura 21 A, B e C**) e *PRDX6* (**Figura 21 G, H e I**) não foi alterada pela inibição da expressão de *PRDX2*, uma vez que o padrão de expressão encontrado em células K562 se repete em células K562 shRNA\_PRDX2. As culturas apresentaram uma expressão relativamente baixa e constante durante todos os dias da diferenciação. É possível observar que a expressão de *PRDX5* foi alterada pela inibição da expressão de *PRDX2*, uma vez que o padrão de expressão encontrado em células K562 se mostrou diferente em células K562 shRNA\_PRDX2. Em células não inibidas, a expressão de *PRDX5* vai aumentando gradualmente durante a diferenciação, enquanto que em células com expressão de *PRDX2* inibida, a expressão de *PRDX5* diminui gradativamente (**Figura 21 D, E e F**).

Adicionalmente, foi realizada a análise da expressão gênica de outras enzimas antioxidantes em células K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 que pode ser observada na **Figura 22**, além da análise da expressão gênica de enzimas relacionadas na redução e reciclagem de PRDX2, que pode ser observada na **Figura 23**.



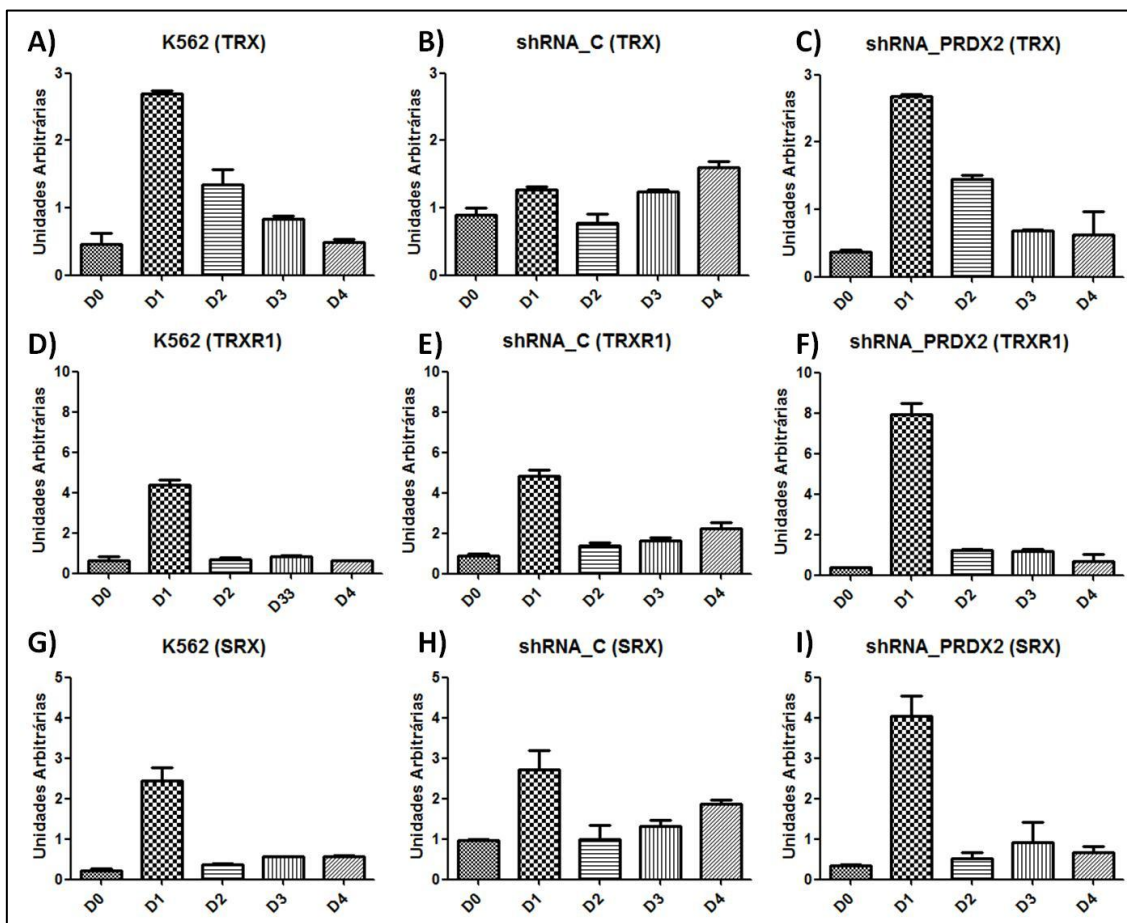


**Figura 22 - Análise da expressão gênica de *CATALASE*, *SOD* e *GPx* durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores.** A) Expressão de *CATALASE* durante a diferenciação de células K562; B) Expressão de *CATALASE* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e C) Expressão de *CATALASE* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. D) Expressão de *SOD* durante a diferenciação de células K562; E) Expressão de *SOD* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e F) Expressão de *SOD* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. G) Expressão de *GPx* durante a diferenciação de células K562; H) Expressão de *GPx* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e I) Expressão de *GPx* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. D<sub>0</sub>: Dia anterior à diferenciação; D<sub>1</sub>: Dia 1 da diferenciação; D<sub>2</sub>: Dia 2 da diferenciação; D<sub>3</sub>: Dia 3 da diferenciação; D<sub>4</sub>: Dia 4 da diferenciação.

A partir dos resultados é possível observar que a expressão de *CATALASE* (Figura 22A, B e C), *SOD* (Figura 22D, E e F) e *GPx* (Figura 22G, H e I) não foi alterada pela inibição da expressão de *PRDX2*, uma vez que o padrão de expressão encontrado em células K562 não inibidas se mostrou similar em células K562 transfectadas com shRNA\_PRDX2.

Podemos, entretanto observar que a expressão de *GPx* no final da diferenciação se mostrou diminuída em células K562 com inibição na expressão de *PRDX2* comparado às células não inibidas. Esse dado é inédito, uma vez que se esperava encontrar um aumento da síntese desse gene como mecanismo de compensar a falta de *PRDX2*. No entanto a repetição desses ensaios, bem como análises de Western Blotting

poderão confirmar o resultado e mostrar uma provável ligação entre a regulação da expressão dessas proteínas.



**Figura 23 - Análise da expressão gênica de *TRX*, *TRXR1* e *SRX* durante a diferenciação utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores. A)** Expressão de *TRX* durante a diferenciação de células K562; **B)** Expressão de *TRX* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e **C)** Expressão de *TRX* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. **D)** Expressão de *TRXR1* durante a diferenciação de células K562; **E)** Expressão de *TRXR1* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e **F)** Expressão de *TRXR1* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. **G)** Expressão de *SRX* durante a diferenciação de células K562; **H)** Expressão de *SRX* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_controle e **I)** Expressão de *SRX* durante a diferenciação de células K562 shRNA\_PRDX2. D<sub>0</sub>: Dia anterior à diferenciação; D<sub>1</sub>: Dia 1 da diferenciação; D<sub>2</sub>: Dia 2 da diferenciação; D<sub>3</sub>: Dia 3 da diferenciação; D<sub>4</sub>: Dia 4 da diferenciação.

