

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**JOÃO PEDRO MAIA DE OLIVEIRA DA SILVA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E CONTEÚDO PROTEICO  
DE *ABCB10*, *APEX1* E *HMGB1* EM PACIENTES COM BETA  
TALASSEMIA MAIOR E INTERMEDIARIA**

**SÃO CARLOS**

**2017**

**JOÃO PEDRO MAIA DE OLIVEIRA DA SILVA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E CONTEÚDO PROTEICO  
DE *ABCB10*, *APEX1* E *HMGB1* EM PACIENTES COM BETA  
TALASSEMIA MAIOR E INTERMEDIARIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

**Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha**

**SÃO CARLOS**

**2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa da Dissertação de Mestrado do candidato João Pedro Maia de Oliveira da Silva, realizada em 04/08/2017:

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha  
UFSCar

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira  
UFSCar

11 Prof. Dr. Marcos André Cavalcant Bezerra  
UFPE

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre me dar força e guiar meus passos nos momentos difíceis.

A minha família pelo apoio e suporte que me trouxeram até aqui.

Ao meu orientador, Professor Dr. Anderson Ferreira da Cunha por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho, pela paciência e por tudo que me ensinou durante esses anos.

Ao Professor Dr. Iran Malavazi por toda a sua preciosa contribuição para a realização desse trabalho.

A doutoranda Karen, com quem eu tive o prazer de trabalhar lado a lado na realização deste trabalho e que sempre esteve disposta a me ajudar.

As doutorandas Karina, Marina e Carla que me ensinaram as técnicas necessárias para desenvolver este trabalho, e também aos meus colegas e ex-colegas de trabalho no LBGA, pela amizade e companheirismo

A todos os nossos colaboradores do HEMOPE, especialmente ao professor Marcos André, e da UNICAMP, além dos pacientes e voluntários que participaram deste trabalho, sem os quais nada disso teria sido possível.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, especialmente aos professores Felipe e Ricardo, pelos ensinamentos que foram fundamentais no andamento deste projeto.

A minha namorada Tatiele e aos meus amigos pela força e por acreditarem em mim mesmo depois que eu deixei de acreditar.

A todos os funcionários do DGE que sempre foram muito solícitos quando precisei.

À CAPES e a FAPESP pelo amparo financeiro na forma de bolsa e manutenção do projeto.

“O universo é grande, é vasto e complicado, e ridículo.  
E, às vezes, muito raramente, coisas impossíveis acontecem  
e nós as chamamos de milagres.”  
(Steven Moffat, Doctor Who)

## RESUMO

As beta talassemias (BT), são um grupo de doenças hereditárias caracterizadas pela supressão parcial ou total na síntese das cadeias de beta globina. Clinicamente, manifesta-se de três formas distintas: menor (BTm), intermediária (BTI) e maior (BTM), e são diferenciadas pela frequência de transfusões, sendo a forma mais grave a BTM. Uma vez que é conhecido na literatura que fenótipo das BT ocorre de maneira independente do genótipo, um estudo realizado pelo grupo, avaliou de forma global, genes que se encontravam diferencialmente expressos em pacientes que apresentavam o mesmo genótipo, mas quadros clínicos distintos. Analisando estes resultados e procurando genes relacionados ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis por causar danos as células e colaborando ainda mais com a redução do tempo de vida dos eritrócitos, observado nestes pacientes, identificamos os genes *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* como diferencialmente expressos, sendo o primeiro aumentado em pacientes BTI e os dois últimos aumentados no BTM. Para realização dos experimentos de PCR em tempo real foram utilizadas amostras de sangue periférico extraídas de um grupo controle (n=9), um grupo BTI (n=8) e um grupo BTM (n=4); para os experimentos com células CD34+ foram utilizadas duas culturas saudáveis e duas contendo a mutação IVSI-6 coletadas no 7º, 10º e 13º dia; para realização dos wetern blottings, foram utilizados um grupo controle (n=4), um grupo BTI (n=5) e um grupo BTM (n=6) para determinar o conteúdo proteico de *APEX1*, e um grupo controle (n=4) e um grupo BTI (n=5) para o experimento com *HMGB1*. Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism 6, e considerados significantes valores de  $p < 0,005$ . Utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR), confirmamos estes resultados em um número maior de pacientes. O gene *ABCB10*, apresentou-se em média 5 vezes mais expresso nos pacientes BTI ( $p=0,0077$ ). Já os genes *APEX1* e *HMGB1* apresentaram-se diferencialmente expressos no paciente BTM (ambos 3 vezes). Analisando a expressão destes genes durante a diferenciação de células beta talassêmicas em cultura de células CD34+, comparadas a células saudáveis, através de PCR em tempo real, verificamos um aumento da expressão de *ABCB10* e uma diminuição de *APEX1* e *HMGB1* ao fim da diferenciação. Uma análise proteica utilizando western blot indicou que o conteúdo proteico de *APEX1* se encontra aumentado nos dois fenótipos estudados da BT indicando sua relação com a doença independente de fenótipo. Uma vez que células eritróides não apresentaram quantidades detectáveis de *HMGB1* no citoplasma, foi feita a análise deste no plasma de indivíduos saudáveis e BTI, mostrando um aumento importante desta proteína em pacientes. Desta forma, conclui-se que, nossos resultados contribuem com dados inéditos para a literatura e podem evidenciar no caso da expressão diferencial de *ABCB10*, uma resposta mais eficiente contra o estresse oxidativo, além de um importante papel na diferenciação eritróide em pacientes BTI. A maior produção de *APEX1* em pacientes beta talassêmicos, parece ser independente do fenótipo estando associada com a doença e relacionada ao aumento de estresse oxidativo observado nestes pacientes. Finalmente, o aumento de secreção de *HMGB1* no plasma de pacientes pode estar associado aos quadros inflamatórios prolongados, contribuindo para a citotoxicidade sistêmica. Os dados aqui apresentados contribuem para um melhor entendimento da doença, apontando novos alvos para estudos futuros.

**Palavras-chave:** Beta talassemia, anemia hemolítica, *APEX1*, *HMGB1*, *ABCB10*, expressão gênica, estresse oxidativo

## ABSTRACT

Beta thalassemias (BT) are a group of hereditary diseases characterized by the partial or total suppression of beta globin chains synthesis. Clinically, it manifests itself in three distinct forms: minor (BTm), intermedia (BTI) and major (BTM), and are differentiated by the frequency of transfusions, being the most severe form BTM. Since it is known in the literature that BT phenotype occurs independently of the genotype, a study conducted by the group, evaluated globally, genes that were differentially expressed in patients who had the same genotype, but different clinical presentation. By analyzing these results and looking for genes related to the increase of reactive oxygen species (ROS), responsible for causing cell damage and collaborating even more with the reduction of the erythrocyte lifespan observed in these patients, we identified the genes ABCB10, APEX1 and HMGB1 as differentially expressed, the former being increased in BTI patients and the latter two being increased in BTM. Peripheral blood samples extracted from a control group (n = 9), a BTI group (n = 8) and a BTM group (n = 4) were used to perform the real-time PCR experiments; for the experiments with CD34 + cells two healthy cultures and two containing the IVSI-6 mutation were used on the 7th, 10th and 13th days; A control group (n = 4), a BTI group (n = 5) and a BTM group (n = 6) were used to determine the protein content of APEX1, and a control group (n = 4) ) and a BTI group (n = 5) for the HMGB1 experiment. The data were analyzed using the GraphPad Prism 6 software and considered significant values of  $p < 0.005$ . Using the real-time PCR technique (qPCR), we confirmed these results in a larger number of patients. The ABCB10 gene, on average, was 5 times more expressed in BTI patients ( $p = 0.0077$ ). The APEX1 and HMGB1 genes were differentially expressed in patient BTM (both 3 times). Analyzing the expression of these genes during differentiation of thalassemic beta cells in CD34 + cell culture, compared to healthy cells, by real-time PCR, we found an increase in ABCB10 expression and a decrease in APEX1 and HMGB1 at the end of the differentiation. A protein analysis using western blot indicated that the protein content of APEX1 is increased in the two phenotypes of BT indicating its relation to the disease independent of the phenotype. Since erythroid cells did not show detectable amounts of HMGB1 in the cytoplasm, it was analyzed in the plasma of healthy individuals and BTI, showing a significant increase of this protein in patients. In this way, we conclude that our results contribute with unpublished data for the literature and can show in the case of differential expression of ABCB10, a more efficient response against oxidative stress, besides an important role in the erythroid differentiation in BTI patients. The higher production of APEX1 in beta-thalassemic patients seems to be independent of the phenotype being associated with the disease and related to the increase of oxidative stress observed in these patients. Finally, increased secretion of HMGB1 in the plasma of patients may be associated with prolonged inflammatory conditions, contributing to systemic cytotoxicity. The data presented here contribute to a better understanding of the disease, pointing out new targets for future studies.

Key words: Beta thalassemia, hemolytic anemia, *APEX1*, *HMGB1*, *ABCB10*, gene expression, oxidative stress

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hematopoese.....	13
<b>Figura 2.</b> Períodos da hematopoese.....	14
<b>Figura 3.</b> Alterações morfológicas durante a eritropoiese em seres humanos.....	15
<b>Figura 4.</b> Representação da estrutura da molécula de hemoglobina adulta A1.....	16
<b>Figura 5.</b> Biossíntese de heme.....	17
<b>Figura 6.</b> Grupamento dos genes de $\alpha$ e $\beta$ globina e a produção de diferentes hemoglobinas durante o desenvolvimento humano.....	18
<b>Figura 7.</b> Patogênese da beta talassemia maior.....	23
<b>Figura 8.</b> Geração de EROs.....	25
<b>Figura 9.</b> Fases da peroxidação lipídica.....	28
<b>Figura 10.</b> Complexo formado por ABCB10, FECH e Mfrn1.....	35
<b>Figura 11.</b> Funções de APEX1 coordenando as diferentes respostas ao estresse oxidativo.....	36
<b>Figura 12.</b> Teste de Eficiência da HMGB1 300F/100R.....	47
<b>Figura 13.</b> Análise da expressão gênica dos genes ABCB10, APEX1 e HMGB1 em reticulócitos de indivíduos sadios e com anemias hemolíticas.....	51
<b>Figura 14.</b> Análise de western blotting em controles e pacientes com beta talassemia.....	52
<b>Figura 15.</b> Análise de western blotting em controles e pacientes com beta talassemia intermediária.....	53
<b>Figura 16.</b> Análise da expressão gênica de ABCB10, APEX1 e HMGB1 em culturas de indivíduos sadios e beta talassêmicos.....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos das mutações de ponto mais frequentes que causam talassemias, segundo sua localização na molécula, o defeito funcional que provocam e o resultado sobre a síntese de globinas.....	21
<b>Tabela 2.</b> Dados hematológicos dos pacientes.....	42
<b>Tabela 3.</b> Matriz para Padronização da Concentração Ótima de Primers Forward e Reverse (nM).....	45
<b>Tabela 4.</b> Sequências e concentrações ótimas dos primers utilizados no real-time PCR (qRT-PCR).....	46
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros de importância para os <i>primers</i> caracterizados.....	47
<b>Tabela 6.</b> Anticorpos utilizados na técnica de western blotting.....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A -	Adenina
AA-	Aminoácido
Arg -	Arginina
ATP -	Trifosfato de adenosina
BAC -	Gene constitutivo beta actina
C -	Citosina
cDNA -	DNA complementar
CEP -	Comitê de ética em pesquisa
CFU- E -	<i>Colony- Forming Units – Erythroid</i>
CuZnSOD -	Superóxido Dismutase Cobre e Zinco
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS -	Óxido nítrico sintase
EPO -	Eritropoetina
EROs -	Espécies reativas de oxigênio
G -	Guanina
GAPDH -	Gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GSH-	Glutathiona
Hb -	Hemoglobina
HbF -	Hb fetal
HCM-	Hemoglobina corpuscular média
IgG -	Imunoglobulina G
IL-1 -	Interleucina 1
IL-6 -	Interleucina 6
kDa -	Kilodáltons
LCR -	Região controladora do locus
LDL-	<i>Low-density lipoprotein</i>
MAD -	Malondialdeído
MCP-	Morte celular programada
MetHb-	Metahemoglobina
MnSOD -	Superóxido dismutase manganês
MIF -	Migração dos macrófagos
NADPH -	<i>NicotinamideAdenineDinucleotidePhosphate</i>
NO -	Óxido Nítrico
Nox-	Oxidases
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
qRT-PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PHHF -	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PRDX -	Peroxirredoxina
Pro -	Prolina
PTEN -	<i>PhosphataseandTensinHomolog</i>
RNA -	Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub> -	RNA mensageiro
RPM -	Rotações por minuto

Sen -	Haplótipo Senegal
SOD-	Superóxido Desmutase
Srx -	Sulfirredoxina
T -	Timina
<i>t</i> -BOOH -	tert-butilhidroperóxido
TGF- $\beta$ 1 -	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> 1
Thr -	Treonina
TLR4 -	Toll-like receptor 4
Trx -	Tiorredoxina
TrxRs -	TiorredoxinasRedutases
VCAM-1 -	Molécula de Adesão do Endotélio Vascular-1
VCM-	Volume Corpuscular Médio
VSMC -	Células Vasculares do Músculo Liso

## LISTA DE SIMBOLOS

$\alpha$ -	Alfa
$\beta$ -	Beta
$\delta$ -	Delta
$\varepsilon$ -	Épsilon
$\gamma$ -	Gama
$\zeta$ -	Zeta
$\theta$ -	Teta
$\alpha^1$ -	Alfa 1
$\alpha^2$ -	Alfa 2
$\psi \alpha^1$ -	Pseudogene Alfa 1
$\psi \alpha^2$ -	Pseudogene Alfa 2
$\psi \beta$ -	Pseudogene Beta
$\psi \zeta^1$ -	Pseudogene Zeta
$\gamma^A$ -	Gama Adenina
$\gamma^G$ -	Gama Glicina
$O_2$ -	Oxigênio
$-CH=$ -	Radicais Metanílicos
$Fe^{++}$ -	Ferro Divalente
$\mu g$ -	Micrograma
$\mu L$ -	Microlitro
$\mu M$ -	Micromolar

## SUMÁRIO

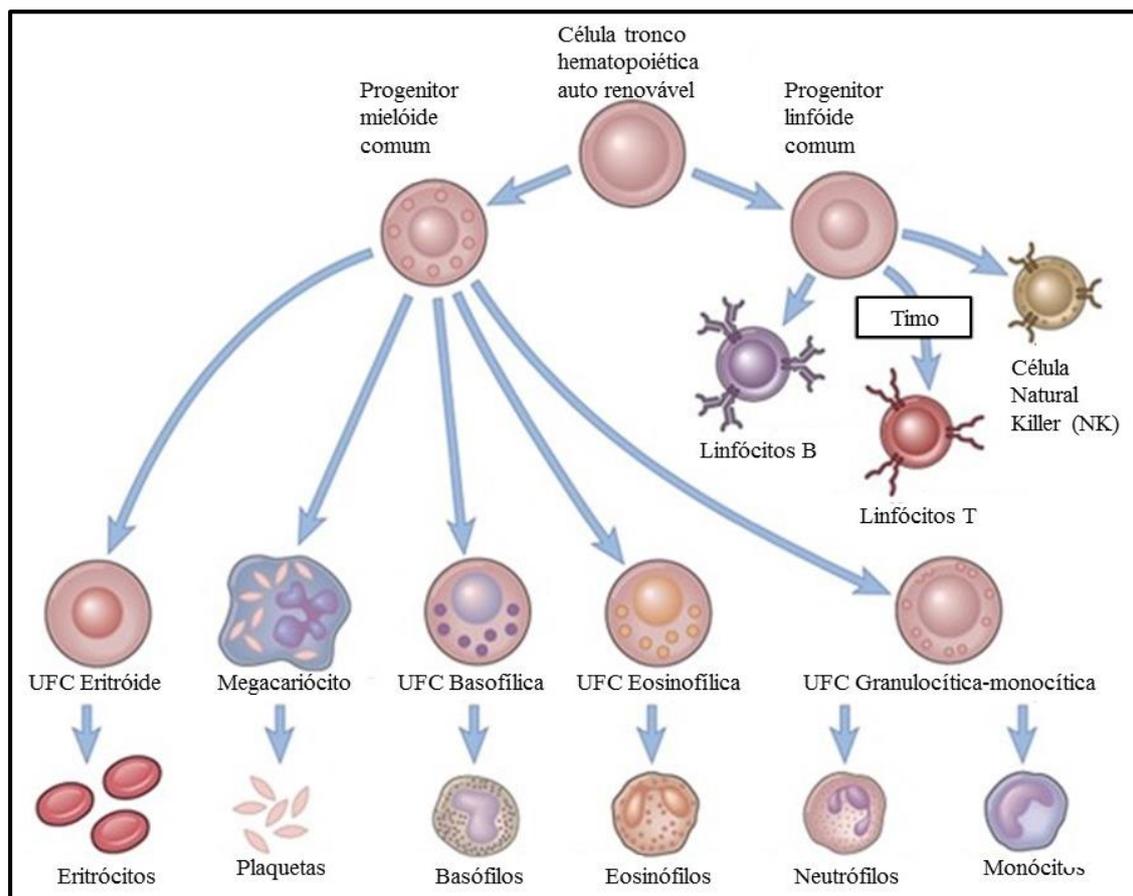
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Eritropoiese.....	13
1.2. O Eritrócito e a hemoglobina.....	14
1.2.1 A diferenciação.....	14
1.2.2 O grupo heme .....	16
1.2.3. As globinas .....	17
1.3. Hemoglobinopatias .....	18
1.4. Talassemias.....	19
1.4.1. Beta Talassemia.....	20
1.4.2.1. Beta Talassemia Menor .....	22
1.4.2.2. Beta Talassemia Maior .....	22
1.4.2.3. Beta Talassemia Intermediária .....	24
1.5. Eritrócitos e Espécies reativas de Oxigênio .....	24
1.5. 1. Peróxido de Hidrogênio.....	26
1.5. 2. Hidroperóxidos de Lipídeos e Peroxidação Lipídica .....	27
1.5. 3. Óxido Nítrico e a Formação de Peroxinitrito .....	28
1.5. 4. Ânion superóxido .....	29
1.6. Anemias Hemolíticas e Estresse Oxidativo.....	31
1.7 Defesas antioxidantes do organismo .....	32
1.8. Expressão gênica global em beta talassemia .....	33
1.8.1. ABCB10 .....	34
1.8.2. APEX1 .....	36
1.8.3. HMGB1 .....	37
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVOS.....	40
3.1. Objetivo geral .....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Pacientes e controles.....	41
4.2 Aspectos éticos da pesquisa.....	42
4.3 Separação de Reticulócitos.....	42
4.4 Extração de RNA.....	42
4.5 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	43

4.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	43
4.6.1 Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real.....	44
4.6.1.1 Concentração de Primer.....	44
4.6.1.2 Eficiência de Reação .....	45
4.7 Western blotting .....	46
4.7.1 Extração e quantificação de proteínas .....	46
4.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS.....	47
4.8 Cultura de células CD34 <sup>+</sup> .....	48
5. RESULTADOS .....	50
5.1 Análise da expressão gênica de ABCB10, APEX1 e HMGB1 em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com beta talassemia .....	50
5.2 Análise do conteúdo proteico de APEX1 no lisado celular de indivíduos saudáveis e com beta talassemia .....	51
5.3 Análise do conteúdo proteico de HMGB1 no plasma de indivíduos saudáveis e com beta talassemia.....	52
5.4 Análise da expressão gênica de ABCB10, APEX1 e HMGB1 em culturas de indivíduos saudáveis e beta talassêmicos.....	53
6. DISCUSSÃO .....	55
7. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS .....	60
8. REFERENCIAS .....	61
ANEXOS .....	70
Anexo 1 .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Eritropoiese

As células que compõe o sangue (eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e linfócitos) possuem uma origem em comum a partir de células-tronco pluripotentes hematopoiéticas. Destas, originam-se dois tipos de progenitores multipotentes: células-tronco mielóides comuns e células-tronco linfóides comuns. As células-tronco linfóides comuns dão origem a precursores de células T, células B e células *natural killer* (NK) e as células-tronco mielóides comuns originam três tipos de células-tronco comprometidas capazes de se diferenciarem em eritrócitos que darão origem as hemácias, os megacariócitos que darão origem as plaquetas e os leucócitos, como os eosinófilos, basófilos, neutrófilos e monócitos (figura 1) (ABBAS et al., 2005).