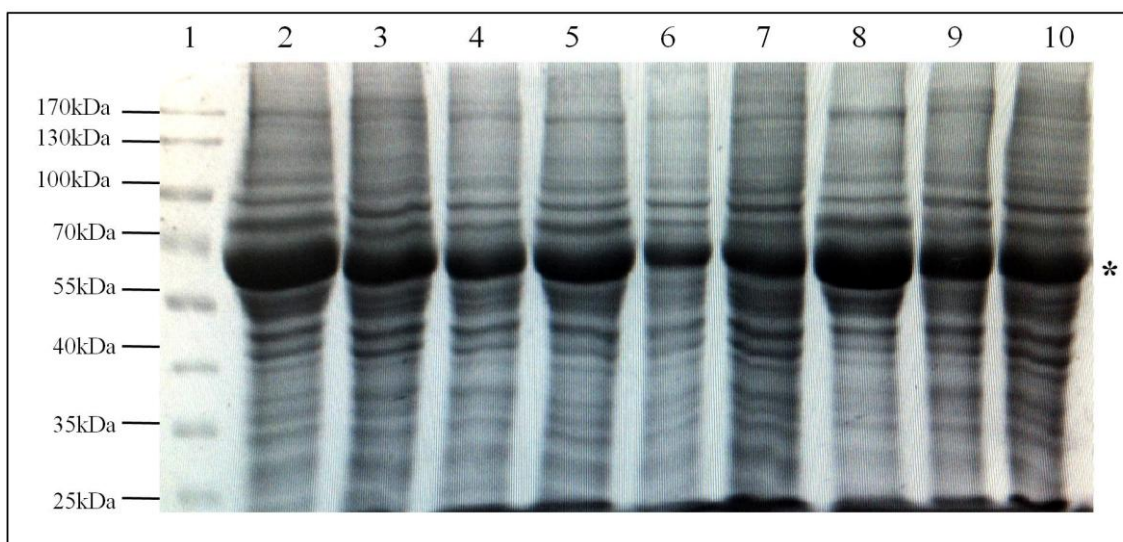
Quanto às enzimas relacionadas à redução e reciclagem de PRDX2, foi possível observar que o padrão da expressão de *TRX*, *TRXR1* e *SRX* aparentemente não é alterado pela inibição da expressão de *PRDX2*, uma vez que o padrão de expressão encontrado em células K562 se mostrou similar em células K562 shRNA\_PRDX2.

Entretanto, podemos observar que a expressão de *TRXR1* (**Figura 23D e E**) e *SRX* (**Figura 23G e H**) se apresenta alta no dia 1 da diferenciação de células não inibidas e que essa expressão é mais acentuada frente a inibição de *PRDX2* (**Figura 23F**

e I). Esse fato nos leva a supor que com a diminuição na expressão de *PRDX2*, ocorre um aumento na expressão de seus redutores fisiológicos a fim de aumentar os mecanismos de reciclagem de *PRDX2* e compensar sua falta na célula.

### 5.8 – Extração de proteínas de células K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2

Aproximadamente 10 ml das culturas celulares K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 contendo  $2 \times 10^6$  células/ml foram utilizadas para análise de expressão proteica. Inicialmente foi realizada a extração de proteínas totais, utilizando o tampão de lise NP-40. A fim de verificar a eficiência da extração, foi realizada uma eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, o qual foi corado utilizando o corante *coomassie*. As proteínas totais podem ser observadas na **Figura 24**, inclusive pode ser observada a presença de hemoglobina expressa pelas culturas, identificada pela banda de aproximadamente 65kDa (\*).

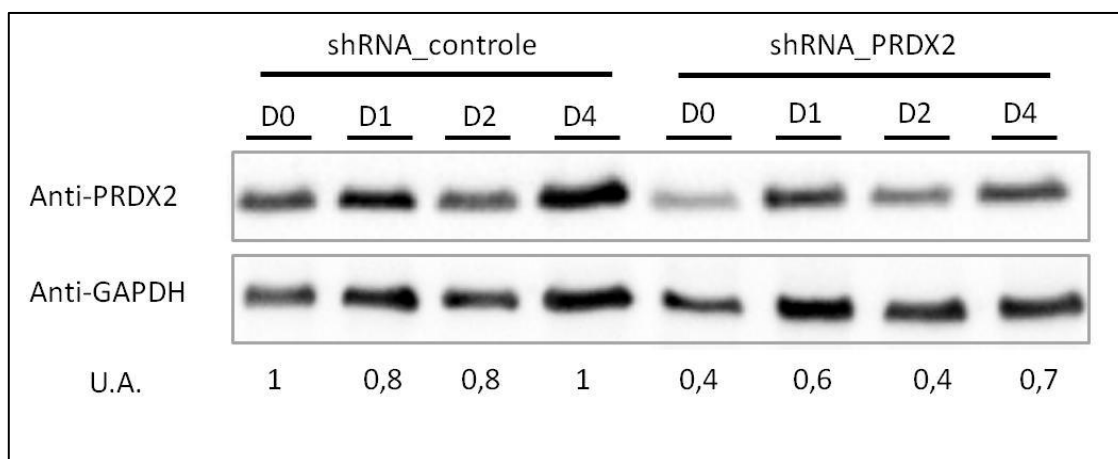


**Figura 24 – Extração proteica das culturas celulares K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2.** 1) Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2, 3 e 4) Extração proteica da cultura K562 nos dias 0, 2 e 4 da diferenciação; 5, 6 e 7) Extração proteica da cultura K562 shRNA\_controle nos dias 0, 2 e 4 da diferenciação; 8, 9 e 10) Extração proteica da cultura K562 shRNA\_PRDX2 nos dias 0, 2 e 4 da diferenciação. (\*) Banda correspondente à expressão de hemoglobina.

## 5.9 – Western Blotting

As proteínas totais foram quantificadas segundo o método de Lowry [96], sendo que cada extração rendeu em média 30µg/µl de proteína. Foi utilizado 645µg de proteína em cada poço para as análises.

Foi realizado então uma análise de western blotting da expressão de PRDX2 utilizando como controle endógeno GAPDH nas culturas celulares K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 (**Figura 25**).



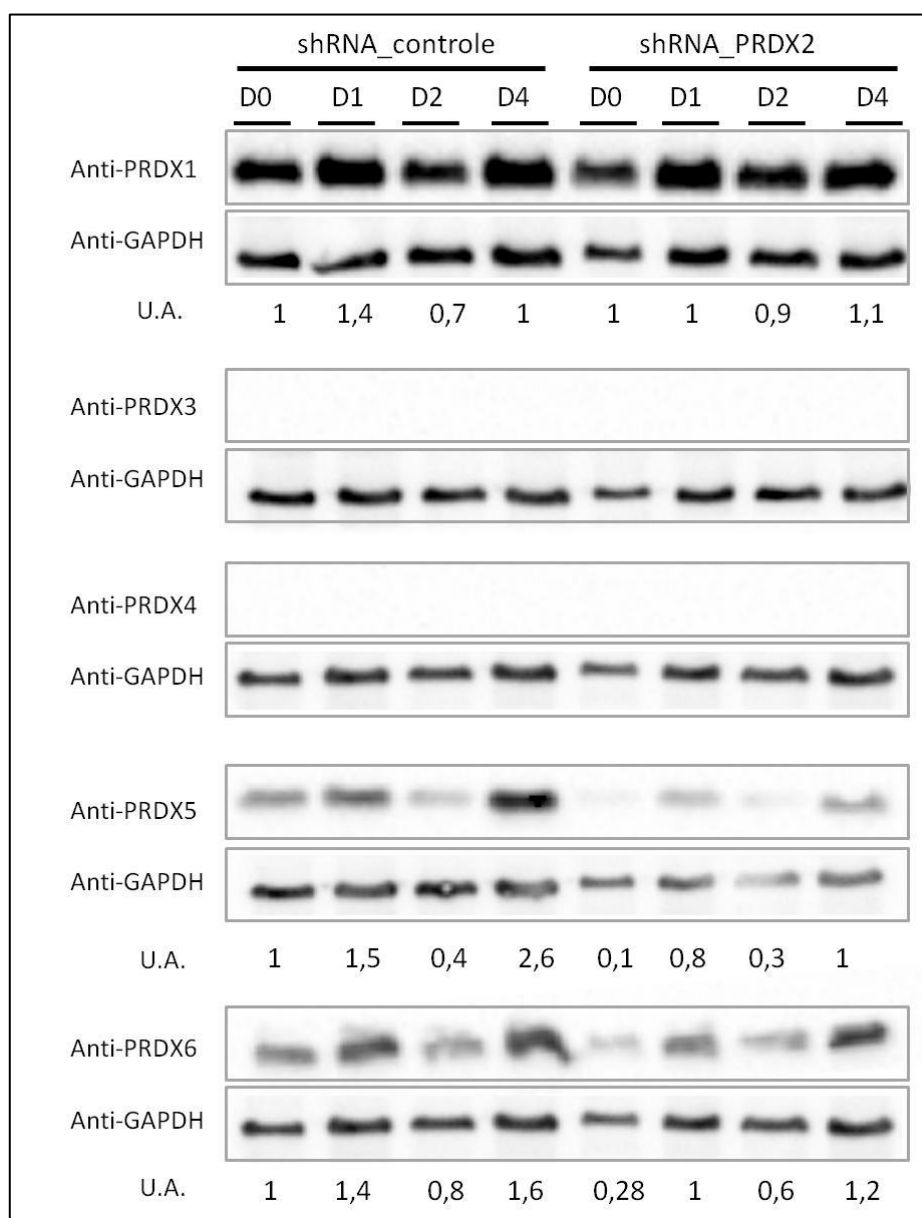
**Figura 25 – Western Blotting para detecção de PRDX2 usando GAPDH como normalizador endógeno.** Análise da expressão de PRDX2 em K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 durante a diferenciação. D<sub>0</sub>: Dia anterior à diferenciação; D<sub>1</sub>: Dia 1 da diferenciação; D<sub>2</sub>: Dia 2 da diferenciação; D<sub>4</sub>: Dia 4 da diferenciação. As análises foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como Unidades Arbitrárias (U.A.), onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostras controle (K562 shRNA\_controle) no dia 0 de diferenciação.