**Figura1. Hematopoese** (Adaptada de Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 6e).

O processo de maturação das células eritróides é denominado eritropoiese e tem como um de seus principais estimuladores o hormônio eritropoietina (EPO). A

eritropoietina é sintetizada pelas células do parênquima renal e do fígado e atua na proliferação e diferenciação das células progenitoras e precursoras da linhagem eritróide. Em estados de hipóxia tecidual o organismo aumenta a produção deste hormônio para compensar a perda periférica (AZEVEDO, 2008).

Nos seres humanos adultos a eritropoiese ocorre na medula óssea e durante a vida intrauterina ocorre inicialmente no saco vitelino e após o primeiro mês gestação, o fígado passa a ser o principal local de eritropoiese no período fetal. O baço também produz células sanguíneas nesse período. A partir do quarto mês intrauterino inicia-se a eritropoiese na medula, a qual aumenta conforme a produção hepática é reduzida. Após o nascimento, a eritropoiese passa a ser mais específica, ocorrendo nos ossos longos e medula óssea na fase da infância e restringindo-se em seguida apenas a medula óssea, no externo, bacia e extremidades ósseas (figura 2) (BONDURANT e KOURY, 1999; DESSYPRIS, 1999).

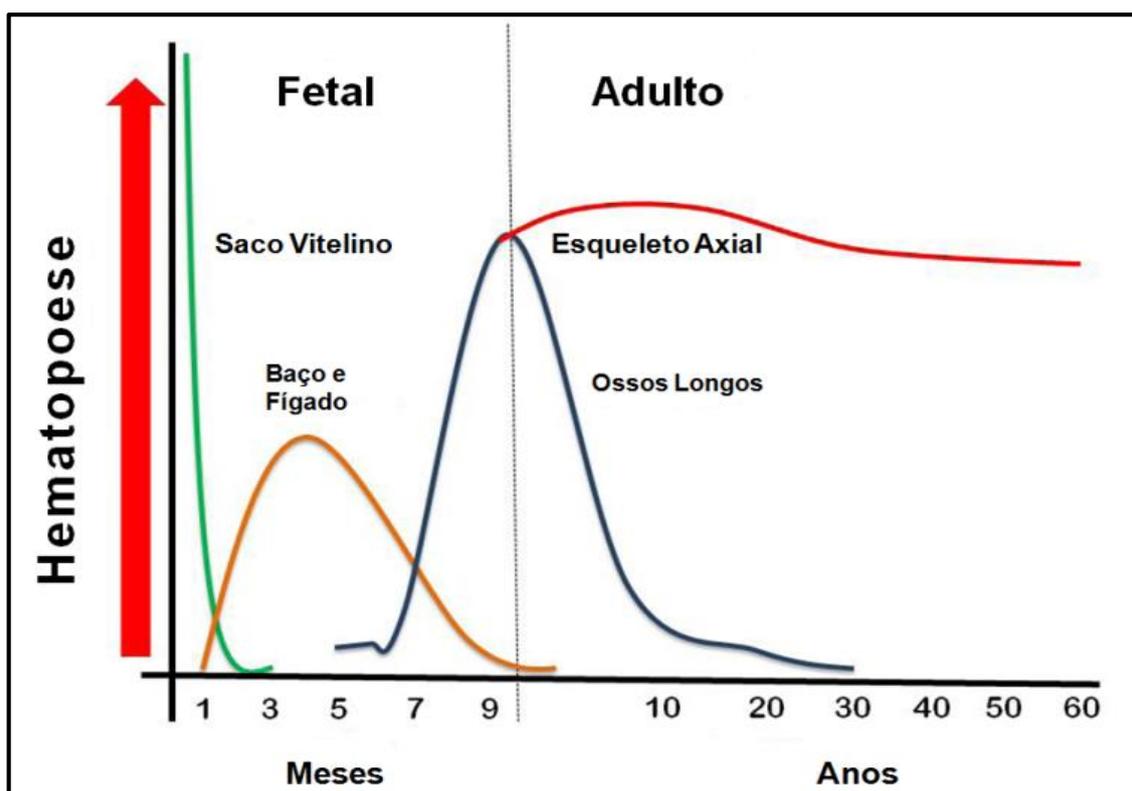
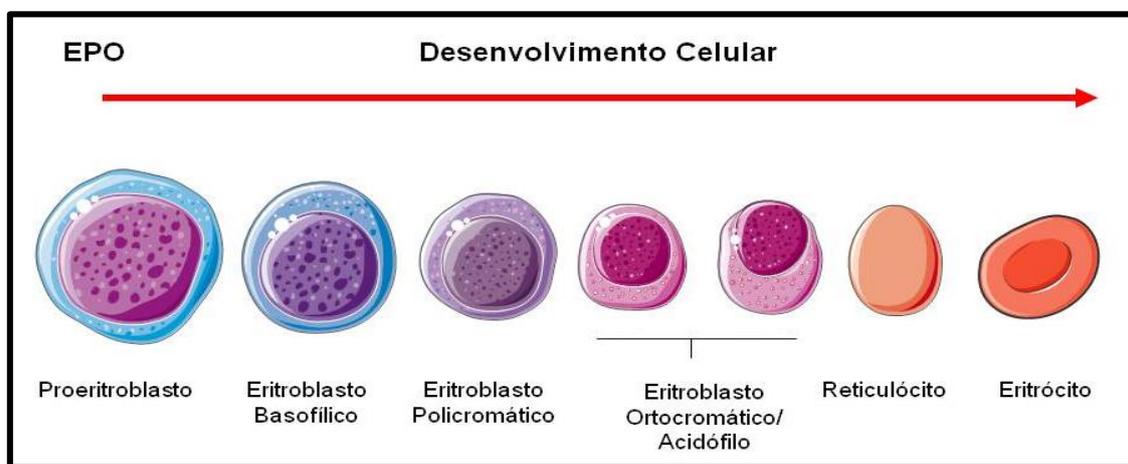


Figura 2. Períodos da hematopoese. (Figura adaptada de DA CUNHA et al., 2012)

## 1.2. O Eritrócito e a hemoglobina

### 1.2.1 A diferenciação

O processo de maturação do eritrócito envolve uma grande variedade de células em diferentes estágios. A primeira célula morfológicamente identificável como sendo da linhagem eritróide, é o proeritroblasto, que passa por várias modificações que levarão a célula a diferenciar-se em eritroblasto basofílico, eritroblasto policromático e eritroblasto ortocromático, sucessivamente. Nesta etapa, o núcleo torna-se picnótico e é expulso da célula formando o reticulócito, a qual é uma célula anucleada, mas que ainda contém resíduos de organelas no citoplasma como o retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos com RNA mensageiro. Os reticulócitos são liberados na circulação e se desenvolvem em eritrócitos maduros dentro de dois dias, os quais irão permanecer por 120 dias na circulação (figura 3) (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; HOFFMAN et al., 2008).



**Figura 3. Alterações morfológicas durante a eritropoiese em seres humanos.** (Figura adaptada de DA CUNHA, 2012)

Após 120 dias na circulação os eritrócitos sofrem uma série de alterações morfológicas, causadas principalmente pela redução de sua atividade metabólica e pela oxidação da hemoglobina (GHAFFARI, 2008). Estas alterações são reconhecidas pelo sistema mononuclear fagocitário presente no fígado e no baço, (TELEN e KAUFMAN, 1999; HOFFMAN et al., 2008).

O eritrócito tem como sua principal função transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos, função que é realizada pela hemoglobina (Hb), uma proteína tetramérica que representa 95% das proteínas totais do eritrócito. Uma molécula normal de hemoglobina possui estrutura globular e quaternária formada por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas, sendo duas do tipo alfa ( $\alpha$ ) e duas do tipo beta ( $\beta$ ), cada uma delas associada a um grupo prostético heme, formado por quatro núcleos pirrólicos, unidos entre si por radicais metanílicos ( $-\text{CH}=\text{}$ ), contendo um átomo de ferro divalente ( $\text{Fe}^{++}$ )

capaz de se ligar de modo reversível à molécula de oxigênio ( $O_2$ ) (figura 4) (PERUTZ et al., 1960; STEINBERG e BRUGNARA, 2003).

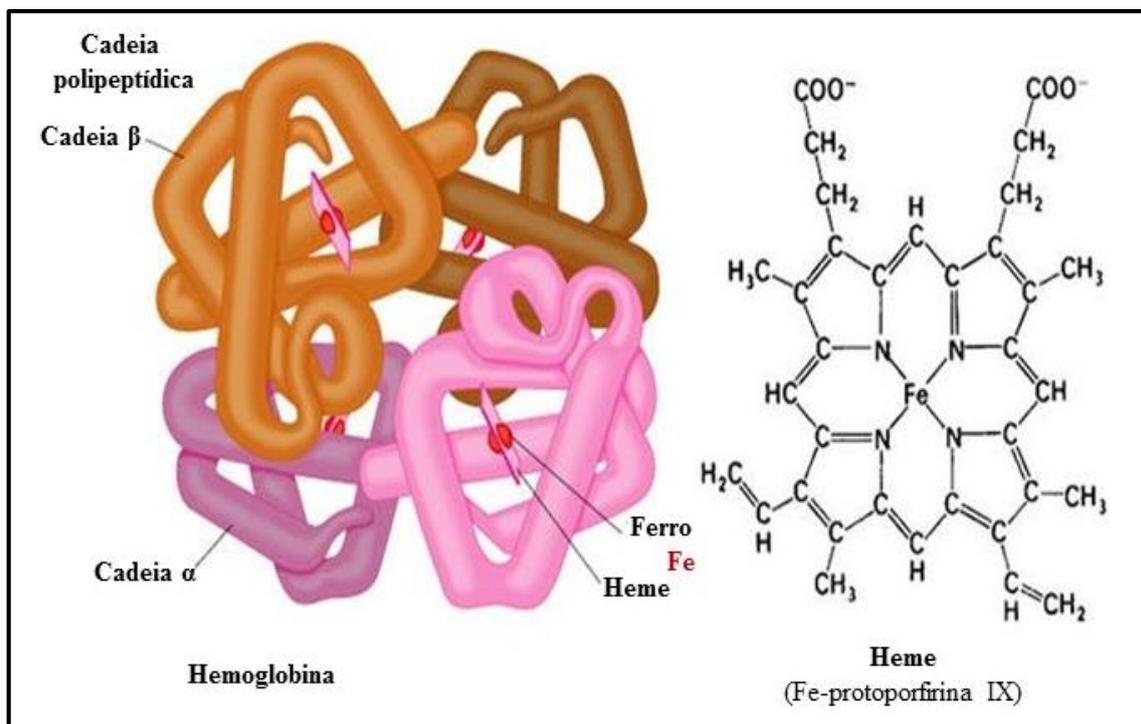
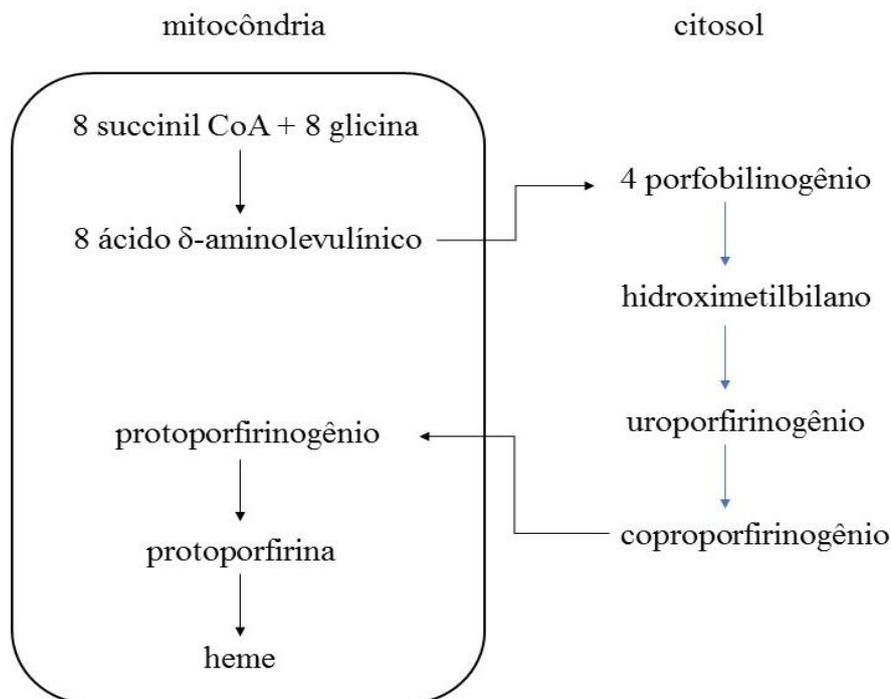


Figura 4. Representação da estrutura da molécula de hemoglobina adulta A1. (Adaptada de <http://biomedcast.com/wp-content/uploads/2016/09/3-Estrutura-Hemoglobina.jpg>)

### 1.2.2 O grupo heme

O estágio inicial da biossíntese de heme acontece na mitocôndria através da condensação de glicina e succinilCoA para formar ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) pela enzima ALA sintase 1/2 (ALAS1/2), cujos níveis são regulados pelo ferro e heme celular (HUNTER e FERREIRA, 2009). Um mecanismo ainda desconhecido é responsável então por exportar ALA para fora da mitocôndria, e a seguir, reações citosolicas convertem ALA em coproporfirinogênio III (CPgenIII). De volta a mitocôndria, CPgenIII é então convertido em protoporfirina IX (PPIX), através da inserção de ferro pela ferroquelatase (figura 5) (RYTER e TYRELL, 2000; KHAN e QUIGLEY, 2011).



**Figura 5. Biossíntese de heme.** (Adaptada de <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/Iron.html>)

A molécula de heme está presente em todos os tecidos, promovendo processos de oxidação, sendo uma peça vital para a homeostase do organismo. O complexo processo de formação, bem como seu papel oxidativo são de grande relevância para a sensibilidade oxidativa. Defeitos nesta via levam ao surgimento de doenças, sendo um dos exemplos mais conhecidos as porfirias.

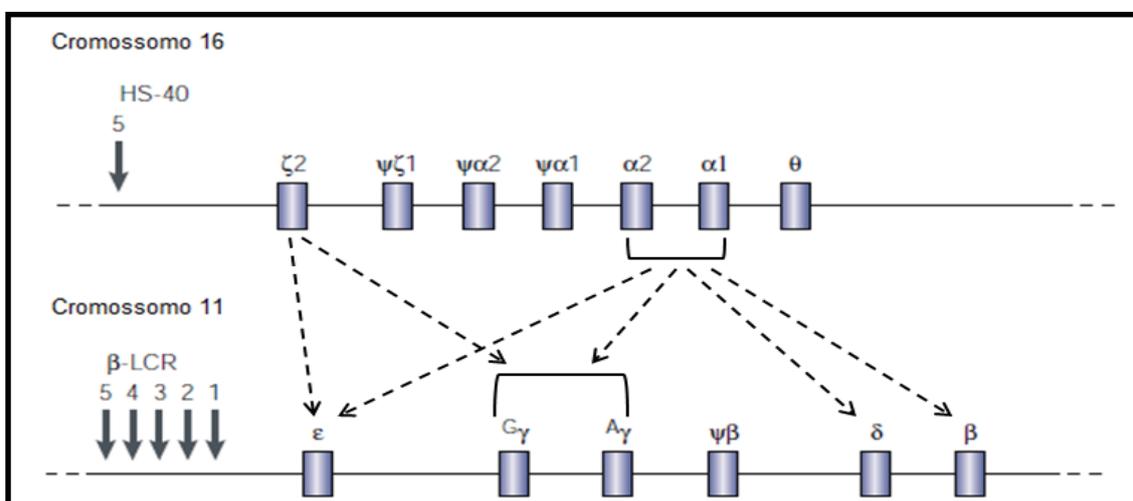
### 1.2.3. As globinas

As cadeias globínicas são sintetizadas por diferentes genes que se localizam em grupamentos cromossômicos distintos, o grupamento alfa ( $\alpha$ ) e o grupamento beta ( $\beta$ ). O grupamento  $\alpha$  situa-se no braço curto do cromossomo 16 e possui um gene zeta embrionário ( $\zeta_2$ ), os pseudogenes psizeta ( $\psi\zeta_1$ ), psi alfa 2 ( $\psi\alpha_2$ ), psi alfa 1 ( $\psi\alpha_1$ ), dois genes alfa ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , que não apresentam diferenças em sua região codificante) e um gene teta ( $\theta$ ) de função indeterminada, organizados no sentido  $5' \rightarrow 3'$ , na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento ontogenético normal (WEATHERALL, 2001; HIGGS, 2008).

O grupamento  $\beta$  localiza-se no braço curto do cromossomo 11 e é formado pelo gene embrionário épsilon ( $\epsilon$ ), pelos genes gama-alanina ( $\gamma^A$ ) e gama-glicina ( $\gamma^G$ ) (que

variam apenas em glicina ou alanina na posição 136) e são expressos durante período fetal, pelo pseudogene beta ( $\psi\beta$ ) e pelos genes delta ( $\delta$ ) e beta ( $\beta$ ) que são ativados no final do período fetal e se expressam completamente após pós-nascimento, estes genes também estão dispostos no cromossomo na mesma ordem em que são expressos (figura 6) (GROSVELD; DILLON; HIGGS, 1993; SCHECHTER, 2008).

Ao longo do desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem mudanças na expressão desses genes, formando os diferentes tipos de hemoglobinas humanas que existem (DZIERZAK, 2001). A principal hemoglobina do adulto, a hemoglobina A<sub>1</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ) aumenta progressivamente até que, no sexto mês de vida pós-natal, corresponde a aproximadamente 97% do conteúdo de hemoglobina total. (WEATHERALL e CLEGG, 1981; MIGLIACCIO e PAPAYANNOPOULOU, 2001; STEINBERG, 2005).



**Figura 6. Grupamento dos genes de  $\alpha$  e  $\beta$  globina e a produção de diferentes hemoglobinas durante o desenvolvimento humano.** Os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas estão organizados em dois grupamentos gênicos localizados em cromossomos diferentes. O grupamento  $\alpha$  localiza-se no braço curto do cromossomo 16, é constituído pelos genes  $\zeta_2$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\theta$  e pelos pseudogenes  $\psi\zeta_1$ ,  $\psi\alpha_2$ ,  $\psi\alpha_1$ . O grupamento  $\beta$  está situado no braço curto do cromossomo 11, e possui os genes  $\epsilon$ ,  $\gamma^A$  e  $\gamma^G$  (que variam na posição 136 em apenas uma guanina ou alanina), pelo e pelos genes delta  $\delta$  e  $\beta$  e o pseudogene  $\psi\beta$ . Durante o desenvolvimento ontogenético, ocorrem mudanças na expressão desses genes, formando os diferentes tipos de hemoglobinas humanas. Os mecanismos envolvidos na troca das cadeias globínicas incluem sítios hipersensíveis à DNase I (HS-40) no grupamento  $\alpha$  e a região controladora do locus (LCR) no grupo de genes  $\beta$  (figura adaptada de WEATHERALL, 2001).

### 1.3. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias representam as formas mais comuns de anemias hemolíticas hereditárias e resultam de mutações que alteram a expressão normal dos

genes da hemoglobina. Estas alterações são bastante heterogêneas e podem ser divididas em três grupos: (1) variantes estruturais (alteram a estrutura da proteína, mas não afetam sua taxa de síntese), (2) alterações de síntese, com a supressão parcial ou total da produção de uma ou mais cadeias globínicas, (3) Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), uma anomalia que se caracteriza pela persistência na produção de cadeias  $\gamma$  durante a vida adulta e caracteriza uma condição clinicamente benigna (WATANABE, 2007; SONATI e COSTA, 2008).

Estas patologias são as alterações autossômicas e monogênicas encontradas com maior frequência no mundo, sendo que aproximadamente 1.423 alelos mutantes já foram identificados e caracterizados molecularmente. A maioria destes alelos mutantes não resulta em manifestações clínicas e dentre os que apresentam fisiopatologia, os efeitos variam bastante, visto que, dependem do tipo de herança (homozigota ou heterozigota), assim como das interações genéticas e ambientais, e as manifestações podem variar de imperceptíveis até letais (LEONELI et al., 2000; OLD, 2007; HUISMAN et al., 2010).

Clinicamente, as principais hemoglobinopatias são as doenças falciformes (DF) e as talassemias, que afetam populações com origens no continente africano, região mediterrânea, sudoeste asiático, oriente médio e extremo oriente (KHATTAB; RAWLINGS, ALI, 2006; SONATI e COSTA, 2008). A seguir abordaremos com maiores detalhes as talassemias, mais especificamente a beta talassemia, a qual foi o foco deste trabalho.

#### **1.4. Talassemias**

Talassemias são um grupo de alterações genéticas caracterizadas por alterações quantitativas na síntese de uma ou mais subunidades das cadeias de globina, resultando consequentemente na produção deficiente de hemoglobina. As manifestações clínicas da talassemia estão intimamente relacionadas ao desbalanço na síntese de globinas, o que acarreta a ineficiência da eritropoiese e subsequentemente a anemia hemolítica. O quadro sintomático que envolve os talassêmicos pode variar desde a ausência de sintomas até manifestações clínicas que podem variar de uma anemia hipocrômica e microcítica ou alterações que se tornam incompatíveis com a vida (THEIN, 1998).

A classificação das talassemias é feita com relação a cadeia globinica cuja síntese está afetada, sendo a alfa e a beta talassemia as mais frequentes e com maior relevância clínica. Assim, na alfa talassemia as cadeias de  $\alpha$  globina estão ausentes ou diminuídas e na beta talassemia a produção de cadeias de  $\beta$  globina está alterada. Esta classificação

também é importante para subdividir os pacientes de acordo com o nível de produção de cada cadeia de globina, que pode ser reduzida (por exemplo, talassemia  $\alpha^+$  ou  $\beta^+$ ) ou ausente (por exemplo, talassemia  $\alpha^0$  ou  $\beta^0$ ) (HOFFMAN et al., 2008).

#### 1.4.1. Beta Talassemia

A beta talassemia é uma doença hematológica causada por alterações quantitativas na produção das cadeias de beta globina. Estas alterações podem ser classificadas como talassemias beta zero (ou talassemia  $\beta^0$ ) quando a síntese de globinas beta está ausente, e talassemias beta mais (ou talassemia  $\beta^+$ ) quando há redução na taxa de síntese, resultando na redução da síntese de hemoglobina, tais alterações causam uma anemia de graus variados, com características microcíticas e hipocrômicas (WEATHERALL, 2006).

Já foram descritas mais de 200 mutações ligadas a beta talassemia, sendo a maioria delas causadas por substituições, deleções ou inserções de nucleotídeos nos exons, introns e regiões promotoras dos genes beta. Estas mutações podem ser divididas em: (1) mutações na região promotora que afetam a transcrição de RNAm, (2) mutações em regiões de *splicing*, que atingem o processo do RNAm e levam a combinações deficientes, (3) mutações que resultam em códon de terminação e afetam a tradução, (4) mutações que alteram o sinal de poliadenilação, dificultando a adição da cauda de poli (A) ao RNAm, que se torna mais instável (tabela 1) (HOFFMAN et al., 2008; CAO e GALANELLO, 2010).

A incidência da beta talassemia é maior em populações com origem no Mediterrâneo e Sudeste Asiático. No Brasil, a frequência de portadores na população caucasiana é de aproximadamente 1%, sendo os alelos  $\beta^0$  39 (C→T),  $\beta^+$ -IVS-I-6 (T→C),  $\beta^+$ -IVS-I-110 (G→A) e  $\beta^0$ -IVS-I-1 (G→A) responsáveis por quase todos os casos nas Regiões Sul e Sudeste; na Região Nordeste, além destes, o alelo  $\beta^+$ -IVS-I-5 (G→C) representa 9,3% dos alelos encontrados em  $\beta$ -talassêmicos. A mutação  $\beta^0$  CD39 apresenta frequência de 50 a 60% no Sudeste brasileiro, não chegando a 5% no Nordeste, sendo a  $\beta^+$ -IVS-I-6 predominante nesta população (ARAÚJO et al., 2003; WENNING e SONATI, 2007; SONATI e COSTA, 2008).

**Tabela 1. Exemplos das mutações de ponto mais frequentes que causam talassemias, segundo sua localização na molécula, o defeito funcional que provocam e o resultado sobre a síntese de globinas (Extraído de ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005)**

<i>Defeito</i>	<i>Tipo de Talassemia</i>
<b>mRNA não- funcional</b>	
<b>1.Códon de Término Prematuro</b> CD 15 G→A, CD 17 A→T, CD 35 C→A, CD 39 C→T, CD 43 G→T, CD 121 A→T	$\beta^0$
<b>2.Pequena Deleção com Deslocamento de Bases (<i>frameshift</i>)</b> CD 5 -CT, CD 6 -C, CD 8/9 +G, CD 16 -C, CD 35 -C, CD 41/42 -TTCT, CD 76 -C, CD 109/110 1nt del	$\beta^0$
<b>3.Mutação do Códon de Início ATG</b> ATG→AGG, ATG→ACG	$\beta^0$
<b>Processamento Anormal do RNA</b>	
<b>1.Mutações Internas nos Íntrons</b> IVS-1 nt 110 G→A, IVS-2 nt 705 T→G, IVS-2 745 C→G IVS-1 nt 116 T→G, IVS-2 nt 654 C→T	$\beta^+$
<b>2.Ativação de Sítios Crípticos de <i>Splicing</i></b> CD 19 A→G, CD 26 G→A, CD 27 C→T	$\beta^{+*}$
<b>3.Mutações nos Limites Exon- Íntron</b> IVS-1 nt 1 G→A, IVS-1 nt 1 G→T, IVS-1 nt 2 T→G, IVS-2 nt 849 A→G, IVS-2 nt 849 A→C	$\beta^0$
IVS-1 nt 5 C→G, IVS-1 nt 5 G→T, IVS-1 nt 128 T→G, IVS-2 nt 843 T→G	$\beta^+$
<b>4.Redução da Transcrição do mRNA (mutações na região promotora)</b> -101 C→T, -92 C→T, -88 C→T, -31 A→G, -30 T→A, -28 A→C	$\beta^+$
<b>Mutações do Sítio de Poliadenilação do mRNA (AATAAA)</b> AACAAA, AATAAG, AATGAA, AATAGA, A (del AATAA)	$\beta^+$
<b>Mutações Estruturais (cadeias alongadas ou hiperinstáveis)</b> CD 49 +TG (HbAgnana), CD 110 TC (HbShowa- Yakushiji), CD 114 -CT +G (Hb Genebra)	$\beta^+$
<i>* Nestes casos, a mutação na região codificadora determina a troca de um aminoácido na cadeia e a síntese de hemoglobinas com estrutura anormal (denominadas, respectivamente, HbMalay, HbE e HbKnossos), e devido ao defeito no processamento, a hemoglobina mutante é produzida em ritmo reduzido</i>	

Adicionalmente, a beta talassemia é classificada clinicamente como: (1) beta talassemia menor ou traço beta talassêmico, nestes casos, os indivíduos geralmente são assintomáticos; (2) beta talassemia maior ou anemia de Cooley, corresponde à forma mais grave da doença, na qual os indivíduos acometidos são dependentes de transfusões regulares; (3) beta talassemia intermediária, representa os fenótipos clínicos intermediários entre o traço talassêmico e a talassemia maior e também necessitam de transfusões, no entanto com menor frequência que o paciente beta talassêmico maior (SONATI e COSTA, 2008).

#### 1.4.2.1. Beta Talassemia Menor

Beta talassemia menor ou traço beta talassêmico corresponde a heterozigose de  $\beta^0$  ou  $\beta^+$ , nesta forma clínica a diminuição na produção de beta globina não é muito acentuada, porém é suficiente para causar uma anemia discreta. Normalmente, os portadores do traço beta talassêmico são assintomáticos e não necessitam de tratamento, contudo estes indivíduos podem apresentar anemia em situações que envolvem algum tipo de estresse fisiológico. Clinicamente, as manifestações quando presentes podem incluir astenia, cansaço e esplenomegalia. É importante que o diagnóstico seja realizado devido à necessidade de aconselhamento genético e a prevenção da administração equivocada de compostos de ferro aos portadores (BANK, 2005; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; HUISMAN et al., 2001; SONATI e COSTA, 2008).

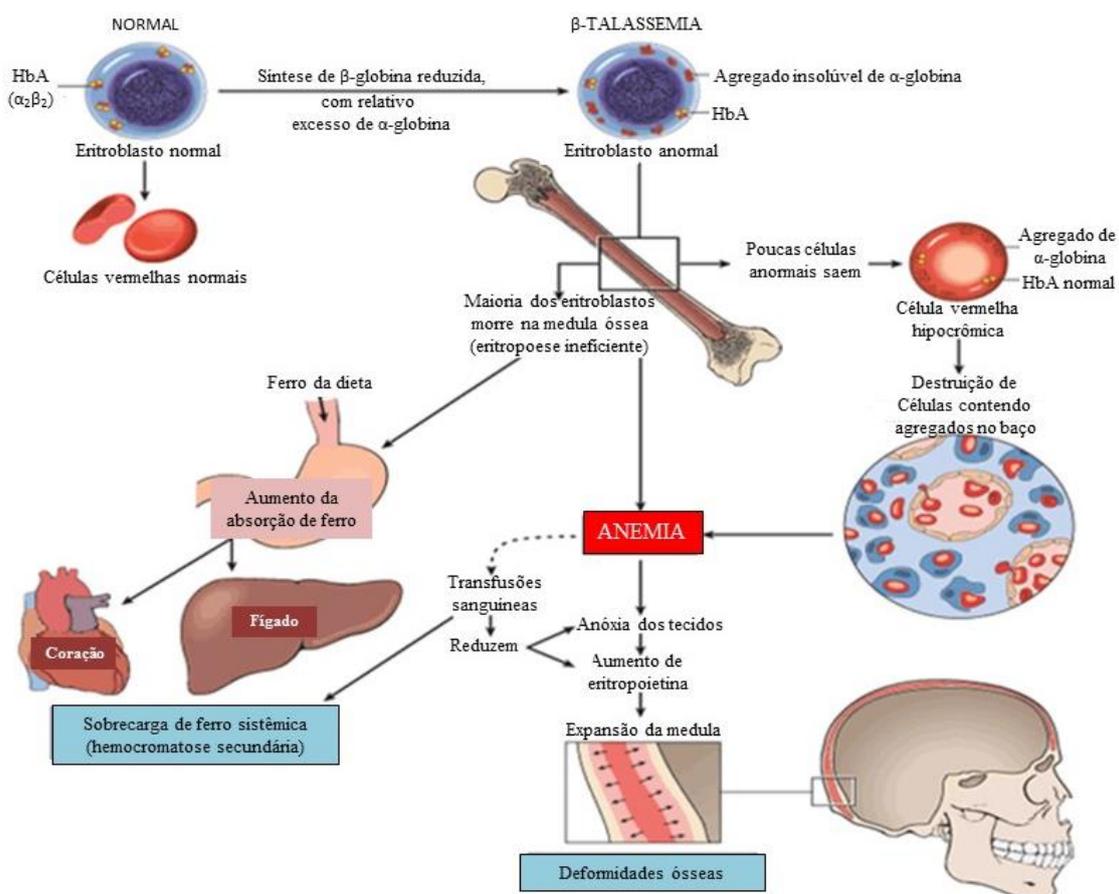
Os achados laboratoriais referentes à beta talassemia menor incluem aumento da concentração de Hb A<sub>2</sub> (>4%-7%) em 90% dos portadores, diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM) e do volume corpuscular médio (VCM), alterações na morfologia dos eritrócitos, especialmente, microcitose e hipocromia com presença de esquizócitos, dacriócitos e pontilhados basófilos. A concentração de hemoglobina se apresenta em torno de 9 a 11 g/dL e o nível de Hb F pode estar elevado em aproximadamente cinquenta por cento dos casos, geralmente de 1 a 3% e raramente mais que 5% (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; WEATHERALL, 2006).

#### 1.4.2.2. Beta Talassemia Maior

A beta talassemia maior se caracteriza tanto pela homozigose  $\beta^+$  quanto  $\beta^0$  ou pela dupla heterozigose  $\beta^+/\beta^0$ . A grave deficiência ou ausência da síntese de beta globina causa grave anemia (Hb < 6,0g/dL) em virtude da ineficiência da eritropoiese e ao sequestro das hemácias no baço. O desbalanço na síntese de beta globina resulta no acúmulo de cadeias alfa, as quais formam complexos instáveis que precipitam e levam a destruição celular prematura (figura 6). Os efeitos da beta talassemia maior normalmente só são notados após o sexto mês de vida do indivíduo, visto que antes deste período a hemoglobina predominante é a HbF. Após, a doença se manifesta na forma de grave anemia (Hb entre 3-5g/dL) e icterícia. A destruição precoce das células eritróides que ocorre na medula óssea e na periferia estimula a proliferação e maturação dos eritroblastos, levando a

expansão medular e consequentes deformidades ósseas (figura 6) (WEATHERALL e CLEGG, 1981; MAGGIO; CARONIA; RUSSO, 2000).

As manifestações clínicas da beta talassemia maior incluem fadiga, insuficiência cardíaca congestiva, caquexia, esplenomegalia, compressão da medula espinal e retardo do crescimento. A hemólise crônica resulta em litíase biliar, formação de úlceras em membros inferiores e hipertensão pulmonar. A grande maioria dos indivíduos que apresentam essa forma clínica da doença precisa de transfusões regulares, que ao longo do tempo acarretam em sobrecarga de ferro nos tecidos e órgãos, causando complicações cardíacas, hepáticas e endócrinas como a pigmentação escura e metálica da pele, diabetes, hipopituitarismo, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo, cirrose, arritmias cardíacas e miopatia, principais causas de morte, por isso a terapia quelante deve ser aplicada de forma precoce (figura 7). Além disso, alguns pacientes podem manifestar doenças infecciosas como complicações das recorrentes transfusões (CAPPELLINI et al., 2008; SONATI e COSTA, 2008).



**Figura 7. Patogênese da beta talassemia maior.** (Adaptado de <https://www.slideshare.net/alanisaad/the-thalassemias-16947358>)

### 1.4.2.3. Beta Talassemia Intermediária

As manifestações clínicas da beta talassemia intermediária podem ser influenciadas por diferentes fatores, dentre os quais a interação entre um gene beta talassêmico leve com um gene beta talassêmico grave, a associação dos genótipos  $\beta^0$  e  $\beta^+$  e também mutações no gene alfa. Sujeitos  $\beta^0\beta^+$  podem apresentar manifestações clínicas que variam de leves a graves. Esta variação fenotípica acontece quando a expressão de um gene altera a expressão do outro gene (AESSOPOS; BERDOUKAS; TSIRONI, 2007). Na maior parte dos casos a beta talassemia com clinica intermediária é causada por mutações  $\beta^+$  ( $\beta^+/\beta^+$ ) e as mutações mais frequentes são -101 (C→T), -87 (C→T), -88 (C→T), -29 (A→G) e a IVS-I-6 (T→C) (FORGET, 2001).

Quando comparados a beta talassêmicos maiores, os pacientes intermediários mostram manifestações clínicas mais favoráveis, apresentando anemia crônica moderada com níveis de hemoglobina de 6-9 g/dL, não dependendo de transfusões regulares. Normalmente, os sintomas e o reconhecimento da anemia ocorrem mais tarde, geralmente, após o segundo ano de vida (WEATHERALL, 1990).

Clinicamente, as manifestações mais comuns são deformidades ósseas faciais, úlceras em membros inferiores, icterícia intermitente, episódios recorrentes de litíase biliar e esplenomegalia progressiva. Ao longo do tempo os indivíduos podem apresentar complicações devido à expansão medular, como as anormalidades ósseas, osteoporose, retardo no crescimento, infertilidade, sobrecarga de ferro tecidual em virtude do aumento da absorção gastrointestinal de ferro resultante da anemia e hipercoagulabilidade. Adicionalmente, alguns indivíduos podem desenvolvem hipertensão pulmonar grave semelhante à encontrada em outras anemias hemolíticas crônicas. É de suma importância do diagnóstico clínico diferencial entre beta talassemia intermediária e maior, visto que este irá direcionar o tratamento ministrado (BANK, 2005; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; WEATHERALL, 2006; SONATI e COSTA, 2008).

## 1.5. Eritrócitos e Espécies reativas de Oxigênio

As células têm seu estado oxidativo definido pelo equilíbrio na produção de agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Os pró-oxidantes são denominados de espécies reativas de oxigênio (EROS), enquanto os antioxidantes são mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que, em situação normal, regulam a quantidade das EROs geradas. As

EROS são produtos gerados pela redução incompleta do oxigênio molecular durante processos metabólicos comuns, exposição a agentes externos como cigarro, radiação, carcinógenos, drogas e ozônio, e internos, como durante a resposta inflamatória, atividade da NADPH oxidase, xantina oxidase e da cadeia transportadora de elétrons (figura 8) (MASAKI, 2010). Estes compostos participam em diversos processos celulares como envelhecimento, proliferação e sinalização em células saudáveis, entretanto quando as EROs excedem a capacidade das enzimas antioxidantes das células, estas são responsáveis por oxidações de biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, causando danos a organelas celulares e morte celular (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

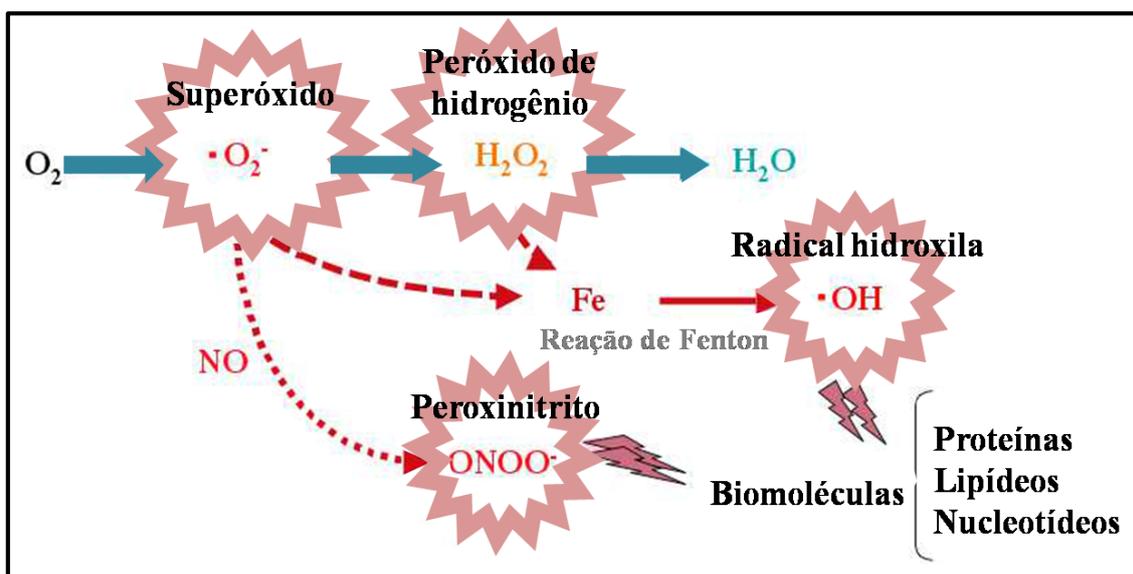


Figura 8: Geração de EROs. (Adaptada de IUCHI, 2012)

Como dito anteriormente, EROs como o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) são gerados durante o metabolismo aeróbico normal (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Durante a fosforilação oxidativa, um pequeno número de elétrons "vazam", reduzindo o oxigênio molecular a  $O_2^{\cdot -}$ . Estima-se que, aproximadamente 0,1 a 1% de todo o produto da cadeia transportadora de elétrons escapem na forma de  $O_2^{\cdot -}$ , o qual pode ser convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por dismutação espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Estas moléculas através de reações que envolvem metais de transição como as reações de Fenton e Haber Weiss (descritas nas próximas seções) podem formar  $\cdot OH$  que por sua vez, é altamente reativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Vários processos patológicos estão associados à formação desequilibrada dessas moléculas (STADTMAN, 1990) e nesse sentido o eritrócito torna-se uma célula interessante neste campo de estudo, pois apesar de não possuir

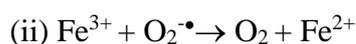
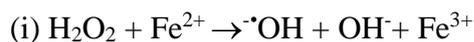
mitocôndrias, as EROs são produzidas constantemente em razão das grandes tensões de  $O_2$  e altas quantidade de ferro presentes no grupamento heme da hemoglobina (DUMASWALA et al., 1999; CIMEN, 2008).