Como pode ser verificado pela **Figura 25**, as bandas referentes à expressão de PRDX2 em células K562 shRNA\_controle apresentam-se mais fortes em comparação às bandas de expressão de PRDX2 em K562 shRNA\_PRDX2. A partir das análises realizadas através do programa ImageJ, identificamos uma inibição de 60% da expressão de PRDX2 no dia 0 da diferenciação, sendo que nos dias 1 e 4 a sua expressão é aumentada, não chegando ao nível de expressão da amostra não inibida.

É possível observar também que a expressão de PRDX2 em células K562 shRNA\_controle apresentam uma diminuição na expressão no dia 2 e uma maior expressão nos dias 1 e 4 o que condiz com os dados obtidos nas análises de expressão gênica utilizando qRT-PCR. O mesmo padrão ocorre na expressão de PRDX2 em

células inibidas, entretanto essas apresentam uma expressão fortemente diminuída durante todos os dias por conta da inibição da expressão da PRDX2.

Adicionalmente foi realizada a análise de expressão das outras PRDXs em células K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 a fim de verificar o padrão de expressão dessas enzimas em células K562 durante a diferenciação, além da identificação de possíveis alterações da expressão das demais PRDXs frente a inibição da expressão de PRDX2 (**Figura 26**).



**Figura 26 – Western Blotting para detecção de PRDX1, PRDX3, PRDX4, PRDX5 e PRDX6 usando GAPDH como normalizador endógeno.** Análise da expressão de PRDXs em K562, K562 shRNA\_controle e K562 shRNA\_PRDX2 durante a diferenciação. D<sub>0</sub>: Dia anterior à diferenciação; D<sub>1</sub>: Dia 1da diferenciação; D<sub>2</sub>: Dia 2da diferenciação; D<sub>4</sub>: Dia 4da diferenciação. As análises foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como Unidades Arbitrárias (U.A.), onde

valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostras controle (K562 shRNA\_controle) no dia 0 de diferenciação.

Podemos observar pelos resultados obtidos que não foi possível a detecção de PRDX3 e PRDX4. A PRDX3 localiza-se na mitocôndria e parece estar envolvida na manutenção da massa mitocondrial e do potencial de membrana [100], assim provavelmente esta proteína tenha permanecido no extrato insolúvel retirado durante a lise celular. Experimentos avaliando a localização celular e sua presença na fração insolúvel serão realizados de modo a constatar esta hipótese. Adicionalmente, sabe-se que a PRDX4 é uma proteína que está localizada no retículo endoplasmático e que é secretada para o meio extracelular [101], esse pode ser um motivo importante para não termos detectado também sua expressão no meio intracelular.

Já as PRDX1 e PRDX6 são encontradas no citoplasma e por isso foram detectadas eficientemente. A PRDX5 é encontrada em abundância nos peroxissomos e na mitocôndria, além de ser encontrada na porção citoplasmática.

Podemos identificar um padrão comum na expressão de todas as proteínas analisadas, uma vez que ocorre uma expressão maior de todas as proteínas no dia 1 da diferenciação e uma menor expressão no dia 2 da diferenciação. A diferenciação celular induzida por hemina é mediada pela ação de agentes oxidantes, ou seja, para que ocorra a diferenciação é necessária a presença de EROs [65,99]. Dessa forma é esperada uma menor expressão dessas enzimas antioxidantes no dia 2, ponto no qual é iniciada a produção de hemoglobina [102] e que está diretamente relacionada com a diferenciação celular de K562. Um aumento na produção de enzimas antioxidantes nesta fase poderia interferir na correta diferenciação celular. Adicionalmente podemos identificar um leve aumento na expressão de todas as proteínas no último dia da diferenciação, esse fenômeno pode ser explicado pela necessidade de combater os danos oxidativos causados pela exposição à agentes oxidantes durante a diferenciação e pela necessidade dessas enzimas no combate ao estresse oxidativo em células com características eritróides que apresentam um ambiente extremamente oxidante.

Com relação às possíveis alterações na expressão dessas proteínas frente a inibição de PRDX2, verificamos que não ocorrem mudanças na expressão de PRDX1 e uma sutil diminuição de PRDX6 enquanto que a expressão de PRDX5 é bastante diminuída frente a inibição da expressão de PRDX2. Esses dados condizem com os

encontrados na análise de expressão gênica, a qual mostrou uma mudança no padrão de expressão de *PRDX5*.

A partir de análises no banco de dados BioGRID (*Biological General Repository for Interaction Datasets*) foi identificado que *PRDX5* interage com diversas proteínas inclusive com *PRDX1* e *PRDX2* [103]. Ainda não foi elucidado o papel biológico da interação entre *PRDX5* e *PRDX2*, entretanto, a diminuição na expressão de *PRDX5* frente à inibição da expressão de *PRDX2* encontrada no presente trabalho, nos mostra que essa interação aparenta ser importante e regula a expressão de *PRDX5*. Esses dados nos incentivam a investigar melhor essa interação a fim de compreender os mecanismos envolvidos na proteção contra EROs em eritrócitos.

## 6.0 – CONCLUSÕES

- Foi realizada a padronização do cultivo de células K562 pela primeira vez no grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada.
- Identificamos que a inibição de 70% na expressão de PRDX2 foi responsável pela diminuição na proliferação, viabilidade celular e formação de aglomerados em células K562. Demonstrando a importância dessa proteína em células com características eritróides.
- Identificamos um padrão comum na expressão de todas as PRDXs durante a diferenciação. Onde a expressão é diminuída no dia 2 e aumentada no final da diferenciação. A diminuição da expressão de todas as PRDXs no dia 2 pode estar relacionada com a necessidade da ação de agentes oxidantes nessa fase para que ocorra a diferenciação mediada por Hemina, já o aumento no final da diferenciação parece estar relacionado ao combate dos danos causados pelo excesso de agentes oxidantes.
- Avaliamos a expressão gênica e proteica de enzimas antioxidantes frente à inibição da expressão de PRDX2. Os resultados demonstram que a inibição de PRDX2 afeta negativamente a expressão de PRDX5 e PRDX6. Já foi visto que PRDX5 e PRDX6 interagem com PRDX2, entretanto os mecanismos e o papel biológico dessas interações ainda não foram elucidados. Apesar de ainda pouco conhecidas, estas interações nos parecem importantes uma vez que afetam a expressão de PRDX5 e PRDX6.
- Identificamos também que a inibição de PRDX2 parece aumentar a expressão de seus redutores biológicos TrxR1 e SRX. Esse pode ser um mecanismo compensatório, no qual aumentando a reciclagem da PRDX2, compensaria sua falta na célula.



## 7.0– PERSPECTIVAS FUTURAS

Os trabalhos futuros darão continuidade ao presente estudo, de forma a compreender pontos ainda não esclarecidos e melhor caracterizar o papel das Prxs nos eritrócitos, dessa forma, futuramente esperamos compreender melhor os mecanismos envolvidos no estresse oxidativo em doenças hemolíticas.

- Futuramente serão avaliados níveis de expressão das proteínas envolvidas no estresse oxidativo frente à inibição da expressão de outras PRDXs.
- Avaliar a expressão proteica de CAT, SOD, GPx, TRX, TRXR1 e SRX através da técnica de Western Blotting.
- Identificar a localização celular das PRDXs em K562 diferenciada e não diferenciada.
- Analisar o estado de oxidação das PRDXs, formação de decâmeros, e oligômeros com e sem tratamento com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nos diferentes estágios de diferenciação.
- Avaliar o padrão de expressão de globinas em células K562 e K562 com expressão de PRDX2 inibida
- Esse trabalho também possibilitará o estudo mais aprofundado de outras proteínas envolvidas em doenças hematológicas como talassemias e anemia falciforme.

## 8.0 – BIBLIOGRAFIA

- 1 Finkel T & Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247.
- 2 Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology* **4**, 278–86.
- 3 Dickinson BC & Chang CJ (2012) Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* **7**, 504–511.
- 4 Matsuzaki S, Szweda PA, Szweda LI & Humphries KM (2010) Regulated Production of Free Radicals by the Mitochondrial Electron Transport Chain: Cardiac Ischemic Preconditioning. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 1324–1331.
- 5 Niatsetskaya ZV, Sosunov SA, Matsiukevich D, Sosunova IVU, Ratner VI, Starkov AA & Ten VS (2012) The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia- ischemia in neonatal mice. *J Neurosci.* **32**, 3235–3244.
- 6 Bartz RR & Piantadosi C a (2010) Clinical review: oxygen as a signaling molecule. *Critical care (London, England)* **14**, 234.
- 7 Finkel T (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology* **194**, 7–15.
- 8 Circu ML & Aw TY (2011) Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48**, 749–762.
- 9 Alfadda A a & Sallam RM (2012) Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**, 936486.
- 10 Kumar H, Lim H-W, More SV, Kim B-W, Koppula S, Kim IS & Choi D-K (2012) The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *International journal of molecular sciences* **13**, 10478–504.
- 11 Poole LB, Hall A & Nelson KJ (2012) Overview of Peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Curr Protoc Toxicol*, 1–20.
- 12 Rhee SG & Woo HA (2011) Multiple Functions of Peroxiredoxins : Peroxidases , Sensors and Regulators of the Intracellular. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* **00**, 1–14.
- 13 Traber MG & Stevens JF (2012) Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free radical biology & medicine* **51**, 1000–1013.
- 14 Kemp M, Go Y-M & Jones DP (2009) Non-equilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* **44**, 921–937.

- 15 Szabó C, Ischiropoulos H & Radi R (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 662–80.
- 16 Knoop B, Loumaye E & Eecken VVD (2007) Evolution of the Peroxiredoxins ( Taxonomy / Homology / Characterization ). In *Peroxiredoxin Systems* pp. 27–40.
- 17 Chae HZ, Kim K & Gene TA (1993) Cloning, Sequencing, and Mutation of Thiol-specific Antioxidant Gene of. **268**, 16815–16821.
- 18 Chae H., Chungl SJ & Rhee SG (1994) Thioredoxin-dependent Peroxide Reductase from Yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 27670–27678.
- 19 Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG & Stadtman ER (1988) The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *The Journal of biological chemistry* **263**, 4704–11.
- 20 Hofmann B, Hecht H & Flohé L (2002) Peroxiredoxins. *Biol. Chem* **383**, 347–364.
- 21 Rhee SG, Chae HZ & Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free radical biology & medicine* **38**, 1543–52.
- 22 Zhang B, Wang Y & Su Y (2009) Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer letters* **286**, 154–60.
- 23 Hall A, Parsonage D, Poole L & Karplus P (2010) Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J Mol Biol.* **402**, 194–209.
- 24 Demasi a P, Pereira G a & Netto LE (2001) Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS letters* **509**, 430–4.
- 25 Hall A, Karplus A & Poole LB (2009) Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* **276**, 2469–2477.
- 26 Oliveira M a, Discola KF, Alves SV, Medrano FJ, Guimarães BG & Netto LES (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* **49**, 3317–26.
- 27 Ghaemmaghami S, Huh W-K, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O’Shea EK & Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–41.
- 28 Copley S, Novak W & Babbitt P (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* **44**, 13981–13995.

- 29 Atkinson HJ & Babbitt PC (2009) An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. *PLoS computational biology* **5**, e1000541.
- 30 Hofmann B, Hecht H & Flohé L (2002) Peroxiredoxins. *Biol. Chem* **383**, 347–364.
- 31 Trivelli X, Krimm I, Ebel C, Verdoucq L, Prouzet-Mauléon V, Chartier Y, Tsan P, Lauquin G, Meyer Y & Lancelin J. (2003) Characterization of the yeast peroxiredoxin Ahp1 in its reduced active and overoxidized inactive forms using NMR. *Biochemistry* **48**, 14139–14149.
- 32 Wood ZA, Poole LB & Karplus PA (2003) Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling. *Science* **300**, 650–653.
- 33 Barranco-Medina S, Lázaro J-J & Dietz K-J (2009) The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS letters* **583**, 1809–16.
- 34 Poole L (2007) The Catalytic Mechanism of Peroxiredoxins. In *Peroxiredoxin Systems* pp. 61–81.
- 35 Rhee SG, Woo HA, Kil IS & Bae SH (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *The Journal of biological chemistry* **287**, 4403–10.
- 36 Soito L, Williamson C, Knutson ST, Fetrow JS, Poole LB & Nelson KJ (2011) PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic acids research* **39**, D332–7.
- 37 Park SG, Cha MK, Jeong W & Kim IH (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **275**, 5723–32.
- 38 Horta B, Oliveira M de, Discola K, Cussiol J & Netto L Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: catalytic mechanism and high reactivity. *J Biol Chem.* **285**, 16051–65.
- 39 Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong G-W, Yun D-J, Rhee SG, Cho MJ & Lee SY (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**, 625–35.
- 40 Vivancos AP, Castillo E a, Biteau B, Nicot C, Ayté J, Toledano MB & Hidalgo E (2005) A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8875–80.
- 41 Shao L, Li H, Pazhanisamy SK, Meng A, Wang Y & Zhou D (2012) Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence. *Int J Hematol* **94**, 24–32.

- 42 Torres MA, Jones JDG & Dangl JL (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens 1. *Update on Reactive Oxygen Species in Plant Pathology* **141**, 373–378.
- 43 Klomsiri C, Panmanee W, Dharmsthiti S & Vattanaviboon P (2005) Novel Roles of ohrR-ohr in *Xanthomonas* Sensing , Metabolism , and Physiological Adaptive Response to Lipid Hydroperoxide. *Journal of bacteriology* **187**, 3277–3281.
- 44 Rapoport SM (1986) *The reticulocyte. Boca Raton.*
- 45 Zago MA, Falcão RP & Pasquini R (2004) *Hematologia, Fundamentos e Prática.*
- 46 Sivilotti M (2004) Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicol Rev* **23**, 169–88.
- 47 Kakhniashvili DG, Bulla L a & Goodman SR (2004) The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**, 501–9.
- 48 Pandey KB & Rizvi SI (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative medicine and cellular longevity* **3**, 2–12.
- 49 Perutz, M F (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5-5Å resolution obtained by x-ray analysis. *Nature* **185**, 416–422.
- 50 Zago MA & Pasquini R (2004) *Hematologia: fundamentos e prática.*
- 51 Weatherall DJ (2001) RELATIONSHIPS IN MONOGENIC DISEASE : LESSONS FROM THE THALASSAEMIAS. *Nature reviews genetics* **2**, 245–255.
- 52 Higgs D & Wood W (2008) Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* **3**, 176–83.
- 53 Antonarakis S, Kazazian H & Orkin S (1985) DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Human Genetics* **69**, 1–14.
- 54 Grosveld F, Dillon N & Higgs D (1993) The regulation of human globin gene expression. *Baillieres Clin Haematol.* **6**, 31–55.
- 55 Dzierzak E (2010) A Developmental Approach to Hematopoiesis. *Disorders of Hemoglobin*, 3–23.
- 56 Carmen B, Lozzio B & Lozzio B (1975) Human Chronic Myelogenous Leukemia cell-line With Positive Philadelphia Chromosome. *Blood* **45**, 321–335.
- 57 Lozzlo BB & Lozzio CB (1979) PROPERTIES AND USEFULNESS OF THE ORIGINAL K-562 HUMAN MYELOGENOUS LEUKEMIA CELL LINE. *Leukemia Research* **3**, 363–370.