Moléculas como  $O_2^{\cdot -}$  que são carregadas e o  $\cdot OH$  que é altamente reativo, geralmente permanecem no local onde são produzidas. No entanto, o  $H_2O_2$ , por não possuir carga e ser moderadamente reativo, pode transitar pelas membranas celulares e atingir diferentes compartimentos celulares ou mesmo células que se encontram fisicamente próximas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), sendo mais um ponto importante no estudo das células vermelhas que trafegam pelo corpo inteiro interagindo com outros diferentes tipos celulares. Adicionalmente ao  $H_2O_2$ , outros hidroperóxidos como os hidroperóxidos de lipídeo (L-OOH) e peroxinitritos ( $ONOO^{\cdot -}$ ), também possuem grande importância biológica e serão descritos com maiores detalhes a seguir.

### 1.5. 1. Peróxido de Hidrogênio

Mesmo não sendo muito reativo o  $H_2O_2$  é capaz de oxidar tióis de proteínas, levando a formação de vários produtos, entre os quais dissulfetos inespecíficos entre proteínas, que podem resultar em agregação e consequente perda de atividade. Por outro lado, ele pode reagir com metais dando origem ao radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), que é extremamente reativo e capaz de atacar rapidamente as biomoléculas no local onde é gerado. Este radical pode ser formado através da reação de Fenton que envolve a redução do  $H_2O_2$  pelo íon de um metal de transição como o  $Fe^{2+}$  (reação i). O metal oxidado produzido na reação de Fenton pode ser reduzido pelo  $O_2^{\cdot -}$ , (ii). A soma das reações (i) e (ii) corresponde a reação de Haber-Weiss (iii) que é catalisada por metais. Reações similares podem também ocorrer com peróxido derivados de lipídeo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

#### Reação de Fenton



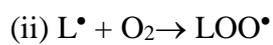
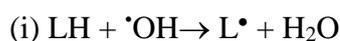
#### Reação de Harber-Weiss



Como é possível notar na reação acima, o ferro apresenta um papel crucial na geração de  $\cdot\text{OH}$ , sendo que em sua presença, a toxicidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser potencializada em até 1000 vezes. Este metal é encontrado em grande abundância no organismo humano, ligado a uma grande variedade de proteínas, participando dessa forma de inúmeras reações bioquímicas de oxirredução. É importante voltar a ressaltar que nos eritrócitos a hemoglobina, que corresponde a aproximadamente 30% do peso seco desta célula, apresenta no grupamento heme a molécula de ferro ligada as subunidades que compõem esta proteína. (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

### 1.5. 2. Hidroperóxidos de Lipídeos e Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica pode ocorrer em qualquer lipídeo que possua uma insaturação ou que seja poli-insaturado como os ácidos graxos de cadeia longa, fosfolipídios, glicolipídios bem como a molécula de colesterol (GIROTTI, 2008). O esquema abaixo sintetiza o processo de peroxidação lipídica.



A primeira etapa deste processo é denominada de iniciação e se caracteriza pelo ataque de uma espécie reativa como o  $\cdot\text{OH}$ , capaz de abstrair o átomo de H de um metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) (i). Uma vez que o hidrogênio possui somente um elétron a abstração deixa um elétron desemparelhado na última camada do carbono formando o radical alquila ( $-\cdot\text{CH}$ ), este se combina com o  $\text{O}_2$  para formar o radical peroxil (ii) o qual é capaz de abstrair um átomo de H de outro lipídeo insaturado (resultando em um novo radical alquil), para formar um peróxido de lipídeo e desta forma iniciar uma reação em cadeia (GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Esta etapa da reação é denominada de propagação. Assim como para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a presença de  $\text{Fe}^{2+}$  estimula a peroxidação através da decomposição do peróxido de lipídeo LOOH gerando as espécies radicalares alcóxil ( $\text{LO}\cdot$ ) e peroxil ( $\text{LO}_2\cdot$ ) (iv) (figura 8).

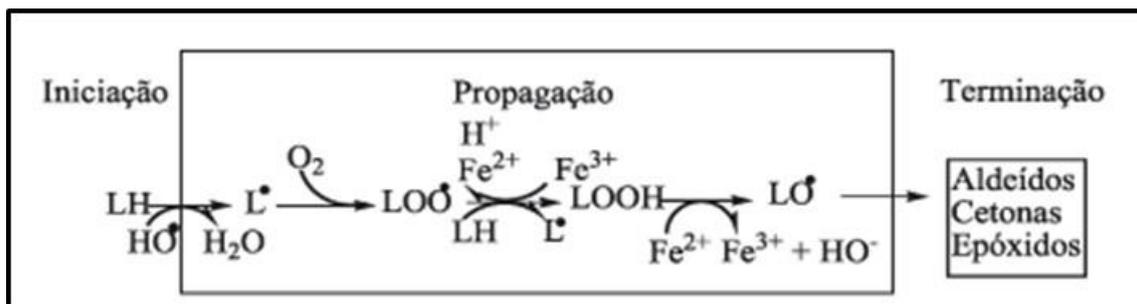


Figura 9. Fases da peroxidação lipídica. (Figura adaptada de DOS SANTOS, 2007)

As constantes para esta reação são de  $1.5 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$  na presença  $Fe^{2+}$  e são significativamente maiores que as alcançadas pela reação de Fenton para  $H_2O_2$  as quais possuem taxas de  $76 \times 10 M^{-1} s^{-1}$  (GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Devido à grande afinidade entre os lipídeos presentes na membrana plasmática e as proteínas de membrana, que podem chegar até 50% de sua composição, a peroxidação lipídica causa importantes danos às proteínas constituintes (GUTTERIDGE, 1995). A peroxidação lipídica das membranas biológicas ocasiona perda de fluidez, queda do potencial de membrana, aumento da permeabilidade ao  $H^+$  e outros íons que levam a ruptura e extravasamento do conteúdo celular (GIROTTI, 2008). Além disso, alguns produtos da fragmentação lipídica são citotóxicos (ESTERBAUER, 1993; CATALA, 2009). Já foi demonstrado que a incubação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) com eritrócitos submetidos a estresse oxidativo, faz com que as LDL ganhem progressivamente peróxidos de colesterol ( $ChOOH$ ) provenientes da membrana eritrocitária (VILA; KORYTOWSKI; GIROTTI, 2002). Este fenômeno pode ter grande importância uma vez que os  $LOOH$  podem gerar reações em cadeia na presença de metais de transição e possuir um importante papel arterogênico (STEINBERG et al., 1989; GIROTTI, 2008).

### 1.5. 3. Óxido Nítrico e a Formação de Peroxinitrito

O óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $NO_2^\bullet$ ) também são espécies radiculares, visto que apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Inicialmente, o interesse biológico no  $NO^\bullet$  ocorreu após a descoberta que o tecido vascular endotelial e outras células do corpo são capazes de produzir pequenas quantidades a partir do aminoácido (AA) arginina (MONCADA e HIGGS, 1991; HALLIWELL, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Este composto está relacionado com processos celulares de grande importância como vaso constrição/vaso

dilatação, agregação plaquetária, inibição da adesão celular, resposta do sistema imunológico, dentre outros (MONCADA e HIGGS, 1991; DESSY et al., 2004). Entretanto, o  $\text{NO}^\bullet$  pode reagir com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para formar um intermediário bastante reativo o peróxido de nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Esta espécie é um poderoso oxidante capaz de causar danos em diversas biomoléculas e em pHs ácidos pode se decompor em dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) e  $^\bullet\text{OH}$  independente da catálise realizada por metais de transição (GUTTERIDGE, 1995; SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007) de acordo com a reação abaixo:



No interior das membranas o peroxinitrito pode reagir com proteínas integrais e/ou periféricas através de centros metálicos proteicos, ou tióis. Ainda no interior das membranas biológicas, esta molécula pode se decompor em  $\text{NO}_2$  e  $^\bullet\text{OH}$  os quais atuarão na peroxidação lipídica e nitrosilação de lipídeos, proteínas e DNA. No caso do DNA reagindo especialmente com purinas formando 8-oxo e 8-nitroguanina. A reação de NADH com peroxinitrito pode resultar na formação de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (GOLDSTEIN e CZAPSKI, 2000).

#### 1.5. 4. Ânion superóxido

O  $\text{O}_2$  é considerado uma fonte das EROs que agem como mediadores da hemólise oxidativa, uma vez que adição de um elétron é capaz de gerar o radical ânion superóxido (SCOTT et al, 1989). Nos eritrócitos, a espécie  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é formada principalmente através de duas fontes: 1) auto oxidação da hemoglobina (Hb) em metahemoglobina (MetHb) a qual gera  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (GIULIVI e DAVIES, 1990) e 2) Através da oxidação do Ferro hemicromo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) que indica que o elétron foi perdido durante sua oxidação através de fontes externas como drogas, por exemplo (HEBBEL et al., 1982). Esta espécie é capaz de atacar diretamente as membranas das células vermelhas causando alterações nos lipídeos e na estrutura das proteínas (CLASTER et al., 1984).

Sendo assim, conforme já dito anteriormente, a fonte primária de EROs no eritrócito é a própria proteína carreadora de  $\text{O}_2$ , ou seja, a Hb que sofre auto oxidação produzindo o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Considerando que a concentração de Hb no interior do eritrócito é

muito alta, ao redor de 5mM, mesmo uma pequena parcela que sofre auto oxidação pode produzir altos níveis de EROs. A redução ocasional do  $O_2$  em  $O_2^{\bullet-}$  é acompanhada da oxidação do átomo de ferro da hemoglobina, formando a metahemoglobina, a qual não é mais capaz de transportar  $O_2$ . Dessa forma, caso ocorra o rompimento desta célula estes elementos possuirão um grande potencial de danificar outros componentes da circulação e tecidos (JOHNSON et al., 2005). No caso do transporte de oxigênio, o ferro necessita estar na sua forma reduzida, caso isto não ocorra este pode se desprender da Hb. Nos eritrócitos humanos aproximadamente 3% do total das moléculas de Hb se transformam em MetHb diariamente, através de reações de Hb com o  $O_2$ . Esta MetHb pode ser reduzida pela via NADH citocromo ou pela via 5-metHb redutase e metHbredutase dependente de NADPH (KENNETT et al., 2005).

Nos eritrócitos o  $O_2^{\bullet-}$  é dismutado pela superóxido dismutase(SOD), gerando grandes quantidades de  $H_2O_2$  que pode difundir-se livremente pela célula, ao contrário do  $O_2^{\bullet-}$  que necessita de canais aniônicos para sair (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Este composto também pode vir de fontes extracelulares devido à alta permeabilidade desta ERO na membrana do eritrócito. Neste contexto, um fato de grande importância é que o eritrócito é considerado um “coletor” e decompositor universal de  $H_2O_2$  dos organismos de uma vez que possui acesso a praticamente todos os tecidos do corpo, além do número destas células ser extremamente abundante (AGAR et al., 1986; BROWN et al., 1989; AOSHIBA et al., 1999; WINTERBOURN e HAMPTON, 2008; XU et al., 2008).

Assim, a Hb encontra-se constantemente sob o efeito do  $H_2O_2$ , resultando em oxidações proteicas que podem ser utilizadas como sinais seletivos para proteólise nos eritrócitos (GIULIVI e DAVIES, 2001). Além disso, existem evidências que o aumento do  $H_2O_2$  está diretamente relacionado com a peroxidação lipídica e hemólise através da formação de um complexo ligado covalentemente entre espectrina e Hb que promove diversas modificações na forma e deformabilidade da membrana além de interferir na organização dos fosfolipídios da superfície celular (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008). O quadro descrito acima ocorre devido à reação de Fenton (descrita em detalhes anteriormente) onde o  $H_2O_2$  reage com o Ferro gerando o radical  $\cdot OH$ . Devido a abundância de  $O_2$  no meio celular dos eritrócitos, este metal parece ser de grande importância na formação de espécies radiculares. Esta reação pode resultar na formação de complexos Fe-O, denominados de íons ferril ou preferril os quais possuem um poder oxidante extremamente elevado (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

Ao longo do processo de diferenciação eritrocitária, produzida a partir de células tronco da medula óssea, particularmente a partir da formação dos eritroblastos ortocromáticos, estas células perdem importantes organelas como núcleo, mitocôndria e ribossomos (VOLPE, 1993; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001). Desta forma, os eritrócitos não possuem a capacidade de se dividir, realizar síntese proteica, realizar a fosforilação oxidativa ou mesmo sintetizar novas membranas biológicas. Em vista disso, todos os lipídeos encontrados na célula eritrocitária madura são pertencentes a bicamada lipídica sintetizada durante o processo de maturação e consistem de fosfolipídios e colesterol na proporção molar de 1.2: 1, sendo que ~50% deles são insaturados (TELEN e KAUFMAN, 1999).

### **1.6. Anemias Hemolíticas e Estresse Oxidativo**

Como já mencionado, os eritrócitos possuem uma vida média de 100-120 dias, sendo posteriormente fagocitados no baço, fígado e medula óssea. O envelhecimento destas células parece ser um processo multifatorial sendo que os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente esclarecidos (CAPRARI et al., 1999). Uma das explicações seria a teoria do envelhecimento através de EROs, na qual a degradação destas células são resultado de danos oxidativos acumulados em biomoléculas com o passar do tempo de vida (TANG, 1997; INOUE et al., 2004; MULLER et al., 2007).

Em situação normal, a destruição dos eritrócitos acontece na mesma razão que a eritropoiese de forma a manter o número de eritrócitos circulantes. Este processo é resultado principalmente da formação de agregados de proteínas de banda 3, que é uma das proteínas mais abundantes na membrana do eritrócito, e que são estabilizados por moléculas de hemoglobina oxidada, conhecida como hemicromo. Isso causaria a perda da assimetria dos lipídeos de membrana através do reconhecimento desses agregados como antígenos por anticorpos IgG e do sistema complemento (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001).

As anemias hemolíticas se caracterizam pela destruição dos eritrócitos antes da sua duração normal de 120 dias e pela ineficiência da medula óssea de repor as células destruídas, levando a redução do número de células vermelhas circulantes e consequente anemia sangue (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004). O estresse oxidativo é responsável por agravar os sintomas de inúmeras doenças como as anemias hemolíticas. Mesmo não sendo a causa primária destas doenças, o dano oxidativo desempenha para as células eritróides um papel crucial na hemólise devido à eritropoiese ineficaz na medula

óssea e a curta sobrevivência das células vermelhas na circulação (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

Diversos estudos mostram que eritrócitos humanos expostos ao estresse oxidativo apresentam diversas alterações celulares como denaturação oxidativa da Hb, lipídeos de membrana peroxidados e diversas proteínas de membrana agregadas, formando complexos de alto peso molecular. Por isso, a morte celular programada (MCP) de eritrócitos é bastante aumentada em diversas doenças hematológicas como, por exemplo, na beta talassemia, que será foco deste trabalho (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008; PANDEY e RIZVI, 2010; RUSANOVA et al., 2010).

A modulação das EROs parece ter uma relação muito estreita com a fisiopatologia de diversas doenças hematológicas, principalmente nas anemias hemolíticas, tais como alfa e beta talassemias e na anemia falciforme. Dados em publicação de nosso grupo avaliaram a concentração de EROs em diversos tipos celulares, observando um grande aumento na presença destes nos pacientes com anemias hemolíticas. Nestas patologias, o ambiente celular é extremamente pró-oxidante seja por conta da geração ineficiente de NADPH, seja pela formação de MetHb resultando em danos oxidativos e consequente hemólise das células que por sua vez favorecem a formação dessas espécies em outros tipos celulares (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

### **1.7 Defesas antioxidantes do organismo**

Ao longo da evolução, as células desenvolveram mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, dentre estes estão às enzimas antioxidantes, as quais são capazes de reagir com EROs antes que haja danos às biomoléculas. Este sistema de defesa é composto pelas proteínas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidases (GPXs) e as peroxirredoxinas (PRDXs).

A SOD catalisa a transformação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, através de alternadas redução e oxidação do metal do sítio ativo, atuando, dessa forma, como primeira linha de defesa antioxidante (JOHNSON e GIULIVI; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). O peróxido de hidrogênio produzido pode ser decomposto pela catalase, glutatona peroxidases ou peroxirredoxinas. Dentre as três classes de enzimas celulares capazes de decompor os hidroperóxidos, as PRDXs e as GPXs se destacam uma vez que além de decompor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estas enzimas são capazes de decompor hidroperóxidos de lipídeos e peroxinitrito, o que

aponta uma grande versatilidade na proteção celular contra hidróperóxidos. Entretanto, as PRDXs se destacam ainda mais pela abundância e grande reatividade com os substratos (KANG et al., 2005). Em seres humanos já foram descritas seis diferentes PRDXs localizadas em diferentes compartimentos celulares (WOOD et al., 2003). Nos eritrócitos, a PRDX2 é terceira proteína mais abundante, só perdendo em concentração para as globinas e a anidrase carbônica, indicando um possível papel no desenvolvimento e manutenção destas células (LOW; HAMPTON; WINTERBOURN, 2008). Além da atividade de peroxidase, as PRDXs participam de diversas cascatas de sinalização mediadas por peróxidos e possuem importantes funções através da interação com parceiros biológicos distintos (ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012).

Por todas essas importantes características, as PRDXs têm sido alvos de estudos em nosso grupo de pesquisa. Atualmente encontra-se em desenvolvimento um trabalho de análise de expressão gênica e conteúdo proteico das isoformas de PRDXs 1, 2 e 6 em reticulócitos e eritrócitos de pacientes beta talassêmicos. Adicionalmente, também estão sendo analisados os redutores fisiológicos dessas enzimas (exceto da PRDX6), a tiorredoxina (TRX), tiorredoxina redutase (TRXR) e sulfirredoxina. Dados em publicação de nosso laboratório tem se mostrado bastante promissores, especialmente com relação a PRDX1 e a TRX.

### **1.8. Expressão gênica global em beta talassemia**

A fim de encontrar possíveis alvos para um estudo mais aprofundado, Cunha e colaboradores iniciaram um estudo de expressão gênica global a partir de amostras de dois pacientes, portadores da mesma mutação genética para a beta talassemia (Cd 39) mas com quadros clínicos distintos, maior e intermediária. Neste trabalho, 42 transcritos foram classificados como diferencialmente expressos, dentre os quais foram encontrados genes conhecidos, ESTs, *no matches* e outros tipos de sequências preditas (dados em publicação). Em uma análise mais profunda destes resultados (apresentados em detalhes na seção de resultados), nosso grupo encontrou três genes relacionados com o estresse oxidativo gerado nestas células. Estes genes foram o *ABCB10*, que apresentou maior expressão no paciente beta talassêmico intermediário, e os genes *APEX1* e *HMGB1*, encontrados em maior expressão no paciente beta talassêmico maior e resolveu analisar se existe uma relação entre a produção destas proteínas e os fenótipos maiores e intermediário. Sendo este o foco deste trabalho, abaixo descrevemos brevemente uma revisão sobre as funções de cada gene.

### 1.8.1. *ABCB10*

O gene *ABCB10* (*ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10*) foi primeiramente identificado através de uma análise de transcritos durante a diferenciação de células G1E-ER2 (sistema experimental de GATA-1 criado por Weiss utilizando células eritróides murinicas, fundido ao receptor de estradiol por Shirihai), com o objetivo de investigar possíveis genes alvo para o fator de transcrição GATA-1, o qual é importante para a diferenciação eritróide normal (WEISS *et al.*, 1997; SHIRIHAI *et al.*, 2000). O transcrito foi isolado e caracterizado como um novo membro da família ABC, um grande grupo de proteínas que transporta diferentes compostos através da membrana das células (HIGGINS, 1992; CROOP, 1998). O mesmo estudo tratou de investigar a localização celular desta proteína, durante a diferenciação eritróide, que foi predominantemente expressa em mitocôndria nos estágios finais da maturação, coincidindo com a expressão essencial do gene *GATA-1* e foi então denominada de *ABC me* (*ABC mitochondrial erythroid*) (WEISS *et al.*, 1994).

Os achados que sugerem a importante relação deste gene com o processo de diferenciação eritróide foram corroborados com o estudo subsequente, demonstrado através da geração de camundongos knockout (*ABC-me -/-*), com a observação de uma redução considerável no número de precursores eritróides. A deleção acarretou anemia severa por volta do 10º dia embrionário, culminando com a letalidade no 12º dia, fenótipos similares aqueles encontrados na deleção de *GATA-1*. Ainda neste estudo, buscou-se entender os motivos envolvidos nesta resposta, observando-se um aumento dos níveis de estresse oxidativo através da geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria (HYDE *et al.*, 2012).

A relação com o estresse oxidativo já havia sido sugerida anteriormente. Um modelo murínico *ABC-me +/-* foi gerado para avaliação do fenótipo resultante. Como resultado, os camundongos com o gene defeituoso apresentaram diminuição da capacidade de recuperação hemodinâmica após um episódio de reperfusão isquêmica. Esta dificuldade de recuperação foi associada a uma diminuição da fosforilação oxidativa mitocondrial normal, aumentando a peroxidação lipídica, que como mencionado anteriormente gera produtos citotóxicos (LIESA *et al.* 2011).

O papel exato da participação de *ABCB10* na biossíntese de heme é alvo de diversos estudos. Um estudo de 2009 demonstrou que *ABCB10* é capaz de interagir fisicamente com a mitoferrina, uma proteína mitocondrial que é a principal importadora

de  $\text{Fe}^{+2}$  para a mitocôndria, formando um complexo, que aumenta a estabilidade proteica e a importação de  $\text{Fe}^{+2}$  para a mitocôndria. Um estudo subsequente foi capaz de expandir esta relação, demonstrando que a ferroquelatase, essencial para o biossintese do grupamento heme, também faz parte deste complexo, auxiliando a mitoferrina na importação de  $\text{Fe}^{+2}$  (CHEN et al 2009; CHEN et al 2010) (Figura 11).

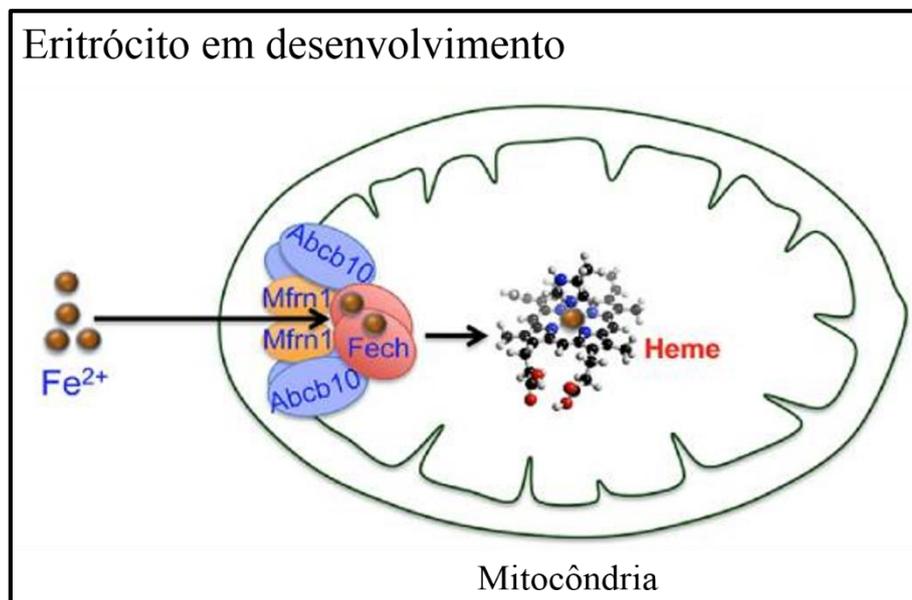


Figura 10: Complexo formado por ABCB10, FECH e Mfrn1. (Adaptado de Chen et al 2010)

Adicionalmente, acredita-se que ABCB10 tenha um papel importante também nos estágios iniciais do processo. Um estudo com knockdown foi realizado em linhagens celulares distintos (H9c2, NRCM e MEL, sendo as duas primeiras linhagens não eritróides). Este estudo foi pioneiro ao demonstrar o papel de ABCB10 aos primeiros passos da biossintese de heme, muito possivelmente através do transporte de ALA. Outro fato notado pelos autores foi que o acúmulo resultante de ALA na mitocôndria contribuiu para a citotoxicidade no interior da mitocôndria e conseqüente morte celular (BAYEVA et al, 2013). A possibilidade de que ABCB10 não seja o responsável direto pelo transporte, mas seja capaz de auxiliar este, está de acordo com os estudos realizados por Chen e colaboradores mencionados anteriormente.

O foco destes estudos destacou a importância desta proteína nos eritrócitos, entretanto, ainda não há uma relação estabelecida entre ela e os diferentes fenótipos da beta talassemia, sendo sua diferença de expressão encontrada no estudo de Cunha e colaboradores um importante ponto a ser estudado mais profundamente.

### 1.8.2. *APEX1*

O gene *APEX1* se relaciona a uma enzima multifuncional envolvida na via do reparo por excisão de bases, exibindo atividade reparadora do DNA e possuindo um papel na ativação reducional de diversos fatores de transcrição (BHAKAT; MANTHA; MITRA, 2009). Também conhecida como fator de efeito redox (Ref-1), ela está relacionada a fatores de transcrição como o c-Jun, ativador proteico-1 (AP-1), fator nuclear kappa B (NF-κB), a proteína de supressão tumoral p53, o fator de indução de hipóxia 1a (HIF-1a) e o gene box 8, que estão envolvidos em diversos processos celulares como sobrevivência da célula, sinalização de crescimento e vias inflamatórias (Figura 11) (BAPAT; FISHEL; KELLEY, 2009; EMA ET AL., 1999; GAIDDON; MOORTHY; PRIVES, 1999; TELL, 1998; XANTHOUDAKIS ET AL., 1992).

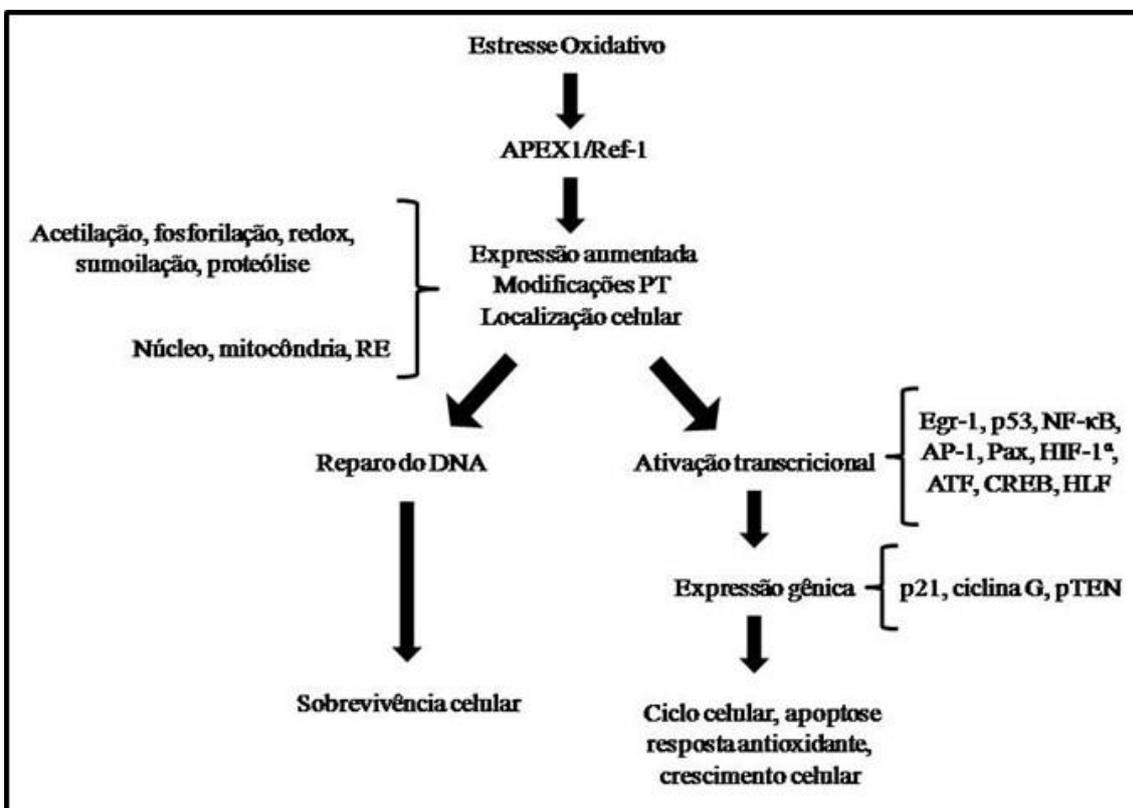


Figura 11. Funções de *APEX1* coordenando as diferentes respostas ao estresse oxidativo (Adaptado de TELL, 2009)

Xanthoudakis e colaboradores demonstraram em 1994 que as atividades de ativação e reparo desta proteína se encontram em regiões distintas. A atividade redox está relacionada com extremidade N-terminal enquanto a ação de endonuclease está relacionada a extremidade C-terminal. Através de análises, o grupo percebeu uma grande similaridade entre a extremidade responsável pela ação de endonuclease e proteínas de

ação similar em bactérias, notando entre tanto que o sítio redox é exclusivo de mamíferos (XANTHOUDAKIS; MIAO; CURRAN, 1994).

Foi demonstrado também que as espécies reativas de oxigênio (EROS) ativam a expressão de *APEXI*, sendo esta responsável pela resposta adaptativa de células tratadas com EROS através da mediação de uma ação elevada de endonuclease (RAMANA et al., 1998). Em resposta ao estresse oxidativo, observou-se um aumento na atividade de endonuclease de *APEXI*, demonstrando a sua capacidade de conferir resistência a células de glioma humanas contra agentes alquilantes (SILBER et al., 2002). Outros estudos mostram que *APEXI* modula o estado redox da célula através da inibição da produção de EROS por meio da ligação com fatores de transcrição, como p53 e HIF-1a (ANGKEOW, 2002), visto que um estudo anterior reportou que p53 é responsável pela regulação de processos fisiológicos redox dependentes, sendo sensível ao estado redox, sendo que p53 ativado influencia a produção de EROS (HAFSI E HAINAUT, 2011; MAILLETEPERVAIZ, 2012). Em apoio a este achado, um estudo anterior demonstrou que *APEXI* regula o estresse oxidativo celular controlando a atividade de Rac1 GTPase e protege contra a morte celular oxidativa (OZAKI; SUZUKI; IRANI, 2002).

Sendo um ativador de diversos fatores de transcrição ligados ao combate do estresse oxidativo, este gene se tornou alvo de grande interesse principalmente para estudos relacionados a tumorigênese e os efeitos de quimioterápicos, uma vez que a deleção deste gene torna a célula mais suscetível a apoptose.

### **1.8.3. HMGB1**

O gene *HMGB1* (*high-mobility group box 1*) codifica uma proteína multifuncional que medeia uma variedade de processos, dentro e fora da célula, como regulação da transcrição (SINGH, 1990), remodelamento de cromatina (BONALDI, 2002) e inflamação (WANG, 1999). É uma das proteínas mais abundantes, sendo vital para a sobrevivência principalmente em mamíferos, uma vez que a perda de HMGB1 in vitro e/ou in vivo leva a um grande número de anomalias na estrutura e função nuclear, tal como instabilidade genômica (GIAVARA et al., 2005), transcrição anormal de genes (ROWELL et al., 2012), defeito na resposta aos danos no DNA (LANGE; MITCHELL; VASQUEZ, 2008), defeito na cromatinização do genoma (CELONA et al., 2011), e liberação de nucleossomos inflamatórios (KANG et al., 2014).

Experimentos com células HeLa (linhagem derivada de células tumorais cervicais) foram realizados para avaliar o papel deste gene no reparo do DNA após a exposição destas à radiação UV. As análises mostraram a capacidade de interação da proteína HMGB1 com a proteína RAD23B (*RAD23 homolog B (S. cerevisiae)*), formando um complexo que está envolvido no reparo por excisão de nucleotídeo (*NER*), ou seja, processos de reparo do DNA (LANGE, 2009).

HMGB1 se tornou alvo de diversos estudos através de sua relação com genes envolvidos no estresse oxidativo e sua participação na mediação de processos envolvidos na tumorigênese. Shiota e colaboradores, demonstraram que HMGB1 serve como ativador de ETS1 e ETS2, fatores de transcrição envolvidos na expressão de PRDX1 e PRDX5 (SHIOTA et AL, 2008). Como citado anteriormente, as peroxiredoxinas compõem um importante sistema antioxidante do organismo, sendo que a PRDX1 apresenta também função de supressão tumoral. (NEUMANN e FANG, 2007)

Sendo secretada pela maioria das células imunes, HMGB1 está entre os padrões moleculares associados ao dano, sendo capaz entre outros, de induzir a associação de plaquetas levando a formação de trombos (STARK et al, 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

A diversidade fenotípica encontrada na beta talassemia resulta de uma combinação de fatores que influenciam na gravidade da doença, e está diretamente relacionada ao desequilíbrio na produção das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . Muitas das variações podem ser explicadas pela heterogeneidade das lesões moleculares que afetam o gene da beta globina, e que podem ser influenciadas por outros determinantes genéticos ligados ou não aos genes globínicos (THEIN, 2004). Neste sentido, o estudo realizado por nosso grupo que analisou o perfil global de expressão gênica comparando os fenótipos maior e intermediário, servindo como ponto inicial para a identificação de novos alvos de estudo a partir do qual destacamos os genes *APEX1*, *ABCB10* e *HMGB1* por apresentarem um importante papel nos mecanismos celulares de combate ao estresse oxidativo, uma vez que produção de espécies reativas de oxigênio parece ter uma estreita relação com a fisiopatologia de doenças hematológicas, principalmente anemias hemolíticas como a beta talassemia.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Analisar e relação da expressão gênica e conteúdo proteico de *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* e sua possível relação com os níveis aumentados de EROs em pacientes com beta talassemia intermediária e maior.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Validar os dados obtidos por SAGE (Análise Seriada da Expressão Gênica).
2. Relacionar a expressão gênica e conteúdo proteico dos três genes mencionados ao quadro clínico apresentado pelos pacientes.
3. Estabelecer a provável relação destes genes com a diferenciação eritróide através da análise de culturas CD34+.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Pacientes e controles

Foram selecionados pacientes com anemia falciforme e beta talassemia previamente diagnosticados pelo Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco (Fundação HEMOPE). Para a separação de reticulócitos e proteínas, o sangue periférico destes pacientes foi coletado em tubos contendo o anticoagulante EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), os quais foram mantidos refrigerados até o momento do processamento. Amostras de sangue periférico de indivíduos sadios foram usadas como grupo controle.

Dados como idade, sexo, patologias associadas, medicação, entre outros, também foram solicitados aos pacientes e controles. Todos os pacientes com beta talassemia intermediária analisados eram homozigotos para a mutação IVS-1-6, enquanto os pacientes beta talassemicos maiores apresentavam mutações diversas: 1 paciente com mutação IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→A); 2 pacientes com mutação IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C); 1 paciente com mutação IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-110 (G→A) e 1 paciente com mutação IVS-I-1 (G→A) / IVS-II-849 (A→G) (tabela 2).

**Tabela 2. Dados hematológicos dos pacientes**

Parâmetros	Beta talassemia intermediária	Beta talassemia maior
	n=8	n=5
CV ( $10^6\text{mm}^3$ )	4,05 ± 0,58	3,02 ± 0,41
Hb (g/dL)	7,6 ± 0,53	6,9 ± 1,27
VCM (fL)	64,2 ± 9,15	74,6 ± 2,08
Ret (%)	6,8 ± 3,25	4,2 ± 3,65
Ht (%)	25,5 ± 1,62	22,6 ± 3,64
HbF (%)	8,4 ± 4,39	13,7 ± 5,02
HbA (%)	84,2 ± 4,36	83,1 ± 5,30
HbA <sub>2</sub> (%)	7,4 ± 0,61	3,2 ± 0,45
CB ( $10^3\text{mm}^3$ )	10.934 ± 7.186,23	16.230 ± 3.522,16

## **4.2 Aspectos éticos da pesquisa**

Este estudo foi submetido aos Comitês de Ética em Pesquisa da UFSCar, UNICAMP e HEMOPE e aprovado com o CAAE de número 50776715.0.1001.5504. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1) que foi assinado por todos os participantes desse estudo, também foi aprovado pelos conselhos citados.

## **4.3 Separação de Reticulócitos**

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos com EDTA e transferidas para um tubo cônico de plástico de 50mL. Após centrifugação em 3.000 rpm, 10 minutos a 4°C, o plasma foi descartado e foi adicionado 5x o volume de solução de lise de hemácias (0.144M NH<sub>4</sub>Cl; 0.01M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). As amostras foram incubadas 30 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo hemácias lisadas e reticulócitos foi transferido para novo tubo, homogeneizado com 1/10 de volume de uma solução de Sacarose/KCl (1.5M C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>; 0.15M KCl, filtrada ou preparada com H<sub>2</sub>O tratada com DEPC) e centrifugado novamente 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo agora apenas reticulócitos foi transferido para novo tubo, tratado com 700µL de Ácido acético 10% e centrifugado 5.000 rpm 20 minutos a 4°C. O precipitado (pellet) foi então ressuspendido e homogeneizado em 1mL de Trizol® (Invitrogen), que rompe as células, dissolvendo os componentes celulares sem comprometer a integridade do RNA.

## **4.4 Extração de RNA**

O RNA de reticulócitos foi obtido através do método de extração com o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. As amostras com reticulócitos e Trizol® foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente, para que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos, adicionou-se 200µL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), homogeneizados por agitação vigorosa, sendo realizada nova incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a 12.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, procedendo à etapa seguinte de precipitação com 500µL de isopropanol gelado. Foi realizada nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 15.000xg à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao

precipitado adicionado 1mL de etanol gelado a 75%, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 7.500g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA colocado para secar em temperatura ambiente, sendo em seguida ressuspensionado em água livre de RNase e incubado a 55°C por 10 minutos. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e avaliadas quanto à integridade em gel de agarose. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossômicas: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

#### **4.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)**

Para retirar possíveis contaminações do RNA com moléculas de DNA, 2µg de cada RNA extraído foi tratado com 1µL da enzima *DNaseI* (Fermentas, ThermoScientific), 1µL de *DNaseI reaction buffer* com MgCl<sub>2</sub> 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, MgCl<sub>2</sub> 20mM, KCl 500mM), em um volume final de 10µL. A reação foi incubada por 30 min à 37°C e paralisada com 1µL de EDTA 50mM e incubação por 10 min a 65°C. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems). À amostra de RNA tratado, foi adicionado 2µL de 10X RT Buffer, 0,8µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2µL de 10X RT Random Primers, 1µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL), 4,2µL de Nuclease-free H<sub>2</sub>O. A síntese de cDNA foi feita a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos. A reação foi paralisada através de incubação a 85°C por 5 minutos. Para verificar a eficiência da reação de transcrição reversa, bem como avaliar as quantidades de cDNA a serem utilizadas nas análises posteriores, foi realizada uma amplificação por qPCR utilizando *primers* para o gene endógeno beta actina. Uma boa amplificação deste gene indica uma síntese de cDNA satisfatória.