- 58 Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG & Feliu a. S (1981) A Multipotential Leukemia Cell Line (K-562) of Human Origin. *Experimental Biology and Medicine* **166**, 546–550.
- 59 Anderson LC, Nilsson K & Gahmberg CG (1979) K562- a human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer* **23**, 143–147.
- 60 Koeffler P & Golde DW (1980) Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review. *Blood* **56**, 344–351.
- 61 De Franceschi L, Bertoldi M, De Falco L, Santos Franco S, Ronzoni L, Turrini F, Colancecco A, Camaschella C, Cappellini MD & Iolascon A (2011) Oxidative stress modulates heme synthesis and induces peroxiredoxin-2 as a novel cytoprotective response in  $\beta$ -thalassemic erythropoiesis. *Haematologica* **96**, 1595–1604.
- 62 Alves LR, Costa ES, Sorgine MHF, Nascimento-Silva MCL, Teodosio C, Bárcena P, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Orfao A, Oliveira PL & Maya-Monteiro CM (2011) Heme-oxygenases during erythropoiesis in K562 and human bone marrow cells. *PLoS one* **6**, e21358.
- 63 Kawasaki N, Morimoto K, Tanimoto T & Hayakawa T (1996) Control of Hemoglobin Synthesis in Erythroid Differentiating K562 Cells - I. Role of Iron in Erythroid Cell Heme Synthesis. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* **328**, 289–294.
- 64 Andriollo M, Guiraud P, Belhoussine R & Jeannesson P (2009) Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free Radical Biology and Medicine* / **1**, 18–27.
- 65 Baliga BS, Mankad M, Shah AK & Mankad VN (1993) Mechanism of differentiation of human erythroleukaemic cell line K562 by hemin. *Cell Prolif*, 519–529.
- 66 Osti F, Corradini FG, Hanau S, Matteuzzi M & Gambari R (1997) Human leukemia K562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides. *Hematologica* **83**, 395–401.
- 67 Zhang D, Cho E & Wong J (2007) A critical role for the co-repressor N-CoR in erythroid differentiation and heme synthesis. *Cell research* **17**, 804–14.
- 68 Park J, Choi H, Jeong J, Han J & Kim I (2001) Involvement of p38 Kinase in Hydroxyurea-induced Differentiation of K562 Cells 1. *Cell Growth & Differentiation* **12**, 481–486.
- 69 Chénais B, Andriollo M, Guiraud P, Belhoussine R & Jeannesson P (2000) Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 18–27.

- 70 Zago MA & Pinto ACS (2007) Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* **29**, 207–214.
- 71 Stuart MJ, Nagel RL & Jefferson T (2004) Sick cell disease. .
- 72 Klings ES & Farber HW (2001) Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **2**, 280–285.
- 73 Queiroz RF & Lima ES (2013) Oxidative stress in sickle cell disease. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* **35**, 16–7.
- 74 Hebbel R, Morgan W, Eaton J & Hedlund B (1988) Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 237–241.
- 75 Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M & Steinberg MH (1982) Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *The Journal of clinical investigation* **70**, 1253–9.
- 76 Rice-evans C, Omorphos SC & Baysal E (1986) Sick cell membranes and oxidative damage. *Biochemistry* **237**, 265–269.
- 77 Chirico EN & Pialoux V (2012) Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB life* **64**, 72–80.
- 78 Rizzo AM, Corsetto PA, Montorfano G, Milani S, Zava S, Tavella S, Cancedda R & Berra B (2012) Effects of long-term space flight on erythrocytes and oxidative stress of rodents. *PloS one* **7**, e32361.
- 79 Johnson RM, Goyette G, Ravindranath Y & Ho Y-S (2005) Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. *Free radical biology & medicine* **39**, 1407–17.
- 80 Franceschi LD, Bertoldi M, Matte A, Franco SS, Pantaleo A, Ferru E & Turrini F (2013) Oxidative Stress and  $\beta$ -Thalassemic Erythroid Cells behind the Molecular Defect. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1–10.
- 81 Shazia Q, Mohammad ZH, Rahman T & Shekhar HU (2012) Correlation of oxidative stress with serum trace element levels and antioxidant enzyme status in Beta thalassemia major patients: a review of the literature. *Anemia*, 1–7.
- 82 Efferth T, Schwarzl SM, Smith J & Osieka R (2006) Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase for oxidative stress and apoptosis. *Cell death and differentiation* **13**, 529–30.
- 83 Amer J, Zelig O & E. F (2008) Oxidative status of red blood cells, neutrophils, and platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* **36**, 369–77.

- 84 Cohen G & Hochstein P (1963) Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in erythrocytes. *Biochemistry*, 1420–1430.
- 85 Matte A, Low P, Turrini F, Bertoldi M, Campanella ME, Spano D, Pantaleo A, Siciliano A & Franceschi L (2012) Peroxiredoxin-2 expression is increased in  $\beta$ -thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **49**, 457–466.
- 86 Lee T, Kim S, Yu S, Kim SH, Park DS, Moon H, Hee S, Kwon K, Kwon HJ, Han Y, Jeong S, Kang SW, Lee K, Rhee SG, Yu D & Dc W (2013) Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* **101**, 5033–5038.
- 87 Olivieri BO, Franceschi LD, Capellini MD, Girelli D, Corrocher R & Brugnara C (1994) Oxidative Damage and Erythrocyte Membrane Transport Abnormalities in Thalassemias. *The American Society of Hematology* **84**, 315–320.
- 88 Galanello R & Origa R (2010) Beta-thalassemia. *Orphanet journal of rare diseases* **5**, 11.
- 89 Dietz K-J (2011) Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & redox signaling* **15**, 1129–59.
- 90 Smith-pearson PS, Kooshki M, Spitz DR, Poole LB & Robbins ME (2009) NIH Public Access. **45**, 1178–1189.
- 91 Bangham AD & Horne RW (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in electron microscope. *Journal of molecular biology* **8**, 660–668.
- 92 Lasic DD (1995) Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles. Lessons for drug delivery. *Biochimica et biophysica acta* **2**, 145–156.
- 93 Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ & Ciccarone VC (2004) Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods (San Diego, Calif.)* **33**, 95–103.
- 94 Rowley P, Ohlsson-Wilhelm B, Farley BA & LaBella S (1981) Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. *Exp Hematol* **9**, 32–37.
- 95 Yamabe S, Nakataa H & Yamazakia S (2009)  $\pi$  Complexes in benzidine rearrangement. *Org. Biomol. Chem* **7**, 4631–4640.
- 96 Lowry O, Rosebrough N, Farr L & Randall R (1951) Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- 97 Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG & Obeid LM (1997) Thioredoxin Peroxidase Is a Novel Inhibitor of Apoptosis with a Mechanism Distinct from That of Bcl-2 \*. *The Journal of biological chemistry*, 30615–30619.