#### **4.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

As análises de qPCR foram feitas no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que emite sinal de fluorescência ao intercalar com DNA dupla-fita. Os *primers* foram desenhados com o programa "OligoAnalyzer 3.1" (Integrated DNA Technologies) e analisados no programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para verificar a formação de

possíveis estruturas como *hairpins* e *dimeros*. *Primers* do gene *housekeeping* beta actina foram utilizados como controle endógeno.

As amostras foram amplificadas em duplicatas e em todas as análises foram feitos controles negativos, com água estéril substituindo a amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa usado foi: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após a amplificação, a curva de *melting* foi determinada, através da variação de temperatura de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e novamente 95°C por 15s. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na tabela 4. A quantificação dos resultados se baseia na derivação da fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os dados de  $C_t$  foram exportados para uma planilha no programa Excel (Microsoft Corporation) e, então, analisados. O  $\Delta C_t$  foi calculado utilizando as diferenças na média de  $C_t$  entre os genes alvos e seus controles endógenos. Após, o  $\Delta\Delta C_t$  foi calculado em relação a uma situação considerada como referência, que constitui a amostra calibradora. Em seguida, calculou-se o  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

#### 4.6.1 Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real

##### 4.6.1.1 Concentração de Primer

A concentração ótima de *primer* utilizado na qPCR, deve ser suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presente na amostra. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (forward e reverse) utilizados neste estudo, nas concentrações finais apresentadas na tabela 3.

**Tabela 3. Matriz para padronização da concentração ótima de primers forward e reverse (nM)**

<i>Primer Forward</i> (nM)	<i>Primer Reverse</i> (nM)			
		100	150	300
100		100/ 100	100/ 150	100/ 300
150		150/100	150/ 150	150/ 300
300		300/100	300/ 150	300/ 300

A concentração ideal foi aquela em que o gene apresentou o menor valor de  $C_t$  (ciclo threshold), maior  $\Delta R_n$  (variação de fluorescência) e não apresentou formação de

dímeros, mesmo nos poços com NTCs (no-template controls). A tabela 4 apresenta as sequências e concentrações ótimas dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo.

**Tabela 4. Sequências e concentrações ótimas dos primers utilizados no real-time PCR (qRT-PCR)**

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Concentração</b>
ABCB10F	ACTGTGGTTGGAGAAAAGGG	150nM
ABCB10R	CACTGGTTGCTTCATCTAGGAG	150nM
APEX1F	ACAGCAAGATCCGTTCCAAG	150nM
APEX1R	GCTTATTTCCCAGGCTCAAAG	300nM
HMGB1F	GATATGGCAAAGCGGACAAG	300nM
HMGB1R	GGCGATACTCAGAGCAGAAG	100nM
β ACTINA - F	CAAGCAGGAGTATGACGAGTC	300nM
β ACTINA– R	GCCATGCCAATCTCATCTTG	150nM

#### 4.6.1.2 Eficiência de Reação

Para que a reação de qPCR seja confiável e reprodutiva são necessárias condições ótimas de reação, onde as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo de amplificação, ocorrendo duplicação da amostra. Após determinadas as concentrações ideais dos *primers* foram realizadas diluições seriadas de uma amostra conhecida para avaliar a eficiência do experimento, que é indicada pela inclinação (*slope*) da curva padrão. Utilizou-se diluições seriadas de amostras de cDNA de cultura de K562 (linhagem celular eritroleucêmica Ph<sup>+</sup>), que apresenta expressão de todos os genes analisados. Uma eficiência de 100% resulta em uma curva padrão com *slope* de -3,32. A eficiência de amplificação é dada pela fórmula  $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ . Outros parâmetros como R<sup>2</sup> e Y- intercept (ponto em que a curva corta o eixo Y) também são obtidos neste experimento e foram cuidadosamente avaliados. Para ser considerado eficiente, um *primer* deve apresentar valor de eficiência entre 95 – 105%, R<sup>2</sup> ≥ 0,99, *slope* próximo a -3,32 e Y-intercept maior que 32. A figura XX mostra um exemplo desta análise para o gene *HMGB1*.



**Figura 12. Teste de Eficiência da HMGB1 300F/100R.** A) As curvas representam as diluições seriadas utilizadas. B) Representação na reta dos pontos obtidos. A partir da análise feita é possível obter a eficiência do *primer*, no caso exemplificado de 108,254%, com um  $R^2$  de 0,997, em um *threshold* de 0,083909.

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.

Para todos os *primers* citados anteriormente foram realizados os mesmos procedimentos. A tabela 5 apresenta os parâmetros de maior importância.

**Tabela 5. Parâmetros de importância para os *primers* caracterizados.**

<i>Primer</i>	Threshold	Eficiência (%)	Slope	Y inter	$r^2$
BAC	0,098701	101,311	-3,291	33,99	0,978
ABCB10	0,096587	95,135	-3,444	31.794	0.993
APEX1	0,099955	103,773	-3,235	30.401	0.984
HMGB1	0,083909	108,254	-3,139	29.732	0.997

## 4.7 Western blotting

### 4.7.1 Extração e quantificação de proteínas

As proteínas totais foram extraídas de hemácias de pacientes e controles. Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos com EDTA e transferidas para

tubo cônico de plástico. Após centrifugação em 3.000 rpm, 10 minutos a 4°C, o plasma e o *buffycoat* foram separados, e ao restante foi adicionado o tampão de lise de hemácias: EDTA (10mM), Trisma base (100mM), Pirofosfato de sódio (10mM), Fluoreto de sódio (100mM), Ortovanadato de sódio (10mM), PMSF (2mM), Aprotinina (0,1mg/ml) Triton (10%). As amostras foram incubadas 40 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 12.000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo hemácias lisadas foi transferido para novo tubo e as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY et al, 1951). Após estabelecer a mesma quantidade de proteínas totais para todas as amostras (25µg), foram adicionados a elas tampão desnaturante de Laemmli (LAEMMLI, 1970) (100mM tris-HCl pH6.8, 4% p/v SDS, 20% v/v glicerol, 0,2% de azul de bromofenol) utilizando como agente redutor o DTT (Ditiotreitol) e estas foram desnaturadas em banho-maria a 100°C por 5 min. O mesmo procedimento foi utilizado para análise do plasma,

#### **4.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS**

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras. Os géis de poliacrilamida utilizados na eletroforese do lisado celular apresentavam a concentração de 4% (gel de entrada) e 12% (gel de separação), com 1,0 mm de espessura. Foram adicionados 25µg de proteína por poço. Para a corrida das proteínas do plasma, foram utilizados géis de poliacrilamida com a concentração de 4% (gel de entrada) e 15% (gel de separação), com 1,5 mm de espessura, adicionando 50µg de proteína por poço. A eletroforese foi realizada com o marcador de peso molecular (10–170kd) Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific), para possibilitar a identificação por peso molecular das proteínas de interesse. A corrida foi realizada a 150 volts, em um tempo de aproximadamente 1 hora e 30 min. (The Mini Trans-Blotcell - Bio-Rad). O tampão de corrida utilizado era composto por Trisma base (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1 g%). Após a corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% v/v metanol) por 30 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 110 Volts durante 2 horas por transferência submersa. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora com 5% p/v de leite desnatado em TBS-T (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH=8, contendo 0,1% v/v de Tween 20). Ao fim do bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T por 4 vezes de 5 min. e incubada overnight a 4°C com anticorpo primário (listados na

tabela 6) sob agitação, a seguir a membrana foi novamente lavada com TBS-T por 4 vezes de 5 min. e incubada com anticorpo secundário conjugado com a enzima HRP (listados na tabela 6) por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Todos os anticorpos foram utilizados conforme orientação do fabricante. Depois de lavada (TBS-T por 4X de 5 min.), a membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent - GEHealthcare) por quimiluminescência de acordo com as instruções do fabricante. As bandas foram visualizadas e fotografados usando o aparelho ChemiDoc da Bio-Rad. A análise quantitativa por densitometria foi realizada através do programa ImageJ ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)).

**Tabela 6. Anticorpos utilizados na técnica de western blotting**

<b>Anticorpo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fornecedor</b>
<i>Primários</i>			
Anti- APEX1	Monoclonal	1: 5.000	Cell Signaling
Anti- HMGB1	Monoclonal	1: 5.000	Cayman Chemichal
Anti- GAPDH	Policlonal	1: 4.500	Biorbyt
<i>Secundários</i>			
Goat anti-Mouse IgG (HRP)	Policlonal	1: 20.000	Biorbyt
Rabbit anti-Goat IgG (HRP)	Policlonal	1: 20.000	Biorbyt

#### **4.8 Cultura de células CD34<sup>+</sup>**

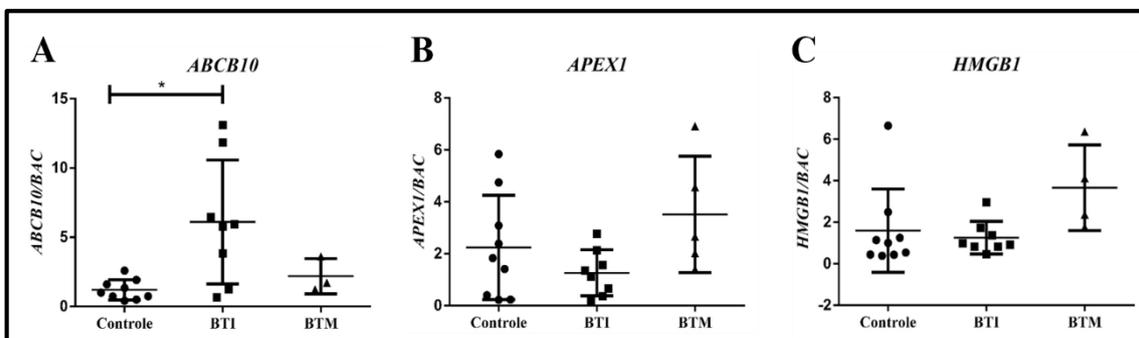
Para simular esse processo de diferenciação celular in vitro, utilizamos o método de cultura de células CD34<sup>+</sup>. Para isso, células mononucleares de sangue periférico obtidas a partir da coleta de sangue de doadores e pacientes beta talassêmicos intermediários (IVS 1-6), foram isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque. A camada de células da interface do gradiente foi coletada e o isolamento das células CD34<sup>+</sup> foi feito utilizando o Kit Indirect CD34<sup>+</sup> Progenitor Cell Isolation Kit (MACS cell isolation kit) seguindo as orientações do fabricante. Estas células foram cultivadas em meio Metil Celulose H4230 (Stem cell technologies), adicionado de 20 ng/ul de IL-3, 3 U de Eritropoetina (EPO) e 50 ng/ul de Stem Cell factor na temperatura de 37°C, numa atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por sete dias. Em seguida as células

foram coletadas e cultivadas em meio líquido Alfa-MEM (Invitrogen) suplementado com 30% de Soro Fetal Bovino, e adição de BSA, holo-transferrina humana, beta-mercaptoetanol, EPO (2U/ml). Foram retiradas amostras no início meio e fim, nas fases de proeritroblasto (7º dia de cultura), eritroblasto basofílico (10º dia) e eritroblasto ortocromático (13º dia), respectivamente, do processo de proliferação para a extração de RNA para análises do perfil de expressão de *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise da expressão gênica de *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com beta talassemia

A expressão gênica de *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* foi analisada nos reticulócitos dos seguintes grupos: indivíduos saudáveis (controle: n= 9), pacientes com beta talassemia intermediária (BTI: n= 8) e beta talassemia maior (BTM: n= 4). Os resultados obtidos corroboraram os dados anteriores de expressão gênica global de nosso grupo, uma vez que mesmo não havendo diferenças significativas entre os grupos analisados, a avaliação pelo fold indica um aumento na expressão de *ABCB10* em pacientes beta talassêmicos intermediários em relação aos maiores. Além disso, pudemos observar que esta relação também é verdadeira quando comparamos em relação ao grupo controle, uma vez que este apresentou diferença na expressão apenas quando comparado ao grupo de beta talassêmicos intermediários (figura 13A). Em relação à *APEX1*, também foi perceptível um aumento nos pacientes beta talassêmicos maiores em comparação aos pacientes beta talassêmicos intermediários (figura 13B), sendo o mesmo observado com relação à *HMGB1* (figura 13C). Ainda que não tenha sido estatisticamente relevante, os grupos de pacientes beta talassêmicos maiores apresentam um aparente aumento da expressão dos três genes quando comparados ao grupo controle.

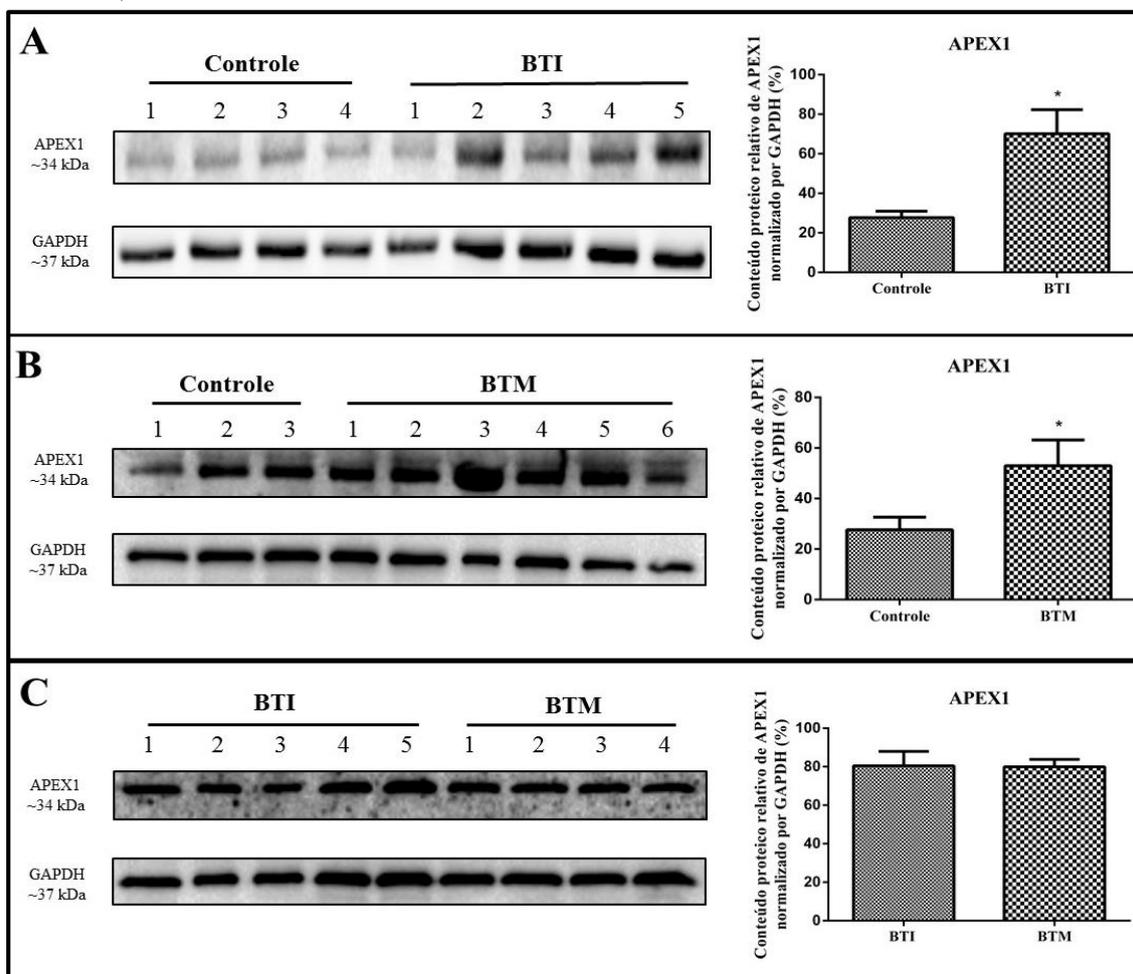


**Figura 13.** Análise da expressão gênica dos genes *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com anemias hemolíticas. (A) o gene *ABCB10* mostrou aumento em pacientes beta talassêmicos intermediários quando comparados ao grupo controle ( $p=0,0199$ ). A aparente diferença entre os pacientes beta talassêmicos intermediários e maiores não apresentou estatística significativa. (B) o gene *APEX1* não apresentou diferença significativa entre os grupos de beta talassêmicos intermediários e maiores. (C) Para o gene *HMGB1* também não foi observada diferença significativa entre os grupos de pacientes beta talassêmicos. Para as análises foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Para aprofundar os dados obtidos, fizemos também uma análise dos níveis proteicos de *APEX1* e *HMGB1*, entretanto, a localização mitocondrial de *ABCB10* tornou impossível a sua análise no presente estudo.

## 5.2 Análise do conteúdo proteico de APEX1 no lisado celular de hemácias de indivíduos saudáveis e com beta talassemia

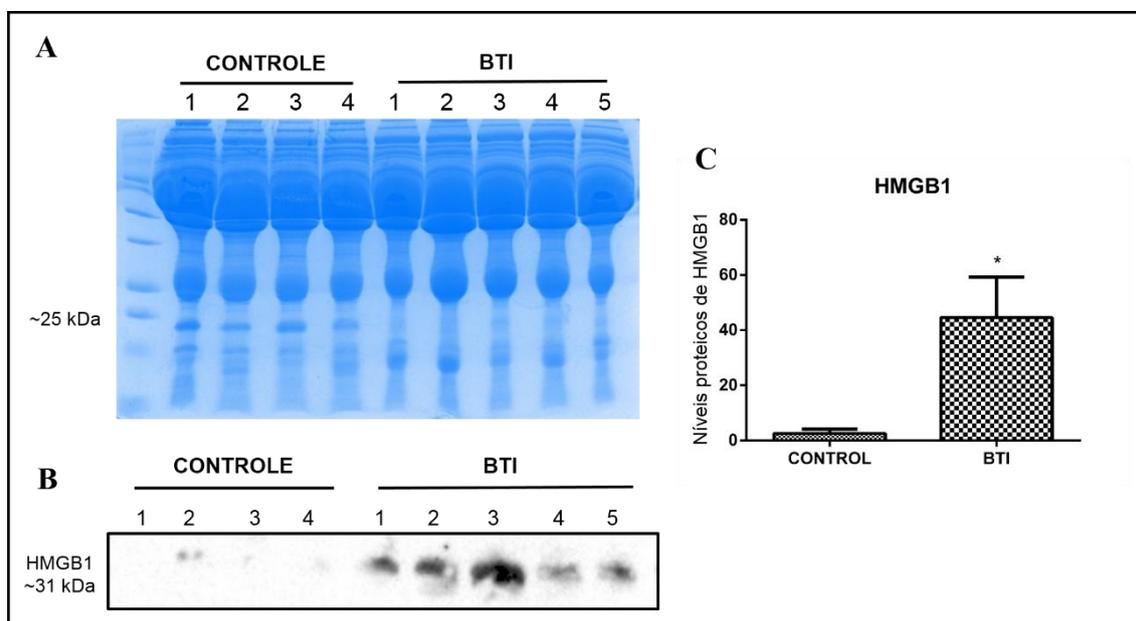
O conteúdo proteico de APEX1 foi analisado no lisado celular de hemácias de pacientes e controles. Como controle endógeno foi utilizado anticorpo para GAPDH. A comparação do conteúdo proteico de APEX1 em indivíduos saudáveis e pacientes com beta talassemia intermediária e maior, mostram um aumento em ambos os grupos quando comparados aos controles, e níveis similares deste conteúdo nos pacientes maiores quando comparados aos intermediários. Estes dados estão demonstrados na figura 14. Foram feitas análises comparando indivíduos controle (n=4) com indivíduos beta talassêmicos intermediários (n=5) (Figura 14A), indivíduos controle (n=3) com indivíduos beta talassêmicos maiores (n=6) (Figura 14B) e também comparamos os dois fenótipos entre si (BTI n= 5; BTM n=4) (Figura 14C). Os pacientes intermediários analisados eram todos homozigotos para a mutação IVS-1-6 enquanto os indivíduos talassêmicos maiores possuem mutações variadas (para detalhes consultar materiais e métodos).



**Figura 14. Análise do conteúdo proteico de APEX1 em indivíduos controle e pacientes com beta talassemia.** (A) Os pacientes beta talassêmicos intermediários apresentaram um aumento nos níveis proteicos quando comparados ao grupo controle ( $p=0,0159$ ). (B) Com relação aos pacientes beta talassêmicos maiores, também foi observado um aumento em comparação ao grupo controle ( $p=0,0476$ ). (C) Quando comparados os dois fenótipos da doença, os níveis proteicos de APEX1 se apresentaram similares.

### 5.3 Análise do conteúdo proteico de HMGB1 no plasma de indivíduos sadios e com beta talassemia

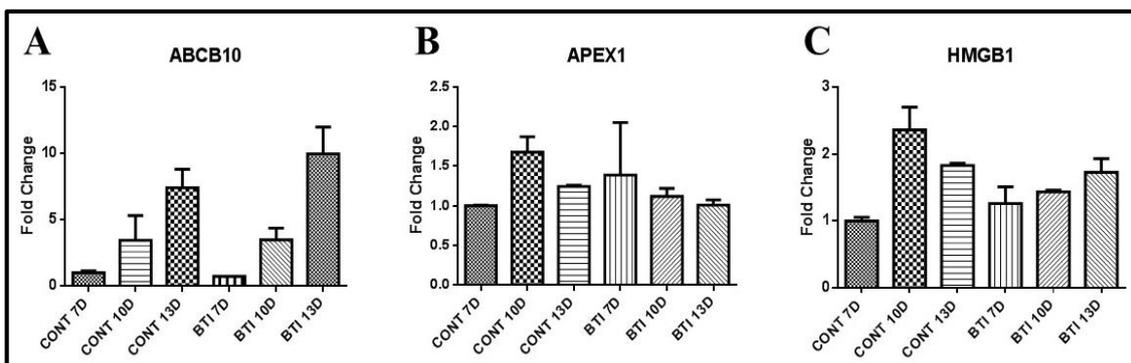
A proteína HMGB1, foi analisada inicialmente no lisado celular de pacientes intermediários, maiores e controles, não sendo detectada. Considerando que esta é uma proteína que é secretada para o meio extracelular e já existem estudos realizados no plasma de pacientes beta talassêmicos maiores, foi feita a análise no plasma de pacientes intermediários e controles. A comparação direta entre os grupos de pacientes não pode ser realizada pela indisponibilidade de amostras de talassêmicos maiores. Para fins de padronização da quantidade de extrato, foi utilizado um gel corado com Comassie Blue (Figura 15). A comparação do conteúdo proteico de *HMGB1* em indivíduos saudáveis e pacientes com beta talassemia intermediária, mostram que esta proteína está presente em grandes quantidades nos pacientes, uma vez que ela quase não pode ser detectada no plasma dos indivíduos controle. Estes dados estão demonstrados na figura 15.



**Figura 15. Análise de western blotting em controles e pacientes com beta talassemia intermediária.** (A) Um gel corado com Comassie Blue foi utilizado para demonstrar a padronização da quantidade de proteínas a serem utilizadas. (B) Através de análise de western blotting, a proteína *HMGB1* foi encontrada em maior quantidade no plasma de indivíduos beta talassêmicos intermediários quando comparadas ao grupo controle. (C) Representação gráfica da diferença encontrada entre controles e pacientes.

#### 5.4 Análise da expressão gênica de *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* em culturas de células de indivíduos saudáveis e beta talassêmicos

Para elucidar o papel destes genes no eritrócito, optamos por analisar a expressão destes durante a diferenciação celular a fim de avaliar melhor os processos em que estes possam estar envolvidos. As análises de cultura celular foram gentilmente realizadas em parceria com a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Foram feitas culturas de células CD34<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e beta talassêmicos (n=2), portadores de mutação IVS-1-6 com fenótipo intermediário, sendo retiradas amostras para análise no 7º, 10º e 13º dia. Os resultados encontrados para o gene *ABCB10* no grupo controle se mostra em concordância com dados prévios tanto da literatura quanto de nosso grupo, se mostrando aumentado na fase final da diferenciação (figura 16A). Para a cultura talassemica, percebe-se a manutenção do mesmo perfil do grupo controle, entretanto com o aumento da expressão deste gene, em torno de 34%, na fase final. As análises do perfil de expressão gênica de *APEX1* mostra um perfil de diminuição deste nos pacientes, em contraste com os controles que apresentam um pico no 10º dia de diferenciação (Figura 16B). Com relação à *HMGB1*, este apresentou um perfil crescente nos pacientes, ao passo que nos controles ele também possui um pico no 10º dia (Figura 16C). Os resultados encontrados nas culturas controles corroboram também dados em publicação de nosso grupo que demonstraram que genes diferencialmente expressos para beta talassemia maior apresentam-se em maior quantidade na fase intermediária da diferenciação eritróide normal, enquanto genes diferencialmente expressos na beta talassemia intermediária estão mais presentes na fase final da diferenciação. É possível perceber também que tanto *APEX1* quanto *HMGB1* apresentam um perceptível aumento na fase inicial da diferenciação quando comparado com os controles, mantendo em seguida uma aparente diminuição de seus valores esperados. Estes resultados estão expostos na figura 16.



**Figura 16. Análise da expressão gênica de *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* em culturas de indivíduos saudáveis e beta talassêmicos intermediários.** (A) A expressão de *ABCB10* se mostrou similar entre os perfis analisados, tendo o pico na fase final da diferenciação, com a cultura beta talassemica intermediaria apresentando um aumento de aproximadamente 40% nesta fase. (B) *APEX1* se mostrou mais presente na fase intermediária da diferenciação normal. Na cultura talassemica intermediaria, *APEX1* mostrou um perfil diferente, estando mais presente na fase inicial da diferenciação. (C) *HMGB1*, sendo originalmente mais expressa no paciente beta talassêmico maior, também tem seu pico na fase intermediária da diferenciação eritróide controle. Na cultura talassemica intermediaria, a expressão mostrou um perfil ascendente, estando mais presente na fase final da diferenciação.

## 6. DISCUSSÃO

A heterogeneidade clínica observada na beta talassemia sugere o envolvimento de fatores adicionais nas manifestações fenotípicas da doença, neste quesito, o estresse oxidativo pode representar um importante modulador da gravidade da doença. Sendo assim, a identificação de genes relacionados ao estresse oxidativo torna-se de especial interesse. Em nosso estudo, analisamos três genes previamente identificados por nosso grupo que dentre outras funções, podem estar relacionados com a modulação de EROs nessa patologia.

O gene *ABCB10* está relacionado a uma proteína de transporte, e, portanto, sua atividade transportadora tem sido alvo de diversos estudos. Seu papel na diferenciação eritróide, estabelecido, mas não elucidado chama a atenção. Até o momento, o foco dos grupos de estudo tem sido apenas a diferenciação eritróide normal, no entanto, *ABCB10* pode se mostrar um alvo interessante a ser estudado na beta talassemia, visto que participa de processos vitais para a célula eritróide, como a já mencionada formação do grupo heme (BAYEVA et al, 2013; CHEN et al 2009; CHEN et al 2010).

Estudos prévios realizados por nosso grupo, sugerem uma diferença de expressão desse gene nos diferentes fenótipos da beta talassemia. Corroborando estes achados, nossos dados mostraram um aumento de *ABCB10* em pacientes intermediários, quando comparados aos pacientes maiores e a indivíduos saudáveis. Esses dados sugerem uma relação deste gene com o quadro clínico da beta talassemia. Devido à grande participação desses genes no processo de formação do grupo heme, podemos sugerir que os níveis aumentados da expressão desses genes nos pacientes beta talassêmicos intermediários contribuam para aumentar a eficiência na produção de heme, aumento dos níveis de hemoglobina e consequente diminuição dos níveis de ferro nos tecidos.

De acordo com estudos anteriores de Shirihai e colaboradores existe uma importante relação entre *ABCB10* e o fator de transcrição GATA-1, sendo *ABCB10* um alvo *downstream* de GATA-1, e sua vital importância para a diferenciação eritróide. Com isso, podemos supor que esse aumento na expressão de *ABCB10* esteja relacionado ao fato de que as células eritróides dos pacientes beta talassêmicos intermediários consigam chegar à um estágio de maturação mais avançado em relação aos pacientes beta talassêmicos maiores. Além disso, a falta de *ABCB10* leva a um acúmulo de ALA dentro da mitocôndria, além de um aumento da peroxidação lipídica, e consequentemente a formação de produtos citotóxicos, assim como contribui para o aumento dos níveis de

EROs (SHIRIHAI *et al.*, 2000; HYDE *et al.*, 2012; LIESA *et al.* 2011). Dessa forma, o aumento da expressão deste gene em pacientes beta talassêmicos intermediários encontrado neste estudo, pode ter uma importante relação na regulação dos níveis de EROs nestes pacientes.

Adicionalmente também analisamos culturas de células CD34+ sadias e de pacientes com beta talassemia intermediaria, onde foi possível notar que as duas condições apresentam perfis semelhantes de expressão de *ABCB10* durante o desenvolvimento eritróide, mostrando um aumento gradual ao longo do desenvolvimento, entretanto, observamos um aumento de 34% na expressão desse gene no 13º dia da cultura beta talassemica intermediaria em relação ao controle, indicando um possível papel deste gene também na fase final da diferenciação eritróide, visto que tal aumento também foi observado a nível de reticulócito. Contudo, estudos adicionais ainda são necessários para um melhor entendimento desta relação.

Com relação ao *APEX1* nossos resultados mostraram um aumento da expressão gênica nos pacientes beta talassêmicos maiores, quando comparados aos pacientes intermediários. Apesar de não apresentar relevância estatística, a expressão deste gene também se mostrou aumentada quando comparada a indivíduos sadios. Entretanto, ao analisar o conteúdo proteico, observamos o aumento de APEX1 em ambos os quadros clínicos de talassemia quando comparados ao controle, não sendo observada diferença dos níveis entre os diferentes fenótipos.

Inicialmente esses dados sugerem que o aumento de *APEX1* em relação a indivíduos sadios é uma característica da beta talassemia independentemente de seu fenótipo, visto que a expressão de *APEX1* é induzida pela presença de EROs, que tem elevada produção nessa doença (NAGABABU, 2000). Esse aumento pode estar diretamente relacionado com a capacidade de *APEX1* de reparar danos no DNA (SILBER *et al.*, 2002), uma vez que as EROs são elevadas nestas células desde a medula óssea (FIBACH, RACHMILEWITZ, 2008).

No que se refere a divergência encontrada entre os dados de expressão gênica e conteúdo proteico entre os fenótipos de beta talassemia, uma hipótese é que isso seria devido a interação entre APEX1 e PRDX1. Um estudo realizado por Nassour e colaboradores mostrou que quando essa interação ocorre uma maior quantidade de APEX1 fica retida no citoplasma (NASSOUR *et al.*, 2016). Dados obtidos em nosso laboratório apontam uma redução do conteúdo proteico de PRDX1 nos pacientes beta talassêmicos maiores quando comparados aos intermediários, o que poderia levar a uma

maior concentração de APEX1 no núcleo da célula em processo de diferenciação, que em fases posteriores é expulso, causando a perda das proteínas presentes em seu interior. Assim sendo, quando visualizamos os conteúdos similares, não temos uma representação total da produção no decorrer do desenvolvimento eritróide.

Com relação aos achados em cultura celular, foi observado que *APEX1* tem um aumento na expressão na fase intermediária da diferenciação eritróide em indivíduos saudáveis. Estudos anteriores realizados com células CD34+ *knockdown* para o gene *APEX1* apontam para uma diminuição na produção de progenitores hematopoiéticos primitivo e definitivo, indicando que este gene possa exercer um papel regulador durante a eritromielopoese normal (ZOU, 2007). Para as culturas beta talassêmicas intermediárias, foi observado um aumento de aproximadamente 40% na expressão deste gene na fase inicial da diferenciação, com uma queda gradativa nas demais fases. Essa presença acentuada na fase inicial está de acordo com os dados que sugerem um aumento deste gene na fase medular da diferenciação para efetuar a ação de endonuclease. Estudos posteriores com uma cultura de beta talassêmico maior são necessárias para fundamentar estes achados, entretanto podemos sugerir que neste quadro exista um perfil similar aos pacientes intermediários, entretanto com um aumento significativo que venha a justificar os dados encontrados na análise de expressão gênica.

No que se refere ao *HMGB1*, este também apresentou uma expressão elevada nos pacientes beta talassêmicos maiores quando comparados aos intermediários, e um aumento não significativo quando comparado aos indivíduos saudáveis. Quanto aos resultados encontrados na cultura celular, nossos resultados mostram diferentes perfis de expressão deste gene ao longo da maturação eritróide. Nas culturas de indivíduos saudáveis podemos observar um pico de expressão de *HMGB1* no 10º dia da cultura, enquanto na cultura de talassêmicos intermediários o aumento de expressão ocorre de maneira gradual. Essa participação acentuada na fase intermediária da eritropoiese em indivíduos saudáveis pode estar ligada a capacidade de *HMGB1* de se ligar ao DNA na fenda menor, independente de sequência, servindo para formar complexos de ancoragem para ativar fatores de transcrição, que podem desempenhar um importante papel nesta fase (BUSTIN, 1999).

Com relação ao conteúdo proteico, como mencionado anteriormente, não foi possível detectar esta proteína no lisado celular de células eritróides maduras de nenhum dos grupos analisados. Em indivíduos saudáveis esses achados podem estar relacionados as funções estritamente nucleares de *HMGB1*, sendo que, uma vez que tenha cumprido seu

papel na diferenciação eritróide, a proteína é então degradada e, portanto, não está presente na hemácia. Entretanto, o perfil crescente de expressão de HMGB1 nas culturas beta talassêmicas intermediárias pode estar relacionado a sua participação em uma via de sinalização de apoptose e inflamação. Uma vez que a morte celular precoce e acentuada é uma característica da talassemia. Sabe-se que células em processo de necrose e morte celular secretam HMGB1 para o meio extracelular, por vias não clássicas, o que justificaria a ausência desta proteína no citoplasma das células eritróides maduras mesmo com o aumento do RNAm observado nas culturas de beta talassemia intermediária. Sendo assim investigamos a presença desta proteína no plasma de pacientes beta talassêmicos intermediários e indivíduos saudáveis, e nossos achados mostraram um importante aumento na presença de HMGB1 nestes pacientes, dando suporte a nossa hipótese inicial

Apesar de não termos analisado pacientes beta talassêmicos maiores, um estudo realizado por Chirico e colaboradores encontrou níveis elevados de HMGB1 no plasma destes pacientes (CHIRICO et al,2015). Desse modo, podemos supor que os níveis elevados de HMGB1 no plasma de indivíduos beta talassêmicos é uma característica da doença que ocorre em ambos os fenótipos, embora estudos adicionais sejam necessários para determinar se há possíveis variações nos níveis de HMGB1 entre estes fenótipos. Como descrito anteriormente, a presença de HMGB1 no plasma destes pacientes pode estar ligada não somente a morte celular eritróide, mas também aos processos infecciosos recorrentes, característica bem conhecida desta patologia, visto que HMGB1 também atua como marcador tardio de processos inflamatórios. As características funcionais desta proteína, somadas aos nossos achados a tornam um interessante alvo para estudos futuros.

É importante ressaltar que as amostras utilizadas para a construção da biblioteca SAGE original foram obtidas a partir de pacientes com a mutação CD39, enquanto aquelas utilizadas neste estudo como forma de validação e avaliação possuem mutações distintas, sendo os pacientes intermediários portadores da mutação IVS-1-6 e os pacientes maiores possuindo mutações diversas. A expressão destes genes de maneira similar apesar de mutações tão distintas nos leva a crer que eles podem sim estar relacionados aos diferentes fenótipos encontrados nos pacientes.

De acordo com os dados apresentados acima, pode-se concluir que todos os genes analisados apresentaram um bom prospecto como alvos a serem investigados mais a fundo, trazendo novidades no entendimento do que leva aos diferentes fenótipos da beta talassemia. Uma vez validados os dados obtidos pelo SAGE, nossos resultados contribuem com dados inéditos para a literatura e podem evidenciar no caso da expressão

diferencial de *ABCB10*, uma resposta mais eficiente contra o estresse oxidativo, além de um importante papel na diferenciação eritróide em pacientes BTI. A maior produção de APEX1 em pacientes beta talassêmicos, parece ser independente do fenótipo estando associada com a doença e relacionada ao aumento de estresse oxidativo observado nestes pacientes. Finalmente, o aumento de secreção de HMGB1 no plasma de pacientes pode estar associado aos quadros inflamatórios prolongados, contribuindo para a citotoxicidade sistêmica. Os dados aqui apresentados contribuem para um melhor entendimento da doença, apontando novos alvos para estudos futuros.

## 7. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

Através deste estudo foi possível validar a metodologia SAGE empregada. Ainda que não tenha sido possível avaliar os níveis proteicos de ABCB10, os resultados encontrados nos experimentos de expressão gênica indicam que o aumento deste nos pacientes intermediários possivelmente está relacionado a uma melhor eritropoiese e uma capacidade de citoproteção contra o estresse oxidativo.

Com relação a HMGB1 acreditamos que ele possa estar atuando de maneira diferente nos indivíduos sadios e nos pacientes. Enquanto nos indivíduos sadios este se limita a suas ações como regulador transcricional durante o processo de maturação eritróide, os pacientes exibem também sua função de marcador de morte celular, que se encontra aumentada na doença. Analisando o quadro geral da patologia, essa expressão extra de HMGB1 contribui para quadros inflamatórios exacerbados, culminando em um ambiente ainda mais citotóxico e prejudicial para os pacientes.

Por fim, o gene *APEX1* foi o que se mostrou mais promissor. Seu papel duplo como um reparador de DNA e como ativador de diversos fatores de transcrição envolvidos na resposta redox o tornam um importante alvo em estudos de sobrevivência celular, principalmente relacionados ao estresse oxidativo, uma vez que a literatura também aponta uma importante relação deste gene com outros de grande relevância para a manutenção do estado redox.