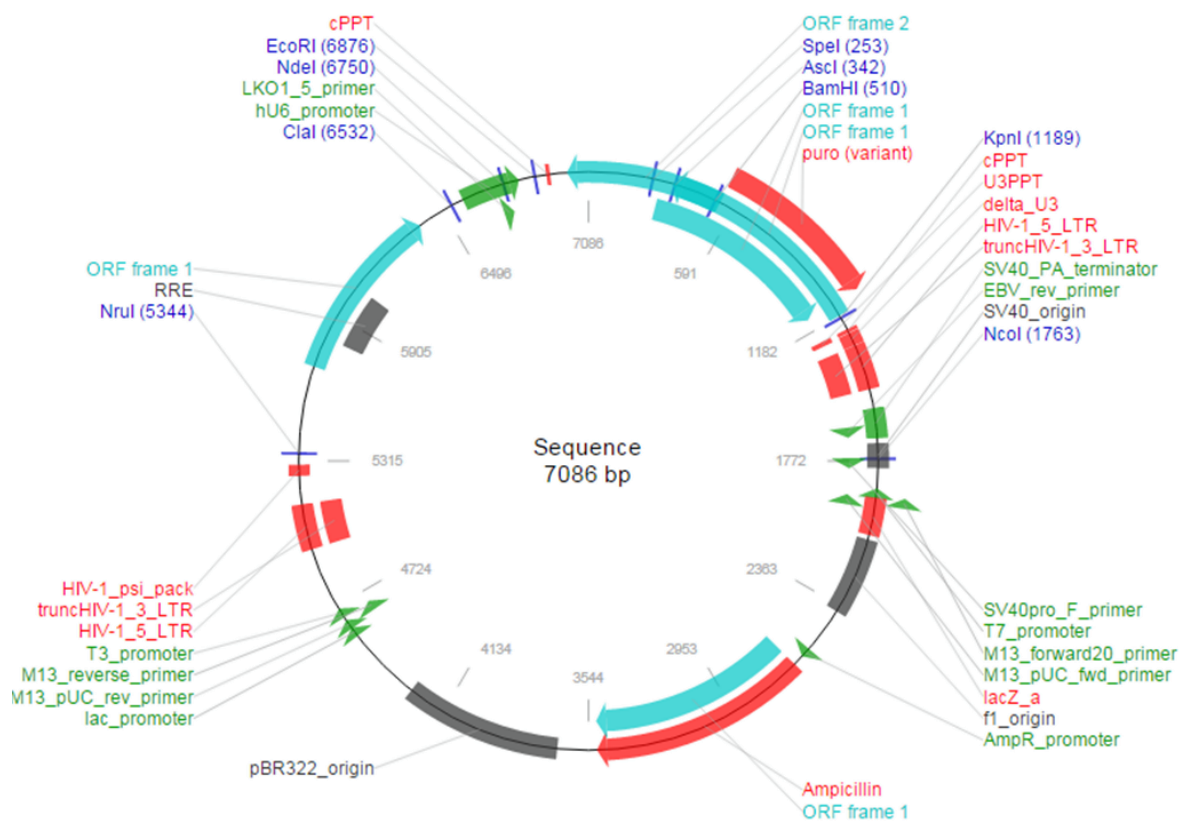
- 98 Kang SW, Baines IC & Goo S (1998) Characterization of a Mammalian Peroxiredoxin That Contains One Conserved Cysteine \*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 6303–6311.
- 99 Iwasaki K, Mackenzie EL, Hailemariam K, Sakamoto K & Tsuji Y (2006) Hemin-Mediated Regulation of an Antioxidant-Responsive Element of the Human Ferritin H Gene and Role of Ref-1 during Erythroid Differentiation of K562 Cells. **26**, 2845–2856.
- 100 Wonsey DR, Zeller KI & Dang CV (2002) The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. **99**, 6649–6654.
- 101 Tavender TJ, Sheppard AM & Bulleid NJ (2010) Peroxiredoxin IV is an endoplasmic reticulum localised enzyme forming oligomeric complexes in human cells. *Biochemical Journal*, **1**, 191–199.
- 102 Cioe L, Hubbell HR, Meo P, Curtis P & Povera G (1981) Differential Expression of the Globin Genes in Human Leukemia K562 ( S ) Cells Induced to Differentiate by Hemin or Butyric Acid1. *Cancer research* **562**, 237–243.
- 103 Havugimana PC, Hart GT, Nepusz T, Yang H, Andrei L, Li Z, Wang PI, Boutz DR, Fong V, Phanse S, Babu M, Craig SA, Hu P, Wan C, Vlasblom J, Dar V, Bezginov A, Clark GW, Wu GC, Shoshana J, Tillier ERM, Paccanaro A, Marcotte EM & Emili A (2013) A census of Human Soluble Protein Complexes. *Cell* **150**, 1068–1081.
- 104 Bustin S a, Benes V, Garson J a, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J & Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**, 611–22.

# ANEXOS

## Anexo 1

### Mapa completo do vetor utilizado para a transfeccção

Mapa completo do plasmídeo pLKO.1-puro (Figura A1) utilizando a sequência do vetor vazio e a ferramenta de análises de vetores do site Addgene.



**Figura A1 – Mapa completo do plasmídeo utilizado pLKO.1 puro vazio.** O mapa completo do plasmídeo foi gerado através da sequencia do plasmídeo vazio utilizando o a ferramenta da Addgene que analisa vetores. No mapa, podemos observar todos os sítios de restrição e os genes contidos no plasmídeo para possíveis análises futuras.

## **Anexo 2**

### **Preparação de meio RPMI**

O meio RPMI 1640 foi originalmente desenvolvido para cultura de células leucêmicas humanas em suspensão. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) é considerado um excelente meio de cultivo para diferentes células como HeLa, Jurkat, MCF-7, PC12, PBMC e K562 entre outras. O meio RPMI contém vermelho fenol como indicador de pH, o agente redutor glutamina e altas concentrações de vitaminas. Adicionalmente contém biotina e vitamina B12, os quais não são encontrados em outros meios como DMEM. Além disso, o meio RPMI contém as vitaminas inositol e colina em altas concentrações. RPMI não contém proteínas, lipídios ou fatores de crescimento, necessitando de suplementação, comumente é realizada a suplementação com 10% de soro bovino fetal. Esse meio necessita também a adição de bicarbonato de sódio (2 g/L) como sistema de tampão e um ambiente de 5-10% CO<sub>2</sub> para manter o pH fisiológico.

Para preparar 1L de meio RPMI (RPMI-1640 Medium - SIGMA), dilui-se o conteúdo de 1 sachê contendo 10,4g de meio em pó em aproximadamente 950ml de água deionizada, foi adicionado 2g de bicarbonato de sódio e misturado até que estivesse bem diluído. O pH foi ajustado para aproximadamente 7,2, foi adicionado antibióticos (penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml) e fungicida (anfotericina 0,25µg/ml) e então o volume foi completado para 1L utilizando água deionizada. O meio foi filtrado utilizando membrana de 0,22µm em sistema estéril e armazenado em vidro autoclavado na geladeira por no máximo 1 mês.

### **Descongelamento das células K562**

Antes de descongelar as células os materiais necessários são colocados no fluxo e deixados 30 minutos expostos à luz UV. O meio RPMI e o soro bovino fetal foram retirados da geladeira e do freezer respectivamente e deixados até atingir temperatura ambiente. Dentro do fluxo foi preparado 5 ml de meio RPMI suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) em um falcon e colocado em frasco de cultura celular de 50 ml.

Em seguida o tubo criopreservante contendo as células a serem descongeladas foi colocado por 5 minutos no gelo. Então o conteúdo do tubo foi despejado dentro de um frasco de cultura de 50 ml com o meio utilizando uma pipeta. O descongelamento

das células é geralmente realizado de forma rápida, dessa forma minimiza os danos às células. Apesar de todo o cuidado durante o congelamento e descongelamento esses processos são danosos para as células e, portanto, ao descongelar as células, devem ser colocadas em meio de cultivo com uma concentração de 20% de soro bovino fetal por um dia. O soro bovino fetal é um complemento do meio de cultura, contém fatores de crescimento, hormônios, proteínas, peptídeos, nucleosídeos e lipídeos importantes para a proliferação celular. Após o descongelamento foi utilizado 20% de soro por um dia a fim de promover um meio ambiente rico para a recuperação ao estresse causado durante o congelamento e descongelamento das células.

O frasco foi então identificado e deixado por um dia em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram observadas em microscópio invertido para verificar a confluência e o meio é trocado a fim de diminuir a concentração de soro bovino fetal, que induziria a diferenciação e retirar o DMSO (solução criopreservante) o qual é tóxico à célula.

As células foram centrifugadas com rotor swing por 5 minutos, a uma rotação de 600g com desaceleração 0-2 e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso em aproximadamente 10 ml de meio RPMI fresco suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após resuspenso as células o conteúdo foi colocado novamente no frasco de cultivo e deixado em estufa úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

De 2 em 2 dias aproximadamente as células foram observadas quanto a sua confluência, número, morfologia e possíveis contaminações, adicionando-se meio fresco suplementado com 10% de soro bovino fetal e trocando-o quando julgar necessário (em casos de mudança de pH ou precipitação de células mortas).

### **Congelamento de células K562**

Após alguns dias de cultivo, aproximadamente 1 semana, congelamos uma parte das células. Primeiramente, foi preparada a solução criopreservante (DMSO 10% e soro bovino fetal 90%). O conteúdo do cultivo celular foi colocado em um tubo cônico de 15 mL e centrifugado com rotor swing por 5 minutos, a uma rotação de 600g com desaceleração 0-2 e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso com a o volume desejado de solução criopreservante para um número de células de  $2 \times 10^6$  células/ml. A solução foi adicionada gelada de 1

em 1 ml e homogeneizando. Após ressuspensão, o conteúdo foi aliquoteado em tubos criopreservantes com um volume de aproximadamente 1ml contendo  $2 \times 10^6$  células/ml. Os tubos foram armazenados em freezer -80 por 12-24 horas e transferidos para o nitrogênio líquido.

## Anexo 3

### Padronização dos *primers* de qRT-PCR

A técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) permite a detecção e quantificação de fragmentos de DNA e RNA em tempo real com alta sensibilidade e especificidade, a quantificação desses ácidos nucleicos é feita de forma precisa e com maior reprodutibilidade que a técnica convencional já que determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado Cycle threshold ( $C_T$ ). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. Essa técnica é extremamente sensível e como os valores são medidos na fase exponencial de amplificação, qualquer variável pode significar um resultado não confiável, por isso vários cuidados devem ser tomados para a realização de um experimento confiável e eficiente que minimize a possibilidade de conclusões erradas [104].

A eficiência das reações de amplificação por qRT-PCR depende de diversos fatores, tais como o cuidado com a pipetagem, a qualidade e integridade das amostras de cDNA, desenho dos *primers*, condições de termociclagem, qualidade e quantidade dos reagentes e tamanho do produto da amplificação. Por isso as condições específicas para cada experimento necessitam ser padronizadas.

O desenho dos *primers* é um dos principais fatores limitantes para a eficiência da técnica de PCR em tempo real e precisa seguir uma série de regras. Por isso os *primers* que serão utilizados nesse estudo foram desenhados a fim de apresentar temperatura de anelamento ideal entre 58 e 60° para eficiência do ciclo padrão de termociclagem, os *primers* foram desenhados para uma região localizada entre dois exons, evitando a amplificação de gDNA por eventual contaminação e além disso foram desenhados evitando-se a possibilidade de formação de homodimeros, heterodimeros e “*hairpin*” entre os *primers*. A sequência dos *primers* referentes aos genes que serão analisados através da técnica de qRT-PCR estão apresentadas na **Tabela A1**.

**Tabela A1.** Sequências dos *primers* que foram utilizados nas reações de qRT-PCR.

<i>Primer</i>	Sequência
PRDX1F	TGTAATGACCTCCCTGTTGG

PRDX1R	TATCACTGCCAGGTTTCCAG
PRDX2F	CTGTTAATGATTTGCCTGTGGG
PRDX2R	TGGGCTTAATCGTGTCCTG
PRDX3F	TCCCACCTTAGCCATCTTGC
PRDX3R	GTAGTCTCGGGAAATCTGCTTAG
PRDX4F	ATCAGATCTCAAAGGACTATGGTG
PRDX4R	CCAAACGTAGTGTCTCATCCAC
PRDX5F	AGAAGGGTGTGCTGTTTGG
PRDX5R	TCATTAACACTCAGACAGGCC
PRDX6F	CACGACTTTCTGGGAGACT
PRDX6R	GGGCAATCAACTTAACATTCTC
$\beta$ ACTINA - F	AGGCCAACCGCGAGAAG
$\beta$ ACTINA - R	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA
CATALASE – F	TGAATGAGGAACAGAGGAAACG
CATALASE – R	GTACTIONGTCCAGAAGAGCCTG
SOD 1 – F	GGGCAAAGGTGGAAATGAAG
SOD 1 – R	CAGCTAGCAGGATAACAGATGAG
GPX 1 – F	TTCCAGACCATTGACATCGAG
GPX 1 – R	CACCCTCATAGATGAAAACCCC
TRX 1 – F	TGGTGAAGCAGATCGAGAGCAAAGA
TRX 1 – R	ACCACGTGGCTGAGAAGTCAACTA
TRXR1 – F	CAACATTGTCTGTGACCAAGC
TRXR1 – R	AACCCTCTAGAAACTTCGCC
SRX– F	AGCATCCACACCAGACTTG
SRX – R	ACCCCTGCTATCCCTTCTG

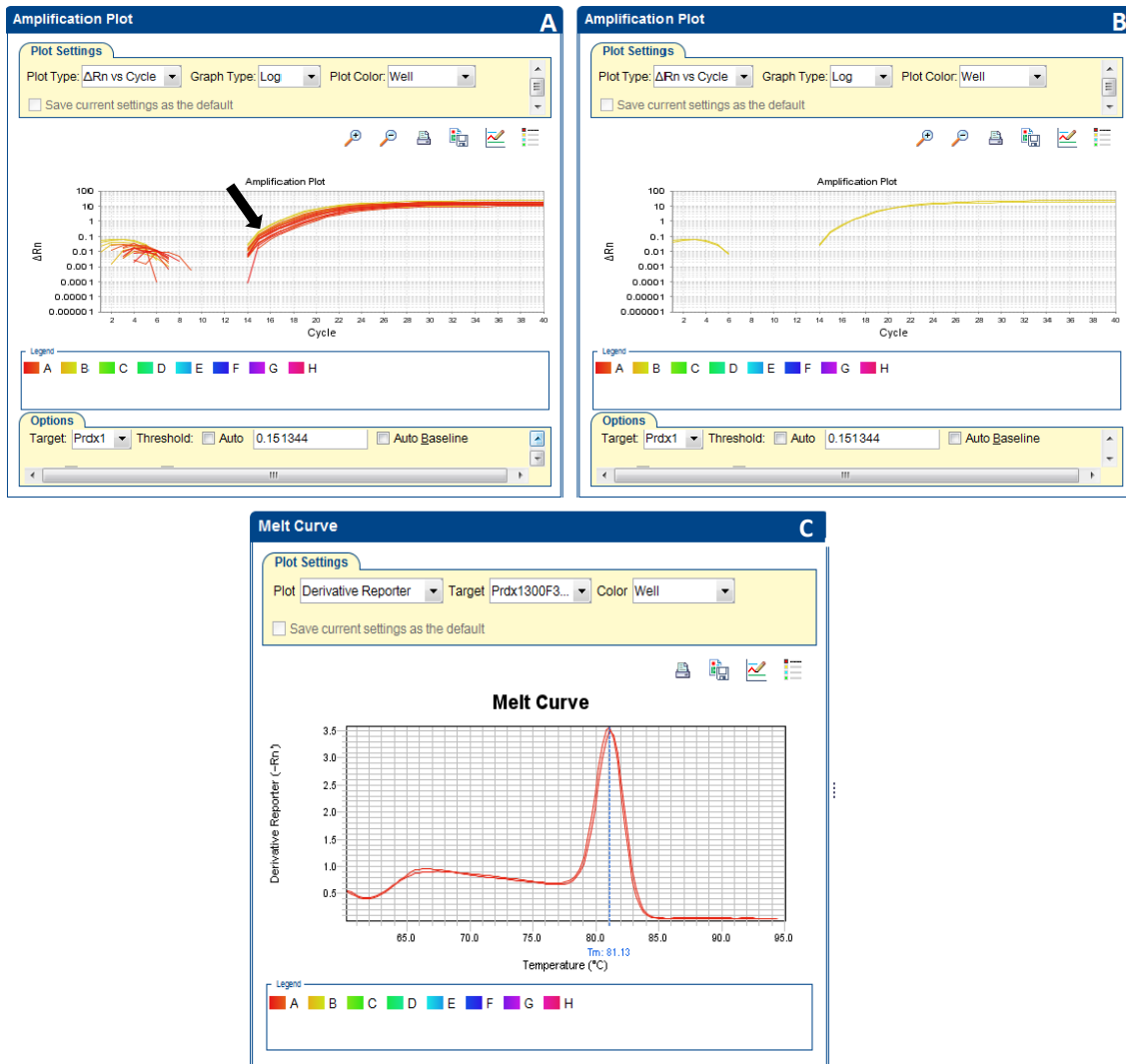
Além do desenho, a quantidade de *primer* a ser usada é outro fator essencial que interfere na eficiência das reações. É importante que seja utilizada uma combinação de concentração de *primers* forward e reverse mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra, que forneçam o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), a maior amplificação na fase exponencial (maior  $\Delta R_n$ , que

corresponde à variação de fluorescência) e que forme a menor quantidade de dímeros de *primers*.

Após a síntese, realizamos a padronização da concentração dos *primers* utilizando uma amostra de cDNA de células K562. Para tal, utilizamos as seguintes concentrações de *primers* forward e reverse respectivamente para verificar a melhor combinação de concentração (100/100, 100/150, 100/300, 150/100, 150/150, 150/300, 300/100, 300/150, 300/300 nM). Para cada par de *primer* foi verificada a combinação de concentração que apresentasse a maior amplificação (maior taxa de fluorescência) e menor formação de dímeros, utilizando a menor concentração de *primers* possível. As concentrações utilizadas para cada gene estão descritas na Tabela 4.

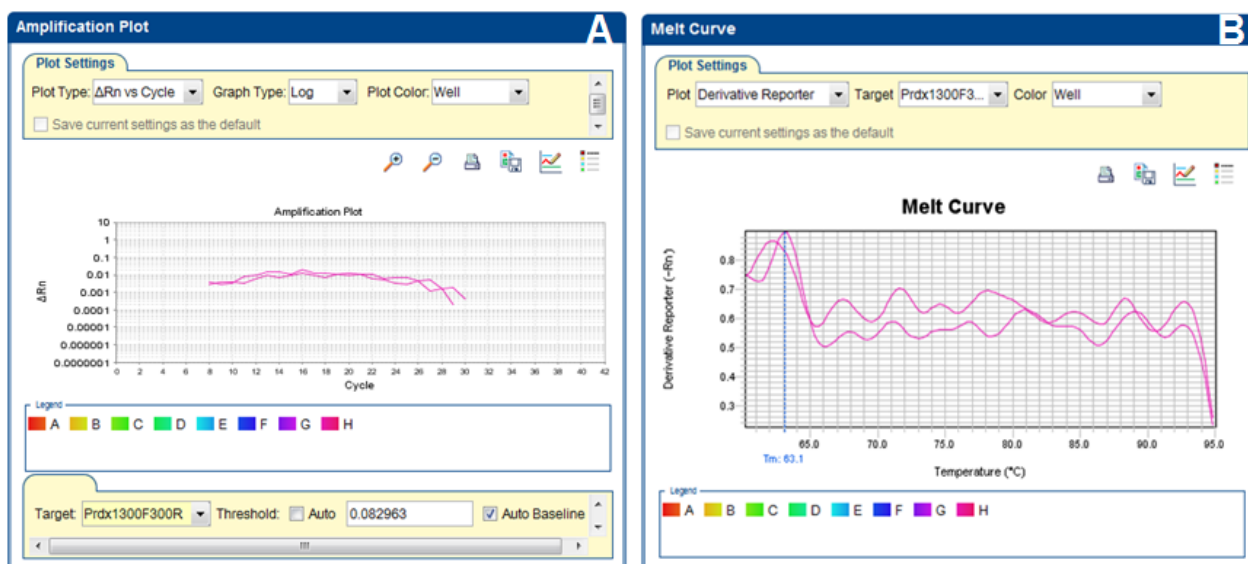
Na **Figura A2**, está exemplificada a curva de amplificação da padronização do *primer* da PRDX1, a qual apresentou sua melhor amplificação nas concentrações 300F/300R nM. Na **Figura A2 A** podemos observar todas as curvas de amplificação, na parte (**Figura A2 B**) observamos a curva da concentração escolhida (Seta preta) e na parte (**Figura A2 C**) observamos a curva de melting da concentração escolhida, a qual apresentou a maior fluorescência, menor formação de dímeros.





**Figura A2 – Padronização dos *primers* PRDX1.** A) A padronização do *primer* da PRDX1 demonstrou entre todas curvas para as diferentes concentrações de *primers*, que a melhor combinação de concentração foi 300F/300R nM, C) destacado em cor laranja e apontada pela seta preta. C) A qual apresentou maior emissão de fluorescência, menor formação de dímeros de *primer* na menor concentração possível. Como pode ser visto na curva de *melting*, o pico único aparece próximo a 81°C mostrando a especificidade da amplificação, onde picos em temperaturas distintas indicariam bandas inespecíficas ou formação de dímeros.

Adicionalmente, podemos observar que os NTCs (*no-template controls*) não apresentaram amplificação, nem formação de dímeros (**Figura A3**).



**Figura A3** - NTCs (*no-template controls*) *PRDX1*. **A)** A ausência de amplificação no controle negativo indica que não há contaminação do *primer*. **B)** A Curva de *melting* confirmando a ausência de contaminantes.

Após a determinação da melhor concentração dos *primers* partimos para a elaboração da curva de eficiência da reação. Uma vez que os valores são medidos na fase exponencial de amplificação, qualquer variável pode significar um resultado não confiável, e a reação não se torna eficiente, por isso é realizada a curva para determinar a eficiência da reação, que para ser considerado eficiente, deve apresentar valor de eficiência entre 95 – 105%, quanto mais próximo de 100% mais eficiente é a reação. Foram realizadas diluições seriadas de 1:5 partindo de uma amostra de cDNA à 200ng utilizando as mesmas concentrações de *primers* determinadas previamente. Como a amplificação é exponencial, deve haver uma diferença de 3,32 Cts na amplificação de cada uma das diluições e ao traçarmos uma reta relacionando a potencia da diluição e o Ct obtemos a curva da eficiência do *primer*, a qual deve apresentar o valor de  $R^2$  mais próximo de 1 (100%) (**Figura A4 A e Figura A4 B**).

A curva de *melting* também foi analisada para verificar a formação de dímeros ou amplificações inespecíficas, representadas pelo aparecimento de mais de um pico. Depois de obtidos e analisados os parâmetros citados é determinado um *threshold* que será utilizado nas análises posteriores (**Figura A4 C**).



**Figura A4 – Teste de eficiência da reação para análise do gene PRDX1.** Foram realizadas diluições seriadas de 1:5 partindo de uma amostra de cDNA à 200ng e as concentrações de *primers* determinadas previamente. Como a amplificação é exponencial, podemos observar como esperado, uma diferença de 3,32 Cts na amplificação de cada uma das diluições seriadas realizadas (A). Ao traçarmos uma reta relacionando a potência da diluição (abscissas) e o Ct (ordenadas), obtivemos a chamada curva de eficiência do *primer*, a qual deve apresentar o valor de  $R^2$  mais próximo possível de 1 (100%) (B), no caso da PRDX1 e de todos os outros genes de interesse as curvas de eficiência apresentaram uma eficiência maior que 95%. O pico único que aparece na figura da curva de *melting* (C) próximo a 82°C mostra a especificidade da amplificação, onde picos à temperaturas distintas indicariam bandas inespecíficas ou ocorrência de dímeros.

Abaixo, na **Tabela A2** estão apresentados os valores da concentração de cada par de *primer* que se demonstraram ser ideais na padronização e os valores da eficiência de cada reação. Nossos dados apresentaram uma eficiência maior que 95% para todas as reações o que é bem próximo do ideal (100%), este valor é o suficiente para dizer que as reações de qRT-PCR são eficientes, reprodutíveis e conseqüentemente os resultados são confiáveis.

**Tabela A2.** Apresentação da concentração ideal de cada par de *primer* determinada durante a padronização e eficiência de cada reação para cada gene alvo.

<b>Gene de interesse</b>	<b>Concentração ideal de <i>primers</i></b>	<b>Eficiência da reação</b>
<b>PRDX1</b>	300F/300R nM	95,211 %
<b>PRDX2</b>	150F/150R nM	98,338 %
<b>PRDX3</b>	100F/300R nM	95,097 %
<b>PRDX4</b>	300F/150R nM	95,112 %
<b>PRDX5</b>	100F/100R nM	98,27 %
<b>PRDX6</b>	100F/100R nM	100,324 %
<b>β ACTINA</b>	150F/150R nM	97,228 %
<b>CATALASE</b>	150F/300R nM	101,923 %
<b>SOD 1</b>	150F/150R nM	95,941 %
<b>GPX 1</b>	300F/150R nM	96,576 %
<b>TRX 1</b>	100F/150R nM	94, 331%
<b>TRXR1</b>	150F/150R nM	96,207%
<b>SRX</b>	150F/150R nM	95,645%