Portanto, podemos afirmar que este trabalho contribui com dados inéditos para a literatura e abre novas perspectivas e alvos a serem estudados mais profundamente e que ajudem a melhor compreender a fisiopatologia de uma doença de extrema importância na saúde pública. Assim estes genes poderão no futuro serem alvos de estudo que auxiliem tanto no diagnóstico quanto no prognóstico da doença e contribuam para a melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

## 8. REFERENCIAS

- AESSOPOS, A.; BERDOUKAS, V; TSIRONI, M. The heart in transfusion dependent homozygous thalassaemia today prediction, prevention and management. **Eur J Haematol.** v.80, n.2, p. 93-106, 2008.
- AGAR, N. S. et al. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? **J Clin Invest.** v.77, n.1, p. 319-321, 1986.
- ANGKEOW, P. et al. Redox factor-1: an extra-nuclear role in the regulation of endothelial oxidative stress and apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 9, n. 7, p. 717-725, 2002.
- AOSHIBA, K. Y. et al. Red blood cells inhibit apoptosis of human neutrophils. **Blood.** v. 93, n.11, p. 4006-4010, 1999.
- ARAÚJO, A.S. et al. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. **Hemoglobin.** v.27, n.4, p. 211-217, 2003.
- AUDIC, S.; CLAVERIE, J. The significance of digital gene expression profiles. **Genomeresearch**, v. 7, n. 10, p. 986-995, 1997.
- AZEVEDO, M. R. A. de. Hematopoes. In: AZEVEDO, M. R. A. **Hematologia básica: fisiopatologia estudo laboratorial.** São Paulo: LuanaLivrariaEditora, 2008. p. 49-63.
- BANK A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood.** v.107, n.2, p. 435-443, 2006.
- BANK, A. Understanding globin regulation in  $\beta$ -thalassemia: it's a sample as  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . **J. Clin. Invest.** v.115, n.6, p. 1470-1473, 2005.
- BAPAT, A.; FISHEL, M. L.; KELLEY, M. R. Going ape as an approach to cancer therapeutics. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 3, p. 651-667, 2009.
- BAYEVA, M. et al. ABCB10 Regulates Early Steps of Heme Synthesis. **Circulation research**, p. CIRCRESAHA. 113.301552, 2013.
- BHAKAT, K. K.; MANTHA, A. K.; MITRA, S. Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 3, p. 621-637, 2009.
- BONALDI, T. et al. The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. **The EMBO journal**, v. 21, n. 24, p. 6865-6873, 2002.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias.** São José do Rio Preto, SP: Editora HN, v.1, 2006.
- BOUNDURANT, M.C.; KOURY, M.J. Origin and development of blood cells. In: **Wintrobé's Clinical Hematology.** 10<sup>th</sup> ed. 1999. p. 145- 168.

BROWN, J. M. et al. Erythrocytes decrease myocardial hydrogen peroxide levels and reperfusion injury. **Am J Physiol.** v. 256, n.2 Pt 2, p. 584-588, 1989.

CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. **Genet Med.** v. 12, n.2, p. 61-76, 2010.

CAPPELLINI, N. et al. **Guidelines for the clinical management of thalassemia.** Thalassaemia International Federation (TIF), 2000, 111p.

CAPRARI, P. A. et al. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **ExpGerontol.** v.34, n.1, p. 47-57, 1999.

CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chem Phys Lipids.** v.157, n.1, p. 1-11, 2009.

CELONA, B. et al. Substantial histone reduction modulates genome wide nucleosomal occupancy and global transcriptional output. **PLoS biology**, v. 9, n. 6, p. e1001086, 2011.

CHEN, W. et al. Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 38, p. 16263-16268, 2009.

CHEN, W.; DAILEY, H.A.; PAW, B.H. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 628-630, 2010.

CHIRICO, V. et al. Thalassaemia major and infectious risk: High Mobility Group Box-1 represents a novel diagnostic and prognostic biomarker. **British journal of haematology**, v. 171, n. 1, p. 130-136, 2015.

CIMEN, M. Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. **ClinChim Acta.** v. 390, n.1-2, p. 1-11, 2008.

CLASTER, S. et al. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. **Blood.** v. 64, n.5, p. 1079-1084, 1984.

CROOP, J.M. [8] Evolutionary relationships among ABC transporters. **Methods in enzymology**, v. 292, p. 101-116, 1998.

DA CUNHA, A. F. et al. Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia. In: LOGIE, C. **Point Mutation.** Intech, 2012. 352p.

DA CUNHA, A. F. et al. Global gene expression reveals a set of new genes involved in the modification of cells during erythroid differentiation. **CellProlif.** v.43, n.3, p. 297-309, 2010.

DESSY, C. et al. Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vaso relaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. **Circulation**. v.110, n.8, p. 948-954, 2004.

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

DHALIWAL, G.; CORNETT, P. A.; TIERNEY, L. M. Jr. Hemolytic anemia. **Am Fam Physician**. v.69, n.11, p. 2599-2606, 2004.

DOS SANTOS, M.H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (Coffea arabica). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604, 2007.

DUMASWALA, U. J. et al. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. **Free Radic Biol Med**. v.27, n.9-10, p. 1041-1049, 1999.

DZIERZAK, E. A developmental approach to hematopoiesis. In: STEINBERG, M.H. et al. **Disorders of hemoglobin**. Cambridge, UK. 2001. 1268p. ed. Oxford University Press. Oxford, UK. 2007. 900p.

EMA, M. et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 $\alpha$  in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. **The EMBO journal**, v. 18, n. 7, p. 1905-1914, 1999.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **Am J Clin Nutr**. v.57, n.5, p. 779-785, 1993.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Curr Mol Med**. v.8, p. 609-619, 2008.

FORGET, B. G. Molecular mechanisms of  $\beta$  Thalassemia. In: STEINBERG, M. H. et al. **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management**. New York: Cambridge University, 2001. p. 252-276.

GAIDDON, C.; MOORTHY, N. C.; PRIVES, C. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. **The EMBO journal**, v. 18, n. 20, p. 5609-5621, 1999.

GHAFFARI, S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. **Antioxid Redox Signal**. v.10, n.11, p. 1923-1940, 2008.

GIAVARA, S. et al. Yeast Nhp6A/B and mammalian Hmgb1 facilitate the maintenance of genome stability. **Current biology**, v. 15, n. 1, p. 68-72, 2005.

GIROTTI, A. W. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. **Free Radic Biol Med**. v.44, n.6, p. 956-968, 2008.

- GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. **J Biol Chem.** v.265, n.32, p. 19453-19460, 1990.
- GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. Mechanism of the formation and proteolytic release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in hemoglobin and red blood cells. **J Biol Chem.** v.276, n.26, p. 24129-24136, 2001.
- GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Reactivity of peroxynitrite versus simultaneous generation of (\*)NO and O(2)(\*)(-) toward NADH. **Chem Res Toxicol.** v.13, n.8, p. 736-741, 2000.
- GROSVELD, F; DILLON, N.; HIGGS, D. The regulation of human globin gene expression. **Baillière'sClin. Haematol.** v.6, n.1. p. 31-55, 1993.
- GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem.** v.41, n.12 Pt 2, p.1819-1828, 1995.
- HAFSI, H.; HAINAUT, P. Redox control and interplay between p53 isoforms: roles in the regulation of basal p53 levels, cell fate, and senescence. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 6, p. 1655-1667, 2011.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem.** v.97, n.6, p. 1634-1658, 2006.
- HALLIWELL, J.; GUTTERIDGE, M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4 HEBBEL, R. P. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **Clin. Invest.** v.70, n.6, p. 1253-1259, 1982.
- HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu. Rev. Cell Biol.** 1992; 8:67-113.
- HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. **Curr. Opin. Hematol.** v.15, n.3, p. 176-183, 2008.
- HOFFMAN, R. et al. **Hematology: Basic Principles and Practice.** 2<sup>nd</sup> ed. New York, Churchill Livingstone – ELSEVIER, 2008.
- HUISMAN H, J. et al. HbVar: A HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. **Hum Mutat.** v.19, n.3, p. 225- 233, 1996.
- HUNTER, G. A.; FERREIRA, G. C. 5-Aminolevulinate synthase: catalysis of the first step of heme biosynthesis. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 55, n. 1, p. 102, 2009.
- HYDE, B. B. et al. The mitochondrial transporter ABC-me (ABCB10), a downstream target of GATA-1, is essential for erythropoiesis in vivo. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 7, p. 1117, 2012.

INOUE, M. et al. Free radical theory of apoptosis and metamorphosis. **Redox Rep.** v.9, n.5, p. 237-247, 2004.

IUCHI, T. Anemia Caused by Oxidative Stress. In: SILVERBERG, D. *Anemia*. InTech: 2012, p 49-62

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Mol Aspects Med.** v.26, n.4-5, p. 340–352, 2005.

KANG, R. et al. Intracellular Hmgb1 inhibits inflammatory nucleosome release and limits acute pancreatitis in mice. **Gastroenterology**, v. 146, n. 4, p. 1097-1107. e8, 2014.

KENNETT, E. C. et al. Investigation of methaemoglobin reduction by extracellular NADH in mammalian erythrocytes. **Int J Biochem Cell Biol.** v.37, n.7, p. 1438-1445, 2005.

KHAN, A.A.; QUIGLEY, J.G. Control of intracellular heme levels: heme transporters and hemoxygenases. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 668-682, 2011.

KHATTAB, A. D; RAWLINGS, B., ALI, I. S. Care of patients with haemoglobin abnormalities: history and biology. **Br J Nurs.** 2006; v.15, n.18, p. 994-8, 2006.

LANGE, S. S.; MITCHELL, D. L.; VASQUEZ, K. M. High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10320-10325, 2008.

LANGE, S.S.; Reddy, M.C.; Vasquez, K.M. Human HMGB1 directly facilitates interactions between nucleotide excision repair protein on triplex-directed psolareninterstrand crosslink. **DNA Repair (Amst).** 2009; 8(7):865-872.

LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22, n.3, 2000.

LIESA, M. et al. The mitochondrial transporter ABC-me (ABCB10) is a novel gene required for cardiac recovery after ischemia-reperfusion. **Circulation**, v. 124, n. 7, p. 806, 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAGGIO, A.; CARONIA, F.; RUSSO, G. **Clinica e terapia dellatalassemia**. Limena: LibreriaUniversitaria, 2000. p. 61-94.

MAILLET, A.; PERVAIZ, S. Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 11, p. 1285-1294, 2012.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. **J Dermatol Sci.** v.58, n.2, p. 85-90, 2010.

MIGLIACCIO, A. R.; PAPAYANNOPOULOU, T. Erythropoiesis. In: STEINBERG, M. H. et al. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management.** Cambridge University Press, 2001. p. 52-71.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur J Clin Invest.** v.21, n.4, p. 361-374, 1991.

MULLER, F. L. et al. Trends in oxidative aging theories. **Free Radic Biol Med.** v.43, n.4, p. 477-503, 2007.

NAGABABU, E.; Rifkind, J.M. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2000; 273:839-845.

NAGEL, R. L.; STEINBERG, M. H. Genetics of  $\beta^S$  gene: origins, genetic, epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: STEINBERG, M. H. et al. **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management.** Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 711-755.

OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.** v. 67, n. 1, p. 71-86, 2007.

OZAKI, M.; SUZUKI, S.; IRANI, K. Redox factor-1/APE suppresses oxidative stress by inhibiting the rac1 GTPase. **The FASEB Journal,** v. 16, n. 8, p. 889-890, 2002.

PANDEY, K. B; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxid Med Cell Longev.** v.3, n.1, p. 2-12, 2010.

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

RAMANA, C. V. et al. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 95, n. 9, p. 5061-5066, 1998.

RIBEIRO, D. M. et al. Influence of the polymorphisms of the alpha-major regulatory element HS-40 on in vitro gene expression. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 42, n. 9, p. 783-796, 2009.

ROWELL, J. P. et al. HMGB1-facilitated p53 DNA binding occurs via HMG-Box/p53 transactivation domain interaction, regulated by the acidic tail. **Structure,** v. 20, n. 12, p. 2014-2024, 2012.

RUSANOVA, I. et al. Oxidative Stress Status, Clinical Outcome, and beta-Globin Gene Cluster haplotypes in Sickle Cell Pediatric Patients. **Eur J Haematol.** v.85, n.6, p. 529-537, 2010.

RYTER, S.W.; TYRRELL, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 2, p. 289-309, 2000.

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

SCOTT, M. D. et al. Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense. **Blood**. v.74, n.7, p. 2542–2549, 1989.

SHIOTA, Masaki et al. Ets regulates peroxiredoxin1 and 5 expressions through their interaction with the high-mobility group protein B1. **Cancer science**, v. 99, n. 10, p. 1950-1959, 2008.

SHIRIHAI, O.S. et al. ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. **The EMBO journal**, v. 19, n. 11, p. 2492-2502, 2000.

SHIRIHAI, O.S., et al. ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. **EMBO J.** 2000; v19, 11:2492-2502.

SILBER, J. R. et al. The apurinic/aprimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 9, p. 3008-3018, 2002.

SINGH, J.; DIXON, G.H. High mobility group proteins 1 and 2 function as general class II transcription factors. **Biochemistry** 1990; 29:6295–6302.

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

STADTMAN, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radic Biol Med**. v.9, n.4, p. 315-325, 1990.

STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Exp. Hematol**. v.33, n.3, p. 259-271, 2005.

STARK, K. et al. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. **Blood**, p. blood-2016-04-710632, 2016.

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med**. v.320, v.14, p. 915-924, 1989.

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

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**. v.129, n.4, p. 465-81, 2005.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**. v.6, n.8, p. 662-680, 2007.

- TANG, T. K. Free radical theory of erythrocyte aging. **J Formos Med Assoc.** v.96, n.10, p. 779-783, 1997.
- TELEN, M.; KAUFMAN, R. The mature erythrocyte. In: GREER, J. P. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology.**Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 217–247.
- TELL, G. et al. Ref-1 controls pax-8 DNA-binding activity.**Biochemical and biophysical research communications**, v. 252, n. 1, p. 178-183, 1998.
- TELL, G. et al. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 3, p. 601-619, 2009.
- THEIN, S. L. Beta-thalassaemia. **BaillieresClinHaematol.** v.11, n.1, p.91-126, 1998.
- THEIN, S.L. Genetic insights into clinical diversity of  $\beta$  thalassemia. **British Journal of Haematology.** 2004; v124, pp 264-274.
- VILA, A.; KORYTOWSKI, W.; GIROTTI, A. W. Spontaneous transfer of phospholipid and cholesterol hydroperoxides between cell membranes and low-density lipoprotein: assessment of reaction kinetics and prooxidant effects. **Biochemistry.** v.41, n.46, p.13705-13716, 2002.
- VOLPE, E. Blood and circulation. In: DUBUQUE, W. **Biology and Human Concerns.** p. 253-265, Wm.C.Brown, 1993.
- VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in  $\beta$ -thalassaemia and sickle cell disease. **Redox biology**, v. 6, p. 226-239, 2015.
- WANG, H. et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. **Science**, v. 285, n. 5425, p. 248-251, 1999.
- WATANABE, A. M. **Prevalência da anemia falciforme no estado do Paraná.** Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Departamento de Clínica Médica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Genetic disorders of hemoglobin. **Semin. Hematol.**, v. 36, n. 4, p. 24-37, 1999.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The Thalassaemia syndromes.** 3ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1981.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v.79, n.8, p.704-712, 2001b.
- WEATHERALL, D.J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. **Nat. Rev. Genet.** v.2, n.4, p. 245-255, 2001a.

WEATHERALL, DJ. The Thalassemias In: Williams, W. J. et al. **Hematology**. 4Ed. New York: McGraw Hill Book Company, 1990.

WEISS, M.J.; KELLER, G.; ORKIN, S.H. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. **Genes & development**, v. 8, n. 10, p. 1184-1197, 1994.

WEISS, M.J.; YU, C.; ORKIN, S.H. Erythroid cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell-line. **Mol Cell Biol**. 1997; 17:1642-1651.

WENNING, M. R.; SONATI, M. F. Hemoglobinopatiashereditárias. In: LOPES, A.C. **Diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Manole, 2007. p. 310-314.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radic Biol Med**. v.45, n.5, p. 549-561, 2008.

XANTHOUDAKIS, S.; CURRAN, T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. **The EMBO journal**, v. 11, n. 2, p. 653, 1992.

XANTHOUDAKIS, S.; MIAO, G.G.; CURRAN, T. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 1, p. 23-27, 1994.

XU, Y. et al. Formation of hydrogen peroxide and reduction of peroxynitrite via dismutation of superoxide at reperfusion enhances myocardial blood flow and oxygen consumption in postischemic mouse heart. **J PharmacolExp Ther**. v.327, n.2, p. 402-410, 2008.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e práticas**. São Paulo. Editora: Atheneu, 2001. 1442p.

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

ZOU, G.M. et al. Ape1 regulates hematopoietic differentiation of embryonic stem cells through its redox functional domain. **Blood**, 2007, 109.5: 1917-1922.

## ANEXOS

### Anexo 1

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

**Pesquisa:** Análise da expressão gênica e conteúdo proteico de *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* em pacientes com beta talassemia intermediária e maior.

**Pesquisadores:** Anderson Ferreira da Cunha, João Pedro Maia de Oliveira da Silva, Karen Simone Romanello, Karina Kirschner Lopes, Iran Malavazi, Aderson da Silva Araújo, Marcos André Cavalcanti Bezerra, Igor de Farias Domingos, Diego Antônio Pereira Martins, Fernando Ferreira Costa, Marcos Antonio de Oliveira.

**Local:** UFSCar e HEMOPE.

A finalidade deste projeto é trazer informações para o paciente sobre o estudo **“Análise da expressão gênica e conteúdo proteico de *ABCB10*, *APEX1* e *HMGB1* em pacientes com beta talassemia intermediária e maior.”** Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que o paciente possa ter sobre este termo e sobre o estudo. Cada participante da pesquisa receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Neste projeto estamos propondo analisar a relação dos genes *ABCB10*, *APE1* e *HMGB1* e as respectivas proteínas em pacientes com beta talassemia intermediária e maior, buscando elucidar a participação dos mesmos na evolução do quadro clínico destas. A beta talassemia se caracteriza pela má formação das cadeias de beta globina de proteínas presentes nas hemácias. Clinicamente, a beta talassemia se manifesta de três formas distintas: menor, intermediária e maior. Um paciente com beta talassemia menor é praticamente assintomático, raramente apresentando anemia moderada. Os pacientes portadores de beta talassemia intermediária podem precisar de transfusões sanguíneas com frequência, e os que apresentam beta talassemia maior precisam de transfusões de sangue constantes, além de apresentarem outras complicações decorrentes da precipitação e morte prematura das células sanguíneas.

Para participar, caso você queira, deverá doar 2 frascos (4 colheres de sopa cada) de sangue. A coleta de sangue será realizada em ambiente confortável e privativo por profissional habilitado em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de antisepsia preconizados para este tipo de procedimento. A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde do paciente. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Além disso, serão levantados alguns dados de seu prontuário médico e você deverá responder um pequeno questionário. Você terá direito à total privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo, havendo risco mínimo de vazamento de informação devido ao acesso restrito aos dados. Para isso, na ficha de exame clínico não aparecerá nenhum nome que o identifique, apenas um número que somente o pesquisador principal saberá a quem se refere. O material desse estudo, caso você permita, será armazenado no HEMOPE e UFSCar e somente será utilizado para outros estudos após nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e nova assinatura em TCLE específico para a pesquisa a ser realizada.

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

Você terá ampla liberdade de se recusar a participar do estudo ou retirar seu consentimento ou amostra biológica em qualquer fase deste, sem que isto afete os seus cuidados médicos no presente ou no futuro, ou traga qualquer tipo de prejuízo com as Instituições envolvidas. Você terá também direito a esclarecimentos sobre o estudo a qualquer hora e permissão para contatar o CEP da UFSCar no caso de quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou quanto aos pesquisadores.

Você terá direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo. Os resultados deste projeto poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

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

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

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

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

**Endereço:** Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310, Bairro Monjolinho - Universidade Federal de São Carlos - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Departamento de Genética e Evolução- Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada. Tel.: + 55 16 3351-8318

#### **Consulta de questões éticas**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS PRO-REITORIA DE PESQUISA

Rod. Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676 - 13.565-905 São Carlos – SP

Telefone: (16) 3351-8028

fcruz@ufscar.br

Comitê de Ética da Fundação HEMOPE

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171 – Graças – 52011-000 Recife, PE

Telefone: (81) 3182-4660

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

Outros pontos importantes foram enfatizados:

- 1- Ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento ou amostra biológica em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo.
- 2- Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.
- 3- Garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.
- 4- Quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou dos pesquisadores, posso contatar o CEP do HEMOPE e UFSCar.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe responsável, à manipulação dos dados e ao armazenamento de material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros depois de submetidos ao CEP e ao CONEP.

Consentimento para participação no estudo:

\_\_\_\_\_  
Voluntário/ Responsável

Autorização para armazenamento de material biológico:

- Sim  
 Não

\_\_\_\_\_  
Voluntário/ Responsável

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável