Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

FLÁVIA PEIXOTO ALBUQUERQUE

TÍTULO: ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *FOXO3* NA INDUÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL EM CÉLULAS K562

RECIFE
2018

FLÁVIA PEIXOTO ALBUQUERQUE

TÍTULO: ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *FOXO3* NA INDUÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL EM CÉLULAS K562

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

RECIFE
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Albuquerque, Flávia Peixoto
Análise funcional do gene *FOXO3* na indução de hemoglobina fetal em células K562 / Flávia Peixoto Albuquerque. – 2018.

77 f. : il.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2018.
Inclui referências e anexo.

1. Sangue – Doenças 2. Doenças hereditárias I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador) II. Título.

616.15 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2018 - 102

Elaborado por Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

FLÁVIA PEIXOTO ALBUQUERQUE

ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE FOXO3 NA INDUÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL EM CÉLULAS K562

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em 01 / 02 / 2018

Banca Examinadora:

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Tercílio Calsa Júnior

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neide Santos

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Fabiana Aparecida Cavalcanti Silva

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A meu orientador e co-orientador, Marcos André Cavalcanti Bezerra e Antonio Roberto Lucena de Araujo, por todos os ensinamentos passados, por oferecerem incentivos, compartilharem ideias, que influíram na construção deste trabalho, pela atenção, carinho e apoio que me foi oferecido nesse tempo em que pudemos desfrutar de bons momentos de crescimento acadêmico e pessoal em nosso laboratório.

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão, por todo o esforço feito para me instruir em cada passo dado, com muito amor, por terem feito tudo pela minha construção pessoal, permitindo que hoje eu possa realizar mais uma etapa de maneira honrosa, e pelo exemplo de moral e boa conduta que me passaram. Agradeço também a todos os meus familiares que sempre se fizeram presentes em todos os momentos.

A Diniz, por compreender minhas obrigações, por me ajudar e dar forças para seguir em frente, mesmo com tantos contratempos, pela paciência, incentivo e ajuda que não faltaram ao longo dessa caminhada.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório em especial, Diego e Pedro Luiz, por todo o auxílio no projeto e companheirismo, além de todos os conhecimentos partilhados, desde o princípio.

A esta universidade, a qual faz parte da minha rotina a 7 anos e a toda a sua equipe técnico-administrativa, bem como todo o corpo discente que colaboraram para esta realização.

A todos que, mesmo não sendo aqui listados, mas que tiveram participação nessa conquista, os meus mais sinceros agradecimentos.

É difícil em tempos como estes: ideais, sonhos e esperanças permanecerem dentro de nós, sendo esmagados pela dura realidade. É um milagre eu não ter abandonado todos os meus ideais, eles parecem tão absurdos e impraticáveis. No entanto, eu me apego a eles, porque eu ainda acredito, apesar de tudo, que as pessoas são realmente boas decoração".

Anne Frank

RESUMO

As β-hemoglobinopatias são conhecidas como desordens genéticas com ampla distribuição mundial e prognóstico clínico crônico e variável. Essas patologias têm seus sintomas e sequelas amenizados com o aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF; α2γ2). O único fármaco autorizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) é a hidroxiureia, que mesmo sendo eficiente para manutenção e controle do desenvolvimento das principais manifestações clínicas destes pacientes, necessita de pré-requisitos para o seu uso. O fator de transcrição *Forkhead Box O 3* (*FOXO3*), foi descrito como um regulador fisiológico do processo maturativo eritróide e apontado como um regulador positivo dos níveis de HbF. No presente trabalho, avaliamos os níveis de expressão do gene *FOXO3* em pacientes portadores de hemoglobinopatias e, para melhor entendermos sobre a fisiopatologia da doença, realizamos a subclonagem do gene *FOXO3* em um sistema de expressão lentiviral*,* subseqüentemente avaliamos o seu papel como possível indutor positivo dos genes produtores das cadeias gama globínicas *(HBG1 e HBG2).* Na sequência, nós avaliamos a indução dos genes precursores de HbF (*HBG1* e *HBG2*). No cenário clínico, a expressão do *FOXO3* foi significativamente maior em pacientes portadores de doença falciforme quando comparado com doadores saudáveis (HbAA) e pacientes com β-talassemia (*P*<0,001). Além disso, a expressão diferencial de *FOXO3* foi associada com o desenvolvimento de úlcera de membros inferiores (*P*<0,005). Foi observada uma tendência (*P*=0,06) ao aumento da expressão de *FOXO3* nos pacientes com 2 ou mais manifestações clínicas. O mesmo foi observado quando o número de complicações clínicas dos pacientes no último ano foi associado aos níveis de HbF: pacientes com 2 ou mais complicações apresentaram níveis mais baixos de HbF, embora esta diferença não tenha atingido significado estatístico (*P*=0,182). Não houve correlação entre os níveis de expressão de *FOXO3* e a dosagem de HbF (r=-0,12). Diante da suposta atividade do gene *FOXO3* no controle do estresse oxidativo foram realizados experimentos que avaliaram a taxa de ROS e de NO na cultura celular e foi mostrado um papel significativo do gene no aumento da produção de NO (*P*=0,0001) bem como no controle de ROS produzidos pelas mitocôndrias.

Palavras-chave: β-hemoglobinopatias. *FOXO3.* Hidroxiuréia.

ABSTRACT

The β-hemoglobinopathies are known as genetic disorders of high impact and wide distribution worldwide, with chronic and variable clinical prognosis. These pathologies have their symptoms and sequelae alleviated by increased levels of fetal hemoglobin (HbF; α2γ2). The only authorized drug by the Food and Drug Administration (FDA) is the hydroxyurea, which remains efficient in maintaining and controlling the development of the major clinical manifestations of these patients, but requires some prerequisites for its use, and a regular patient follow-up. The transcription factor Forkhead Box O 3 (FOXO3) has been previously described as a physiological regulator of the erythroid maturation process and has been recently approved as a positive regulator of HbF levels. In the present work, we evaluated the expression levels of the FOXO3 gene in patients with hemoglobinopathies and, in an attempt to better understand the pathophysiology of the disease, we performed a subcloning of the FOXO3 gene into a lentiviral expression system for its constitutive expression in vitro and subsequent evaluation of its activity as a possible transcription factor for γ globin genes (HBG1 and HBG2). Subsequently, we evaluated an induction of the HbF precursor genes (HBG1 and HBG2). In our clinical study, FOXO3 expression was significantly higher in patients with sickle cell anemia when compared to healthy donors (HbAA), patients with β-thalassemia and β-thalassemic trait (Hassstein HbS-β) ($P < 0.001$) . In addition, a differential expression of FOXO3 was associated with the development of lower limb ulcer ($P < 0.005$). Although we observed a tendency to increase FOXO3 expression in patients with 2 or more clinical manifestations, this association was not statistically significant ($P = 0.06$). The same was observed when we compared the number of clinical complications presented by patients last year with HbF levels: patients with 2 or more complications had lower levels of HbF, although this difference did not reach statistical significance ($P = 0.182$). There was no correlation between FOXO3 expression levels and HbF dosage ($r = -0.12$). Because of the activity of the FOXO3 gene in the control of oxidative stress, experiments were performed to evaluate the ROS and NO rates in the cell culture and a significant role was found, the FOXO3 increasing NO production ($P = 0.0001$) as well as in control of ROS produced in mitochondria.

Key-words: β-hemoglobinopatias. *FOXO3.* Hidroxiureia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processo de hematopoese primitivo e definitivo. 26

Figura 2. Sequência de maturação eritroblástica. 30

Figura 3. Estrutura da Hemoglobina A (Hb A). 32

Figura 4. Controle gênico da síntese das hemoglobinas embrionárias, fetal e adulta, mostrando os mecanismos de "*Switching*" das hemoglobinas. 33

Figura 5. Mecanismos propostos para modulação da hemoglobina fetal. 36

Figura 6. Número de recém-nascidos com anemia falciforme em cada país no ano de 2015. 39

Figura 7. Processo de vaso oclusão presente nos pacientes portadores de anemia falciforme. 41

Figura 8. Esquema representando a eritropoese em pacientes portadores de β talassemia: Passos e componentes moleculares. 44

Figura 9. Organização estrutural dos genes da família *FOX.* 49

Figura 10. Expressão gênica diferencial do *FOXO3* em reticulócitos de pacientes portadores de hemoglobinopatias. 52

Figura 11. Correlação entre os níveis de expressão do gene *FOXO3* e complicações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. 53

Figura 12. Correlação entre os níveis de expressão de *FOXO3* e grupos de complicações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. 54

Figura 13. Correlação entre os níveis de expressão do gene *FOXO3* e de hemoglobina fetal em pacientes portadores de anemia falciforme. 55

Figura 14. Correlação entre os níveis de expressão de HbF e complicações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. 56

Figura 15. Vetor de clonagem pGEX que contém o gene *FOXO3*. 57

Figura 16. Digestão do vetor de clonagem pGEX. 58

Figura 17. Vetor de expressão pCDH1-MCS1-EF1-GFP-PURO (pMEG). 59

Figura 18. Confirmação do sucesso da sub-clonagem do gene *FOXO3* no vetor de expressão retroviral pMEG. 60

Figura 19. Expressão da proteína GFP em células HEK293T pós transfecção, evidenciando a produção da partícula viral. 61

Figura 20. Resultado da citometria de fluxo para positividade da proteína GFP em células K562. 62

Figura 21. Análise da produção de óxido nítrico. 63

Figura 22. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio. 64

Figura 23. Proposta da atividade do gene *FOXO3* interferindo na fisiopatologia da anemia falciforme. 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL1	*Abelson Leukemia gene*
AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
BCAM/Lu (CD239)	Basal cell adhesion molecule
BCR	*Breakpoint Cluster Region*
CAR	Haplótipo Bantú
CDs	Cluster of differentiation
cDNA	DNA complementar
Cl	Cloro
CO	Monóxido de carbono
CO_2	Dióxido de carbono
DF	Doença falciforme
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EF1α	*Human elongation factor 1 alpha*
FDA	*Food and Drug Administration*
Fe	Ferro
FOXO3	*Forkhead box O3*
GAPDH	*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
GFP	*Green Fluorescent Protein,* do inglês.
GLU	Glutamina
Hb	Hemoglobina
HPFH	Persistência hereditária de hemoglobina fetal
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HU	Hidroxiuréia
ICAM-4	Intercellular Adhesion Molecule-4

IL-1	Interleucina 1
K	Potássio
LB	Meio Luria-Bertani
NO	Óxido nítrico
O_2	Oxigênio
pCMVΔR8.74	Plasmideo de segunda geração para produção de lentivírus
PCR	Do inglês, *Polymerase Chain Reaction*
PURO	Puromicina
PVDF	Polivinilidenfluoruro
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	*Single nucleotide polymorphisms*
STBL3	*One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent E. coli*
SUS	Sistema único de saúde
TNF-α	Fator de necrose tumoral alpha
VAL	Valina
VCAM-1	*Vascular cell adhesion protein 1*
VLA-4	*Very Late Antigen-4*
VSV-G	Proteína envelopada para produção de lentivírus
α	Alpha
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ε	Epsilón
ζ	Zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO…… 14
1.1 OBJETIVOS…… 16
1.1.1 Objetivo Geral…… 16
1.1.2 Objetivos Específicos…… 16
1.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS…… 16
1.2.1 Causuística…… 16
1.2.2 Coleta de dados clínicos e laboratoriais…… 17
1.2.3 Extração de RNA total…… 17
1.2.4 Quantificação do RNA total…… 18
1.2.5 Síntese da primeira fita do DNA complementar.. 19
1.2.6 Clonagem, expansão e purificação do gene *FOXO3*…… 19
1.2.7 Sub-clonagem do gene *FOXO3* no vetor de expressão lentiviral…… 20
1.2.8 Cultivo e transfecção de células empacotadoras virais…… 21
1.2.9 Cultivo de células de linhagem K562 para uso como células-alvo do sistema lentiviral e seleção de células eficientemente infectadas…. 21
1.2.10 Análise estatística…….. 22
1.2.11 Ensaios in vitro…… 23
1.2.11.1 Análise da expressão do gene *FOXO3*…….. 23
1.2.11.2 Análise da indução de gama (ɣ) globina…….. 23
1.2.11.3 Análise das taxas de estresse oxidativo…… 24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA……. 25
2.1 Hematopoese…… 25
2.2 Eritropoese…… 27
2.2.1 Eritrócitos…….. 29
2.3 Hemoglobinas…… 31
2.4 Hemoglobina fetal e células F…… 34

2.5 Hemoglobinopatias…… 37
2.5.1 Anemia falciforme…….. 38
2.5.1.1 Etiologia e epidemiologia…… 38
2.5.1.2 Fisiopatologia…… 39
2.5.2 Talassemia β…… 42
2.6 Hidroxiureia…… 45
2.7 *FOXO3*…… 48
3 ANÁLISE DE RESULTADOS…… 52
3.1 Análise da expressão do gene *FOXO3* e dos níveis intracelulares de HbF, em pacientes portadores de hemoglobinopatias…….. 52
3.2 Expansão e purificação do gene *FOXO3*……... 56
3.3 Sub-clonagem do gene *FOXO3* no sistema de impressão lentiviral pMEG…….. 58
3.4 Cultivo e transfecção de células empacotadoras (293T)……. 60
3.5 Cultivo de células de linhagem K562 e infecção com partículas virais contendo o gene *FOXO3*…… 62
3.6 Análise das taxas de produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio……. 62
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS…… 65
REFERÊNCIAS ……..……. 71
ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA…. 77

1 INTRODUÇÃO

As doenças da hemoglobina (Hb), conhecidas sumariamente como hemoglobinopatias, estão associadas com defeitos estruturais (mutações pontuais) e problemas relacionados ao ritmo de síntese das cadeias globínicas. Dentre os defeitos estruturais mais importantes destaca-se a HbS ($\alpha_2\beta_2$; 6 GLU→VAL), conhecida pela gravidade e frequência, particularmente entre os povos afrodescendentes. O termo “doenças falciformes” (DF) é usado para identificar condições em que existe a associação da HbS com outra alteração de Hb, seja ela estrutural ou talassêmica, levando a um quadro clínico similar ao da anemia falciforme (AF), onde temos a homozigose do gene *HBB*S*. De acordo com dados do Ministério da Saúde, a prevalência estimada para a doença falciforme (DF) no Brasil é de 25.000 a 30.000 pacientes, com uma incidência anual de 3.500 novos casos. No Brasil, a distribuição do gene *HBB*S* é bastante heterogênea, sendo consideravelmente maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), com destaque para o estado de Pernambuco, em que a incidência é de 1:1.400 recém-nascidos.

As talassemias β (β tal) são um grupo de alterações moleculares causadas por redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias de globina β e precipitação de cadeias alfa(α)-globínicas, levando a uma menor produção de hemoglobina, originando desta forma anemia de graus variados, de característica microcítica e hipocrômica.

Subjacente à mutação que origina a doença, estudos revelam que existe uma heterogeneidade molecular que distingue os pacientes quanto ao seu desfecho clínico. Neste sentido, especial atenção é dada aos haplótipos do *cluster* da globina β^S por sua relação com a concentração de HbF, isto porque esta hemoglobina não interage com as moléculas de HbS, no processo de polimerização intracelular, o que

seria benéfico aos pacientes com DF e para os pacientes com β tal ela contribui com a redução da quantidade de cadeias α-globínicas precipitadas.

Devido a elevada taxa de resistência ao tratamento com a hidroxiureia (HU), a única droga utilizada para o tratamento desses pacientes, a busca por agentes indutores orais de cadeias gama têm sido extensivamente intensificadas nos últimos anos. Neste intuito, diversos trabalhos têm sido conduzidos na busca por variantes genéticas associadas com uma regulação positiva da HbF, podendo assim serem possíveis alvos farmacológicos futuros. Dentre essas variantes, o fator de transcrição *Forkhead Box O3* (*FOXO3*) foi significativamente associado a uma regulação positiva dos níveis de HbF em ensaios funcionais. Os genes *FOXO* são integrantes fundamentais na regulação de diversos processos biológicos como: regulação do ciclo celular, modulação do estresse oxidativo, regulação dos mecanismos de resposta a danos no DNA, controle da apoptose e da resposta inflamatória. *FOXO3*, um membro da família de fatores de transcrição *Forkhead*, tem sido recentemente associado como modulador de múltiplas patologias humanas incluindo câncer, diabetes e desordens eritróides. Dentre os membros da família *FOXO*, o *FOXO3* tem seu papel associado com uma regulação do processo de eritropoese, e assim, o camundongo deficiente para *FOXO3* vêm a óbito rapidamente por intenso dano oxidativo aos eritrócitos.

Notavelmente, a expressão e função de *FOXO3* aumenta progressivamente com o decorrer da maturação eritróide, sendo associado com os processos de enucleação e retirada de mitocôndrias do eritrócito maduro, promovendo uma vantagem na produção destas células. Parece ser consenso que o silenciamento do *FOXO3* está associado com redução nos níveis de HbF e um pior desfecho clínico em β-hemoglobinopatias. Desta forma, o presente projeto teve como proposta

determinar o significado funcional *in vitro* da hiperexpressão do gene *FOXO3* em linhagem celular (K562) e analisar as taxas de *FOXO3 in vivo* em pacientes portadores de β-hemoglobinopatias.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar funcionalmente (*in vitro*) o efeito da hiperexpressão do gene *FOXO3* na indução de fatores de transcrição associados a produção de HbF em células de linhagem K562 assim como em células de pacientes portadores de hemoglobinopatias.

1.1.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a expressão diferencial dos genes *FOXO3* e de ɣ-globina em pacientes portadores de hemoglobinopatias (anemia falciforme e talassemia β);
b) Analisar a expressão dos genes *HBG1/HBG2* em células K562 transfectadas com vetores pMEG vazio (controle) e pMEG *FOXO3*;
c) Analisar as taxas de estresse oxidativo nas células K562 transfectadas com os vetores pMEG vazio (controle) e pMEG *FOXO3*;
d) Avaliar a atividade farmacológica da hidroxiureia (frente a expressão de *HBG1/HBG2,* assim como de *FOXO3*) nas células K562 transfectadas com os vetores pMEG vazio (controle) e pMEG *FOXO3;*
e) Avaliar os níveis de expressão do gene *FOXO3* em células K562 transfectadas com os vetores pMEG vazio (controle) e pMEG *FOXO3.*

1.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.2.1 Casuística

A amostra foi constituída por 355 pacientes sendo 24 pacientes controle (HbA), 269 com anemia falciforme (HbSS), 28 portadores de talassemia beta (β-tal),

12 pacientes Sβ e 22 pacientes SC, não relacionadas, acompanhadas pelo Hospital de Hematologia e Hemoterapia da Fundação HEMOPE, Recife – PE.

Durante as visitas de rotina foram coletados cerca de 5ml de sangue periférico em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para laboratório do Núcleo de Hematologia Clínico Laboratorial (NHCL) do Laboratório Central (LabCen) do Centro de Biociências para realização das análises moleculares.

1.2.2 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos pela análise dos prontuários médicos dos pacientes que compareceram regularmente ao ambulatório de Hemoglobinopatias da Fundação HEMOPE. As análises dos dados hematológicos foram realizadas utilizando contador eletrônico de células (STKS, Coulter Corporation, FL, USA).

1.2.3 Extração de RNA total

O ácido ribonucleico (RNA) total das amostras de medula óssea e/ou sangue periférico dos pacientes acima descritos foi extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), o qual consiste numa solução monofásica à base de fenol e isotiocianato de guanidina, que deriva de uma modificação do método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi.

Resumidamente, as amostras foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos. Em seguida, o precipitado celular foi transferido para um tubo de polibreno estéril e livre de RNAse, ao qual foram acrescentados 35 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos, composto de 9 partes de cloreto de amônio e 1 parte de bicarbonato de amônio, seguindo-se uma incubação em gelo por 20 minutos. Após o período de incubação, o lisado celular foi novamente centrifugado a 300 x g por 20 minutos e descartado o sobrenadante, deixando para trás um precipitado (*pellet*) de leucócitos.

Este foi então ressuspendido em 1 mL de salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) [1x] e aliquotados em tubos de polibreno de 1,5 ml livres de RNAse contendo o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), numa proporção de 3 partes de Trizol para 1 parte de células, e homogeneizados com a auxílio de pipeta. A adição do reagente Trizol a suspensão celular serve para lisar os leucócitos e dissolver os componentes celulares enquanto a integridade do RNA é mantida.

A recuperação do RNA total é possível após a adição de 200 µl de clorofórmio, seguida de agitação vigorosa e centrifugação a 14,000 x g a 4°C por 15 minutos. A adição do clorofórmio separa a solução de Trizol e células em fase aquosa e fase orgânica. O RNA total permanece exclusivamente na fase aquosa. Esta foi então transferida para tubos novos de 1,5 mL livres de RNAse e submetidas a precipitação do RNA total com a adição de 800 µl de álcool isopropílico [100%]. Após centrifugação a 14,000 x g a 4°C por 10 minutos e descarte do sobrenadante, o *pellet* de RNA total foi lavado com 1 mL etanol 70% e centrifugado a 10,000 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* posto para secar a temperatura ambiente. Finalmente, este foi dissolvido em água destilada e deionizada, tratada com o inibidor de RNAse Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (SIGMA, EUA) e conservado em freezer a -80°C, até o momento do uso.

1.2.4 Quantificação do RNA total

Para mensurar a quantidade de ácidos nucléicos extraída, alíquotas de 2 µl de cada amostra foram submetidas à leitura da densidade ótica a 260 nm pelo espectrofotômetro *NanoVue* (GE Healthcare, Inglaterra). Nesse comprimento de onda, os ácidos nucléicos apresentam absorbância máxima de radiação UV, de modo que as concentrações foram estimadas por meio da relação 1U de A260 = 40 µg de RNA/mL. A razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nanômetros (A260/A280) foi considerada como um indicativo de pureza das amostras, uma vez que a leitura a

280 nm permite estimar a contaminação com proteínas. Foram utilizadas preparações apresentando razão A260/A280 entre 1,7 e 2.

1.2.5 Síntese da primeira fita do DNA complementar

Uma vez extraído e quantificado, o RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, EUA). As reações ocorreram em volumes de 25 µl, contendo um micrograma de RNA Total, 2.5 µl de 10x *RT Buffer*, 1 µl de 25x dNTP *mixture*, 2.5 µl 10x *Random Primers*, 1.25 µl de *MultiScribe RT* (50U/µl), 0.65 µl de *RNasin® Plus RNase Inhibitor* (Promega, EUA) e H2O deionizada tratada com DEPC 0,1% (SIGMA, EUA) suficiente para completar o volume final. As reações ocorreram durante 10 minutos a 25ºC, 120 minutos a 37ºC e 5 segundos a 85°C.

1.2.6 Clonagem, expansão e purificação do gene *FOXO3*

O vetor de clonagem plasmidial (pGEX) que contém o cDNA do gene *FOXO3* foi adquirido pela empresa Addgene (#1790 - Cambridge, MA, USA), já inserido em bactérias *Escherichia coli*, o que permitiu a futura extração do DNA plasmisdial com subsequente separação do gene *FOXO3* do vetor de clonagem. Para tanto, as bactérias foram inoculadas em 5mL de meio de crescimento bacteriano Luria Bertani (LB) para expansão *overnight* dos clones. Na sequência, a extração de DNA de duas dessas culturas foi realizada pelo método de lise alcalina, baseado no protocolo de Davis modificado, de minipreps *in house,* para sequenciamento da amostra obtida. Depois de confirmado o sequenciamento e confirmação do gene *FOXO3* no vetor de clonagem, foi realizado uma nova expansão em meio LB em 250mL, para realizar uma extração de DNA plasmidial em larga escala, utilizando o Kit S.N.A.P. *MidiPrep* (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Com o DNA obtido, foi realizada uma reação de digestão nos sítios de clivagem para extração do gene *FOXO3*. Esse processo de digestão foi realizado

com as enzimas de restrição BstBI e Not I, seguindo as recomendações da *New England Biolabs* (NEB). A digestão foi confirmada por uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% com TAE 1x, e a banda do gel correspondente ao gene *FOXO3* foi excisada com lâmina estéril e por fim purificada com o kit *Wizard SV Gel and PCR clean-up system* (Promega). Obtendo-se assim o gene *FOXO3* com extremidades livres para se ligar ao vetor de expressão lentiviral pCDH1-MCS1-EF1-GFP-PURO (pMEG), que passou pelo mesmo processo de expansão e de digestão. Esse último processo, de digestão, foi realizado com as mesmas enzimas (BstBI e Not I) para que as extremidades de ambos os fragmentos fossem complementares, coesivas, permitindo assim, a ligação da sequencia de DNA em um sentido único e obrigatório.

1.2.7 Sub-clonagem do gene *FOXO3* no vetor de expressão lentiviral

Após sua expansão e extração, o cDNA do gene *FOXO3* foi sub-clonado no sítio de múltipla clonagem (do inglês, *multiple cloning site*, MCS) do plasmídeo de expressão lentiviral pMEG. Esse plasmídeo garante a expressão constitutiva do gene de interesse (*FOXO3*) direcionado por regiões promotoras virais (MSCV), além de possuir a sequência codificadora para a proteína GFP e para gene de resistência da puromicina (PURO), localizadas após o promotor do gene *human elongation factor* 1α (EF1α). Uma vez que a expansão e purificação do vetor de expressão lentiviral pCDH1-MCS1-EF1-GFP-Puro-FOXO3 (denominado pMEG-*FOXO3*) foi concluída, seguindo os mesmos passos tomados para o gene *FOXO3,* a confirmação da presença do inserto foi realizada por meio de digestão com enzimas de restrição Not I e BstXI, que se encontravam inseridas dentro da sequencia do gene *FOXO3,* comprovando, de acordo com uma digestão *in sillico* realizada pelo programa ApE, um software utilizado para edição plasmidial, da Utah Biology, que o gene *FOXO3* estava, de fato, inserido dentro do vetor de expressão pMEG.

1.2.8 Cultivo e transfecção de células empacotadoras virais

Foram usada as linhagens 293T e 293FT como células empacotadoras virais. Essas células foram cultivadas em placas de cultura 100 x 20 mm, em uma concentração de $5x10^4$ célula/ml com meio de cultura DMEM 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) inativado, 4mM de L-glutamina e 10 µg/ml de penicilina e streptomicina (de agora em diante denominado “meio completo”), até atingirem uma confluência de 80%. Em seguida, essas células foram transfectadas com cada plasmídeo (pMEG ou pMEG-FOXO3) em placas distintas usando o reagente *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, EUA), de acordo com o protocolo fabricante. Juntamente com os plasmídeos de expressão lentiviral (pMEG e pMEG-FOXO3), outros dois plasmídeos (pCMVΔR8.74, contendo os elementos virais constitutivos – gag/pol, rev e tat – e pMD2G, contendo os elementos responsáveis pela formação do capsídeo viral – VSV-G) foram combinados para garantir a formação de partículas virais infectantes. Quarenta e oito horas, setenta duas horas e noventa e seis horas, após a transfecção, os sobrenadantes (meio de cultura) contendo as partículas virais foram coletados, filtrados e usados para infectar as células-alvo.

1.2.9 Cultivo de células de linhagem K562 para uso como células-alvo do sistema lentiviral e seleção de células eficientemente infectadas

Células humanas da linhagem K562 (células de linhagem celular eritroleucêmica) foram utilizadas como células-alvo do sistema lentiviral. Essas células foram escolhidas pela sua alta sensibilidade *in vitro* como alvo para ensaios funcionais e por serem um modelo adequado para ensaios de transfecção (ATCC). Essas células foram cultivadas em meio completo e mantidas em estufa 37°C com 5% de CO_2 até o momento da infecção com as partículas lentivirais. A partir de então, foi possível identificar 2 grupos distintos de células: células K562

transfectadas com o vetor pMEG vazio (controle) e células K562 transfectadas com o vetor pMEG contendo o gene *FOXO3*.

Após a infecção com as partículas lentivirais, as células-alvo foram selecionadas por separação celular (do ingles, *cell sorting*) com base na expressão da proteína GFP (do inglês, *green fluorescent protein*), utilizando o citometro de fluxo FACSAria III. Uma segunda seleção foi realizada com antibióticos (puromicina) para garantir uma pureza (ou seja, células infectadas com o lentivirus) superior a 95%. Uma vez selecionadas, células infectadas com pMEG e pMEG-*FOXO3* foram utilizadas nos ensaios de cultura celular.

1.2.10 Análise estatística

Para avaliar o impacto da expressão do gene *FOXO3* e os níveis de HbF sobre a evolução clínica dos pacientes com DF, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis, para avaliação das medianas e o pós teste de Dunn. Valores de $p < 0,005$ foram considerados significativos.

1.2.11 Ensaio *in vitro*

1.2.11.1 Análise da expressão do gene *FOXO3*

O RNA total das células será extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), pela técnica derivada pelo método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (Chomczynski e Sacchi, 1987). A síntese do DNA complementar (cDNA) será realizada com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação dos níveis de transcritos do gene *FOXO3* será realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real, com os primes desenhados, utilizando a metodologia de Syber green, seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados serão expressos pelo método do $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ relativos ao gene constitutivo *GAPDH.*

1.2.11.2 Análise da indução de Gam*a (γ)-globina*

O RNA total das células será extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), pela técnica derivada pelo método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (Chomczynski e Sacchi, 1987). A síntese do DNA complementar (cDNA) será realizada com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação dos níveis de transcritos do *HBG1/HBG2* (codificantes da γ-globina) será realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real, com os primers (HBG1 - AGACGCCATGGGTCATTTCA; HBG2 - AGACGCCATGGGTCATTTCA) e utilizando a metodologia de Syber green, seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados serão expressos pelo método do $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ relativos ao gene constitutivo *GAPDH.*

1.2.11.3 Análise das taxas de estresse oxidativo

A produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) foi medida utilizando o reagente mitoSOX Red Mitochondrial Superoxide indicador for live-cell imagina (ThermoFisher Scientific). A atividade do reagente se baseia em uma marcação mitocondrial que emite fluorescência quando é oxidado para por oxigênio. As células transfectadas (pMEG-FOXO3) e as controle negativo (pMEG) foram pré-incubadas durante 30 minutos a 37ºC com mitoSOX Red e com H_2O_2 (controle positivo). As células foram 2x lavadas com PBS e ressuspensas. Imediatamente após a ressuspensão, a fluorescência do mitoSOX foi determinada por citometria de fluxo (BD FACSCalibur) com um comprimento de onda de excitação de 510nm e um comprimento de onda de emissão de 580nm. As intensidades médias de fluorescência foram obtidas por estatística de histograma utilizando o programa Flowjow (Versão 10.0). Pelo menos 3 experimentos independentes foram realizados

com cada plasmídeo. As diferenças entre os valores médios foram analisados estatisticamente utilizando o teste de Mann-Whitney (SPSS, Versão 13.0 SPSS, Chicago, IL, EUA).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hematopoese

A hematopoese corresponde ao processo de formação de componentes celulares do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e tem seu início durante o desenvolvimento embrionário perpetuando até a vida adulta, tendo como objetivo central a manutenção do sistema sanguíneo (Jagannathan-Bogdan e Zon, 2013). Este processo ocorre desde o período intra-uterino e pode ser dividido em primitivo e definitivo. O primitivo, ocorre geralmente no saco vitelino e envolve um progenitor eritroide que dá origem a eritrócitos e macrófagos durante o desenvolvimento embrionário precoce, com o objetivo principal de produzir glóbulos vermelhos que podem facilitar a oxigenação tecidual quando o embrião sofre crescimento rápido (Palis e Yoder, 2001; Orkin e Zon, 2008). A hematopoese definitiva, que envolve as células tronco hematopoéticas (HCS), ocorre durante os períodos hepato-esplênico ou fetal, quando a hematopoese ocorre no fígado e no baço, respectivamente e no período de produção medular, onde o órgão responsável pela manutenção do tecido sanguíneo é a medula óssea, que deste momento em diante se torna o principal órgão hematopoético em vertebrados (Cumano e Godin, 2007; Paik e Zon, 2010) (Figura 1).

Para que a hematopoese primitiva ocorra de maneira adequada alguns genes estão envolvidos na regulação do processo, sendo principalmente os fatores de transcrição Gata1 e Pu.1 relacionados a decisão de comprometimento celular eritroide ou linfóide, respectivamente (Cantor e Orkin, 2002). Em contra partida, para o estabelecimento da hematopoese definitiva, se faz necessária a expressão de Runx1 (Wang *et al.*, 1996) e Cmyb, que aparentemente não são necessários no processo primitivo, porém, garantirão a formação de células eritroides, mielóides e linfóides definitivas (Paik e Zon, 2010) e auxiliarão no endereçamento do processo

para os órgãos hematopoéticos na fase hepato-esplênica, tendo assim papéis essenciais (Murayama *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2007).

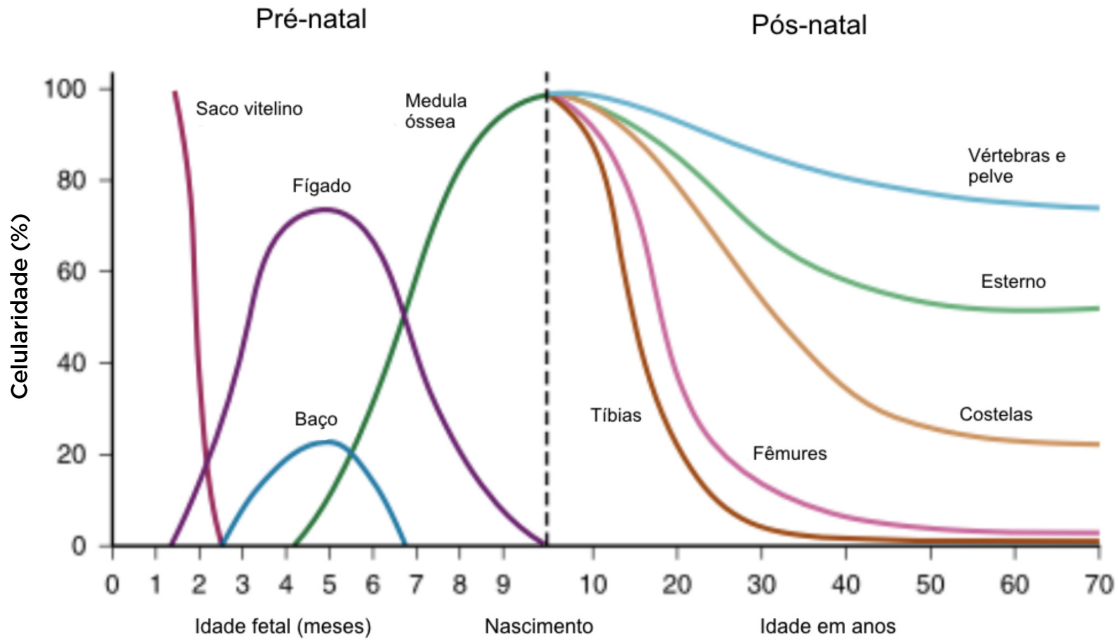


Figura 1. Processo de hematopoese primitivo e definitivo. Desenvolvimento do processo de hematopoese durante os período pré-natal e pós-natal, evidenciando a presença da hematopoese primitiva, acontecendo no saco vitelino, e definitiva durante o período conhecido como hepato-esplênico ou fetal, quando o processo ocorre no fígado e baço e por fim o aumento da produção dos componentes sanguíneos pela medula óssea.

O primeiro progenitor hematopoético formado durante a fase primitiva é o hemangioblasto, que é conhecido como BL-CFCs (do inglês, *blast colony-forming cells*) que apresenta a capacidade de se diferenciar em células endoteliais ou hematopoéticas. Com a continuidade do desenvolvimento embrionário surgem então os progenitores eritro-mielóide (EMP) e o progenitor linfóide multipotente (LMPP). Para estabelecimento da fase definitiva surgem as células pré-hematopoéticas (pré-HSCs), e finalmente as células tronco-hematopoéticas (HSCs), que podem ser detectadas em vários locais do embrião (Ditadi *et al.,* 2016). Estas HSCs recentemente formadas podem ser identificadas pela co-expressão de marcadores

hematopoéticos e vasculares como $CD34^{+}$, VE-caderina, CD117, $CD90^{+}$, $CD45^{-}$ e $CD105^{+}$, em humanos (Ivanovs *et al.,* 2014).

Para que a diferenciação das HSCs para as demais linhagens ocorrer, são requeridos fatores de transcrição específicos para cada uma das linhagens. Essas HSCs, originam as demais linhagens presentes no sangue: linfócitos, oriundos da linhagem LMPP, granulócitos e monócitos, provenientes do progenitor mielóide comum (CMP) e por fim, megacariócitos e eritrócitos que são derivados das células MEP. (Celik *et al.*, 2016; Imperato *et al.,* 2015). Os eritrócitos, também conhecidos como células vermelhas ou hemácias, são as células mais abundantes no tecido sanguíneo e apresentam um processo de maturação particular, onde quaisquer alteração pode levar a processos patológicos, adquiridos ou genéticos, como as doenças que o nosso estudo engloba.

2.2 Eritropoese

A eritropoese é o processo que corresponde a formação dos eritrócitos, a partir das células hematopoiéticas e células progenitoras (HSPCs), sendo regulada pelo hormônio eritropoetina (EPO). Este sistema é dinâmico e envolve os processos de mitose, síntese de DNA e hemoglobina, incorporação do ferro, perda de núcleo e organelas, resultando na produção dos glóbulos vermelhos. A estrutura básica do sistema eritropoético é constituída por quatro elementos: células pluripotentes (*stem cell*), células indiferenciadas comissionadas, precursores eritroides diferenciados e eritrócitos em circulação (Zago *et al.*; 2013; Nandakumar *et al*., 2016). O primeiro compartimento é comum a toda hematopoese: a medula óssea, o sangue periférico e o sangue do cordão contém pequenas quantidades de células primitivas, das quais derivam os glóbulos vermelhos do sangue.

A eritropoese nos mamíferos ocorre basicamente em três momentos distintos: Inicialmente, temos o processo ocorrendo no saco vitelino, onde, temos a produção de eritroblastos megaloblásticos nucleados, que são conhecidos como eritroblastos primitivos (EP), além de células progenitoras, comprometidas com a linhagem eritroide BFU-E (unidade formadora de “explosão” eritroide – *burst*) e macrófagos (Palis, 2014; Yoder, 2014; Potts *et al*., 2014); a segunda etapa compreende as fases caracterizadas pelo surgimentos de progenitores eritro-mieloides (EMPs) e a princípio também ocorre no saco vitelino, onde colônias eritróides, semelhantes as que são encontradas na medula óssea, são produzidas e essas parecem ter capacidade de produzir múltiplas linhagens mielóides (Gomez Perdiguero *et al.*, 2015; McGrath *et al.*, 2015). Depois de formados esses EMPs migram para o fígado fetal e produzem eritroblastos definitivos, que começam a expressar as cadeias globínicas (McGrath *et al.*, 2011). A terceira etapa do processo de eritropoese é caracterizada pelo surgimento de células estaminais hematopoiéticas (HSCs), que são direcionadas para o fígado, local onde sofrem expansão, antes de ir para o seu destino na medula óssea, onde as células se encontram quiescentes (Kiel *et al.*, 2007; Chen *et al*., 2011).

Após o nascimento, os HSCs, que residem na medula óssea, dão origem a todas as células hematopoiéticas maduras, incluindo a linhagem eritróide através de progenitores intermediários (Sanjuan-Pla *et al.*, 2013). Os progenitores que são comprometidos com a linhagem eritróide são os BFU-E, do inglês, *burst-forming unit erythroid*, e os CFU-E, que corresponde as unidades formadoras de colônias eritróides. Os BFU-Es e CFU-Es se diferenciam ainda em mais células precursores eritróides distintas, sendo o primeiro precursor eritróide morfologicamente identificável o pro-eritroblasto que seqüencialmente vai se maturando em eritroblasto

basófilo, eritroblasto policromático e ortocromático, que então sofre enucleação e forma os reticulócitos e finalmente eritrócitos. Durante o processo os precursores apresentam uma diminuição gradual de tamanho celular e nuclear e o acúmulo de hemoglobina vai ocorrendo no sentido oposto (Nandakumar *et al*., 2016) (Figura 2).

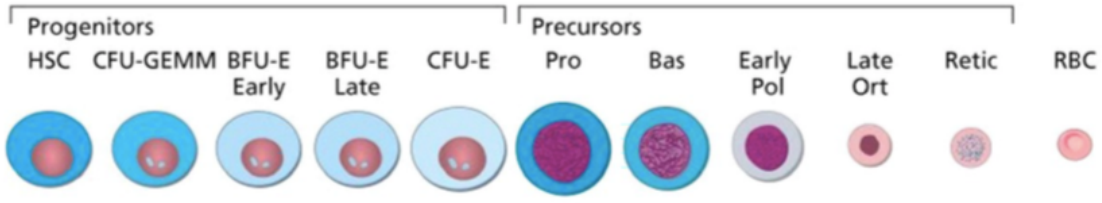


Figura 2. Sequência de maturação eritroblástica. Em ordem: HSC (células tronco hematopoéticas pluripotentes); CFU-GEMM (unidade formadora de colônias-granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos); BFU-E (unidades formadoras de explosão eritroide); CFU-E (unidade formadora de colônia eritroide). CFU-e é uma fase de desenvolvimento eritroide entre a fase de BFU-E e a fase de pro- eritroblastos. Proeritroblasto; eritroblasto basofílico; eritroblasto policromático; eritroblasto ortocromático; reticulócitos e eritrócitos. Adaptado: Victor Hoffbrand *et al.* Postgraduate Haematology 2011.

2.2.1 Eritrócitos

Os eritrócitos são as primeiras células sanguíneas que aparecem no embrião humano. Possuem forma de um disco bicôncavo com cerca de 7μm de diâmetro. Sua produção na medula óssea é regulada, principalmente, pelo nível de oxigenação dos tecidos e em adultos sua vida média é de 120 dias (Failace, 2009). Após determinado tempo na circulação, os eritrócitos começam a expressar a fosfatidilserina que é reconhecida pelos macrófagos, que então degradam os eritrócitos senescentes e reciclam a maioria dos componentes destas células. Os mecanismos que intervêm no envelhecimento fisiológico dos eritrócitos não são claramente entendidos, contudo, existe um caráter multifatorial, contribuindo, para a perda da capacidade de deformação (membrana rígida e inflexível) e de volume celular, conseguindo assim atravessar a microcirculação com facilidade, sendo reconhecidos e fagocitados pelas células do sistema histiocítico - macrofágico do

baço e da medula óssea. Este balanço entre a atividade proliferativa e a apoptose faz com que a massa de glóbulos vermelhos mantenha-se em constante renovação. Representam cerca de 99% das células que circulam na corrente sanguínea e 40% a 45% do volume total de sangue. Estes eritrócitos não apresentam núcleo nem organelas, mas estão abastecidos de hemoglobina para transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e remover o dióxido de carbono (Verrastro *et al.*; 2005).

A eritropoetina, cujo gene é localizada no cromossoma 17, é uma glicoproteína com 165 aminoácidos e peso molecular de 34kDa, que funciona como o principal regulador da maturação das células eritroides, promovendo a sobrevida, proliferação e diferenciação dos progenitores eritroides através da sua ligação ao receptor de superfície específico, o EPOR (proteína de 508 aminoácidos) (Hoffbrand *et al.*; 2013). Produzida pelo fígado na fase fetal e pelos rins (células peritubulares) na fase adulta; como não existem reservas pré-formadas, sua produção é decorrente a resposta a tensão de oxigênio nos tecidos do rim.

Torna-se fundamental para o equilíbrio adequado entre a proliferação, a morte celular programada e a maturação das células, sendo essencial na síntese e funcionamento das proteínas de membrana dos eritrócitos. Fatores de transcrição como o GATA-1 e FOG-1 são ativados para sua produção e intensificam a expressão dos genes eritróides específicos (heme e proteínas da membrana) como também na expressão do receptor de transferrina (CD71). Desta forma, se há um desequilíbrio entre a produção de eritrócitos, a eritropoetina aumenta a sua síntese para suprir esta necessidade que o organismo apresenta. A regulação do gene da EPO é o resultado direto da ativação de um fator de transcrição induzido pela hipóxia (HIF - hypoxia-inducible transcription factor), que induz a expressão e a produção da eritropoietina (Hoffbrand *et al.*; 2013).

2.3 Hemoglobinas

A hemoglobina (Hb) humana é uma proteína com peso molecular 64.500 dáltons, formada por um grupo prostético heme e por uma parte proteica, a globina, com pequenas variações entre os diferentes tipos. Constituída essencialmente por dois pares de cadeias globínicas: alfa (α) e beta (β). É a principal proteína dos eritrócitos, com estrutura globular e quaternária, composta por quatro cadeias polipeptídicas, e um grupo heme (um pigmento contendo ferro (estado ferroso) ligado a protoporfirina IX). A função principal da hemoglobina é o transporte de oxigênio (O_2) e parte do dióxido de carbono (CO_2) (Figura 3). Este agrupamento possui sítios que facilitam a ligação e/ou liberação do oxigênio para os tecidos, denominado Efeito de Bohr (Pace *et al*.; 2006; Schechter, 2012; Thom *et al*., 2013).

Combinações entre as diferentes globinas determinam os seis tipos de hemoglobinas humanas principais, produzidas nas fases do desenvolvimento, caracterizadas como embrionárias entre 3a à 8a semana de gestação (Gower I (ξ2ε2) / II (α2ε2); Portland - ζ2γ2), fase fetal constituída por duas cadeias globínicas do tipo alfa (α) e duas gama (γ^g) ou por duas alfa (α) e duas gama (γ^a), que diferem somente na posição 136 do aminoácido refletindo o produto de dois genes de gama globina não alélicos, predominante ao longo da vida fetal. As combinações das várias cadeias polipeptídicas dão origem a diferentes hemoglobinas referidas, uma vez que são produzidos durante cada etapa do desenvolvimento ontogenênico humano. As hemoglobinas do adulto normal são divididas em: Hb A (entre 92 a 95%); Hb A3 (entre 3 e 5%); Hb A2 (2 a 3%), e Hb F (entre 1 e 2%) (Kiefer *et al.*; 2008; Muncie *et al.*, 2009).

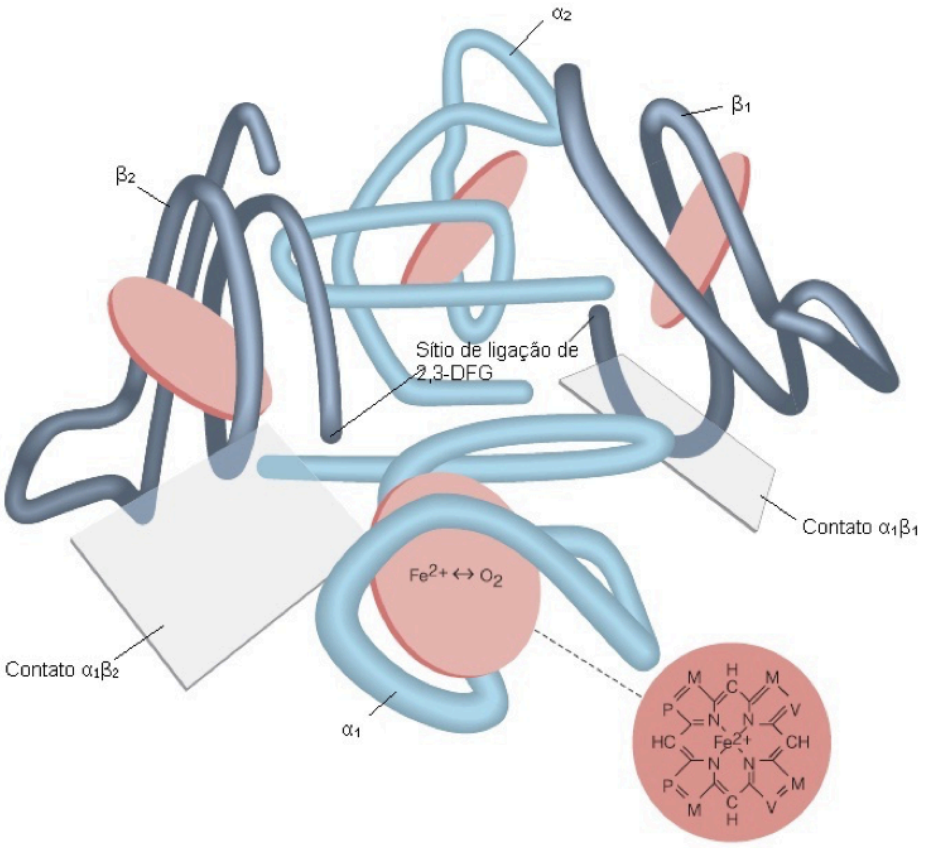


Figura 3. Estrutura da Hemoglobina A (Hb A). Formação das moléculas de Hb com as duas cadeias α (azul claro) e duas cadeias β (azul escuro), juntamente com os seus anéis porfírinicos onde encontramos as íons de ferro ligados a molécula de oxigênio.

Sua síntese é regulada por genes específicos, expressos de forma sequencial ao longo do desenvolvimento do ser humano, na ordem no sentido 5' ζ - Ψζ - Ψα2 - Ψα1 - α2 - α1 - θ- 3', localizados respectivamente no cromossoma 16 (16p13.3) subdivididos como gene zeta (HBZ) e gene alfa (os genes alfa estão em duplicata HBA1 e HBA2), responsáveis pela codificação das cadeias globínicas α, e no cromossoma 11 (11p15.5) subdivididos em gene épsilon (HBE1), gene gama (HBG), pseudogene beta (Ψβ), gene delta (HBD) e gene beta (HBB) (Zago *et al.*; 2004). Estes genes que codificam para as diferentes cadeias globínicas da HbA localizam-se em dois grandes agrupamentos gênicos (clusters): cadeia tipo α (141 resíduos de aminoácidos cada), sob o controle de uma sequência reguladora denominada HS-40; os genes que codificam para cadeias tipo β (146 resíduos de aminoácidos

cada), localizados no cromossoma 11 (11p15.5) (Figura 4) sob controle de uma sequência reguladora, o LCR (*Locus Control Region*) que transcreve, no total, os genes ε, δ, α e β (Pellegrini *et al.*, 2011, Suemasu *et al.*, 2011; Wilber *et al.*, 2011). Esta região (LCR) é o principal elemento regulatório da expressão diferenciada desse grupo de genes, sendo constituída por cinco sítios hipersensíveis à ação da DNase I (5'-HS1-HS5) dispostos ao longo de 6-22Kb, na região 5' do gene (Fu *et al*.; 2002).Cada um desses sítios contém diferentes combinações de domínios conservados, onde ocorre a ligação de proteínas que influenciam o processo da transcrição gênica (Stamatoyannopoulus, 2005).

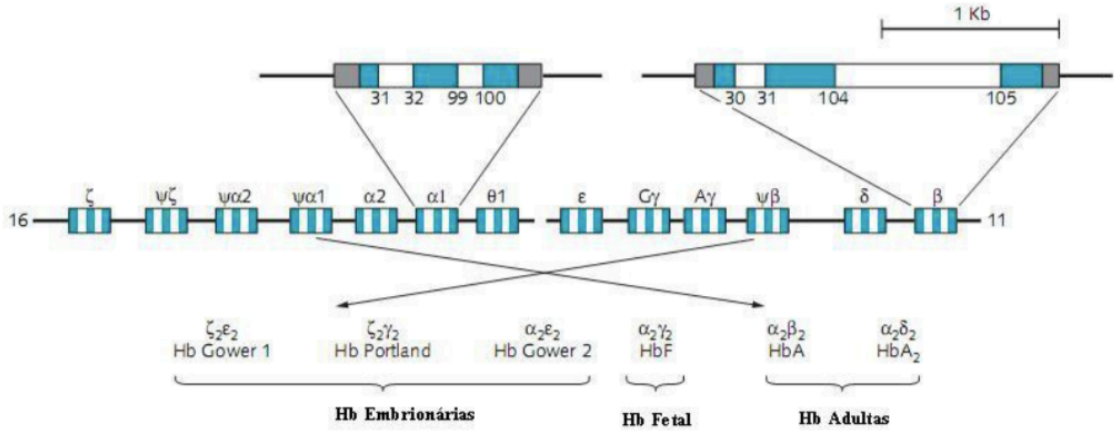


Figura 4. Controle gênico da síntese das hemoglobinas embrionárias, fetal e adulta, mostrando os mecanismos de "*Switching*" das hemoglobinas. Adaptado de WEATHERALL, 2010.

No seu conjunto, estes genes constituem o cluster β, ou seja, o agrupamento gênico β. Existem vários elementos *cis* e *trans* ativadores envolvidos na regulação da expressão do gene β-globina. Estas proteínas podem atuar como fatores de transcrição, moduladores da estrutura da cromatina e modificadores da conformação e localização nuclear do agrupamento β-globina. Como há dois cromossomos 11 com um cluster β em cada, podemos afirmar que há no total dois genes que codificam para a cadeia β. Já os genes que codificam para cadeias tipo α, por

duplicação, surgem os genes α1 e α2. Ou seja, em cada cromossoma 16 existem dois genes: α1 e α2 (Pace *et al.*; 2006).

2.4 Hemoglobina fetal e células F

As células F consistem em uma pequena parcela de eritrócitos originados de progenitores eritroides imaturos, quiescentes após a vida fetal. Sua produção ocorre por meio da expressão dos genes gama (γ). Entre os indivíduos adultos, sem alterações genéticas a presença de HbF ocorre em uma pequena proporção de células vermelhas, chamado de células F. Este último é o principal contribuinte para a variabilidade de HbF e é estimada pela medição da percentagem de células F. Na vida intra-uterina, genes de globina fetal são ativos nas células progenitoras eritropoiéticas. Antes do nascimento até o fim dos seis meses de vida, há uma alteração na hemoglobina que é produzida, quando a síntese de gama é substituída pela síntese e a incorporação de cadeias β (e cadeias δ), dando origem a produção de HbA e pequenas quantidades de HbA2. O mecanismo pelo qual essa mudança ocorre ainda é desconhecido, sendo atribuído ao estado de metilação dos genes ou a outras condições que podem afetar ou influenciar na transcrição gênica (Wilber *et al.;* 2011; Serjeant *et al.;* 2017)

O *cluster* de genes β globina no cromossomo 11 contém pseudogenes e vários outros genes de globina ativos, dispostos no sentido 5’-3’ ao longo da região cromossômica de acordo com a sua ativação entre os períodos embrionário, fetal e adulto. Quantidades residuais de HbF em adultos são distribuídas de forma desigual entre as células eritroides e, aqueles que contém quantidades suficientes à serem mensuradas são chamadas de células F como já referido. Deleções da linha germinativa raras no aglomerado de gene β-globina assim como mutações

específicas na região promotora de genes γ estão associados com a produção de HbF substancial em adultos (Orkin *et al.*; 2010).

Estudo de mutações raras mendelianas dentro do cluster β-globina elucidaram algumas hipóteses sobre a regulamentação do controle da transcrição de globina gama. No entanto, a variabilidade de HbF comporta-se como uma característica genética complexa, mais especificamente, um 'traço genético quantitativo' (QTL). Há pelo menos três QTLs identificados como importantes na produção de HbF, por influenciarem em pelo menos 20% a 50% as variações dos níveis dessa hemoglobina, sendos eles: o polimorfismo *Xmn1-HBG2* no cromossomo 11p15*,* que parece influenciar nos níveis de HbF por influenciar na atividade de fatores de transcrição; a região intergênica *HBS1L-MYB (*locus no cromossomo 6q23.3), este QTL induz um aumento nos níveis de hemoglobina fetal a partir da codificação de fatores que participam da maturação eritroide e está localizado entre os genes *HBS1L*, que é um fator de elongação que é capaz de regular vários processos celulares, e *MYB,* codificador de fatores de transcrição que participa da ontogênese e eritropoese; E o locus *BCL11A* no cromossomo 2p16, é o QTL responsável por 15% das variações de HbF e é conhecido por participar da inativação do gene da gama globina e ativar o gene responsável pela expressão das cadeias β. Sendo, então, dentre os principais, dois oncogenes, ressaltando a importância da proliferação e diferenciação celular como fatores que contribuem para um aumento de HbF (Thein *et al.;* 2013; Friedrisch *et al.;* 2016; Sokolova *et al.;* 2017).

A concentração máxima de HbF no sangue de um indivíduo com idade superior a seis meses é variável (de 1% a 2%). Cerca de 3% a 7% dos eritrócitos contêm HbF, e cada um deles tem 4 a 8 picogramas (pg) de HbF juntamente com 22

a 26 pg de HbA. O mecanismo subjacente a estes achados é incerto, não está claro se a célula F surge à partir dos mesmos clones de células tronco eritróide (geração após geração), ou se são células acidentais provenientes de células estaminais (células que podem se diferenciar em diversas linhagens celulares, tendo a capacidade de auto renovação e de se dividir indefinidamente) em cada geração eritróide. O mecanismo de modulação na produção de células F não é conhecido, mas existem hipóteses interessantes (Figura 5).

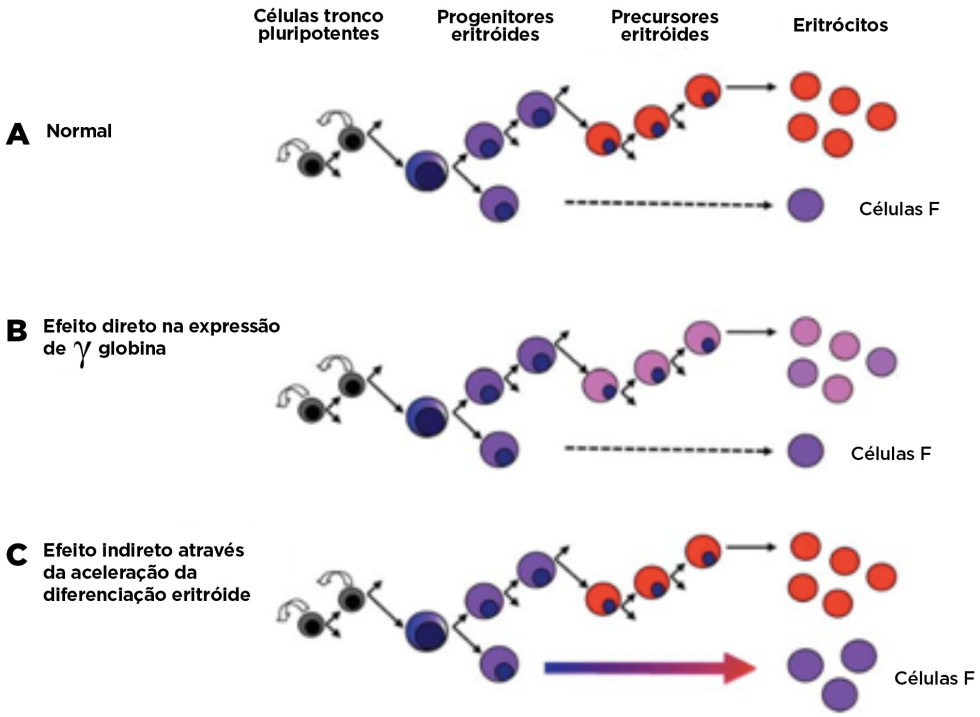


Figura 5. **Mecanismos propostos para modulação da hemoglobina fetal.** (A) As hemoglobinas fetal e do adulto são produzidas por células da mesma linhagem, ou seja, a troca da produção de hemoglobina ocorre através de uma alteração durante o processo de transcrição em uma mesma célula. Essa mudança acontece de acordo com a diferenciação eritropoética, onde uma célula que suporta predominantemente a expressão de γ globina é substituída por outra que admite apenas a expressão de β globina. Dois mecanismos plausíveis de modulação da HbF surgiram de estudos das QTLs. (B) Efeito direto sobre a expressão do gene da γ globina (BCL11A é proposto como um repressor específico do estágio de desenvolvimento); e (C) Um efeito indireto através da perturbação da cinética da eritropoese. O HMIP 2 contém um locus regulatório distal que controla a expressão do MYB, cujos níveis afetam a diferenciação da eritropoese. Uma eritropoese acelerada, como em um quadro de estresse, leva à liberação de mais células progenitoras que ainda estão sintetizando quantidades significativas de HbF. Thein SL *et al.,* 2009 - Human molecular Genetics.

Pouco se sabe de fato sobre a substituição da HbF para a HbA, apenas conceitos sobre as várias mudanças de desenvolvimento das proteínas de células vermelhas. Mutações no gene γ em regiões promotoras, têm sido associados ao seu aumento em adultos normais, indicando assim que fatores ligados ao cromossomo 11 influenciam a produção de HbF (Makani *et al.*; 2011).

2.5 Hemoglobinopatias

Desde a descoberta das hemoglobinas e as possíveis mutações presentes nos genes produtores de cadeias globínicas, um número relevante de pesquisas são desenvolvidas na área para que possamos compreender e avaliar de maneira mais minuciosa os mecanismos moleculares e celulares subjacentes a essa estrutura, e como eles podem culminar com o surgimento de patologias de alto impacto mundial, como as hemoglobinopatias, sendo as mais relevantes, a anemia falciforme e as talassemias, pelo elevado número de indivíduos acometidos em várias partes do mundo, principalmente as populações originárias do continente africano, da região mediterrânea, do sudeste asiático, do oriente médio e extremo oriente (Piel *et al*., 2010, Fernandes 2017). Cerca de 3% da população mundial é composta de heterozigotos para a talassemia β e 1-2% são heterozigotos para Hb S, hemoglobina presente em pacientes portadores da anemia falciforme (Theodorsson *et al.,* 2007).

As hemoglobinopatias são anemias hemolíticas de cunho hereditário, que geneticamente representam um grupo de alterações autossômicas, em sua grande parte, recessivas (Tolentino *et al.*, 2007; Dhaliwal *et al.*, 2004). Estão entre as doenças monogênicas mais comumente encontradas nas populações, com mais de 1.500 diferentes alelos mutantes caracterizados em nível molecular (*Globin gene server,* 2017). Dentre essas patologias as mais frequentemente associadas com um curso clínico adverso estão relacionadas a defeitos nas cadeias globínicas β da molécula de hemoglobina. Com base nisso, para que ocorram modificações na

produção das hemoglobinas dois defeitos principais podem ocorrer: os estruturais, onde existe a produção de hemoglobinas alteradas, conhecidas como hemoglobinas variantes, devido a mutações, como na anemia falciforme, e os de ritmo de síntese, onde ocorre um desequilíbrio na síntese das cadeias globínicas, como nas talassemias, onde os pacientes podem apresentar uma diminuição na produção, sendo ela parcial ou uma total da cadeia β (Madigan *et al.,* 2006, Urbinati *et al.,* 2006; Sonati & Costa *et al.,* 2008).

2.5.1. Anemia Falciforme

2.5.1.1 Etiologia e epidemiologia

A anemia falciforme (AF) é a patologia mais frequente dentre as hemoglobinopatias que apresentam defeitos estruturais. É uma doença autossômica recessiva de prevalência mundial, decorrente de uma mutação pontual nas bases que codificam o sexto aminoácido da cadeia β da hemoglobina, no gene da β-globina (*HBB*), localizado no cromossomo 11p15.15 (Steinberg *et al*., 1995; Frenette & Atweh, 2007). A alteração molecular da AF consiste na substituição de um único nucleotídeo de G<u>A</u>G para G<u>T</u>G, no sexto códon do gene *HBB,* que faz com que o aminoácido ácido glutâmico seja trocado por uma valina na cadeia em crescimento (*HBB*; β^S G<u>A</u>G→G<u>T</u>G; glu6val), resultando na formação de uma hemoglobina estruturalmente anormal, a hemoglobina S (HbS), que apresenta diferentes propriedades da molécula de hemoglobina selvagem, HbA (Sonati & Costa, 2008; Fernandes, 2017). A AF é conhecida pela gravidade e frequência, particularmente entre os povos africanos ou afrodescendentes (Lettre, 2012), além de ter sido a primeira doença onde as bases moleculares foram elucidadas (Frenette *et al*., 2007).

A prevalência da AF é alta em regiões da África, do Oriente Médio, do Mediterrâneo e da Índia devido à notável proteção que a heterozigose para a HbS (Hb AS) proporciona contra a malária (Piel *et al*., 2010; Elguero *et al*., 2015). Além

disso, o comércio de escravos e os movimentos migratórios populacionais favoreceram a distribuição da doença falciforme muito além das suas regiões de origem (Piel, Steinberg, Rees, 2017). Estimativas apontam que, por ano, aproximadamente 300.000 indivíduos nasçam com AF no mundo (Figura 6) e este número pode chegar a 400.000 nascimentos no ano de 2.050 (Piel *et al*., 2013).

No Brasil, a AF é mais prevalente em indivíduos afrodescendentes (Soares *et al*., 2014). Segundo dados estimativos do Ministério da Saúde 2013, aproximadamente 1.000 recém-nascidos nascem com doença falciforme no Brasil por ano. No estado de Pernambuco, um em cada 23 recém-nascidos vivos possui o traço falciforme e um em cada 7.000 nasce com a doença falciforme (Brasil, 2013).

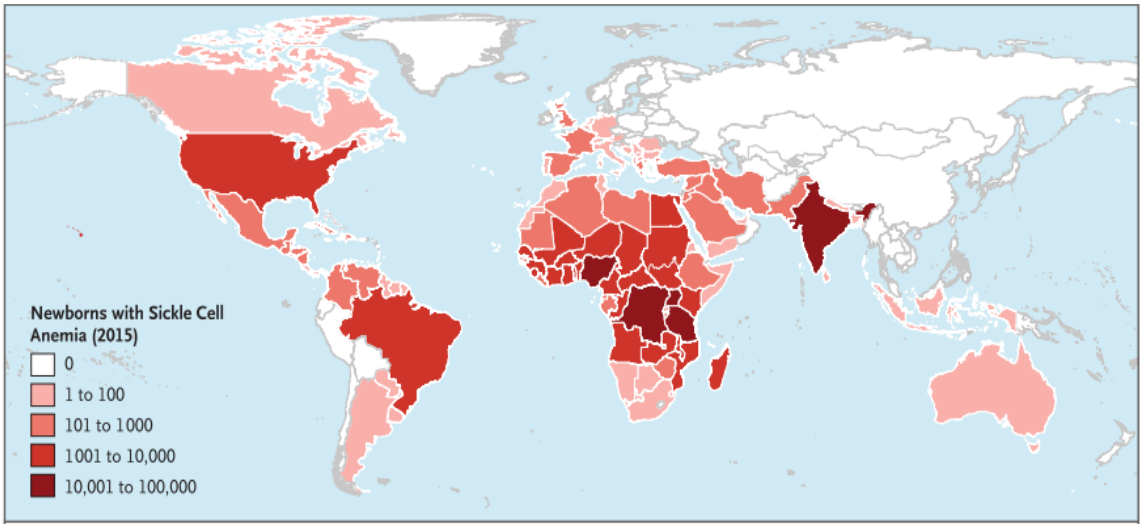


Figura 6. Número de recém-nascidos com anemia falciforme em cada país no ano de 2015. Fonte: Modificado de Piel, Steinberg, & Rees, 2017.

2.5.1.2 Fisiopatologia

É importante, antes de mais nada, distinguir a AF de doença falciforme (DF) e de traço falciforme (TF). A anemia falciforme é caracterizada, entre outros fatores, pela homozigose do gene βS, sendo a forma mais comum e mais grave das doenças falciformes. A DF, que varia em incidência e gravidade, é caracterizada pela

presença de pelo menos um gene βS herdado de um dos pais juntamente com a herança de uma outra hemoglobina anormal (C, D, E, O, β^0, β^+ ou a própria S) herdada do outro cônjuge. E por fim, o TF, conhecido como HbAS, é correspondente a um paciente normalmente assintomático, pois herdou um gene βS mutado, entretanto, o segundo gene produz a hemoglobina normal do adulto, HbA (Centers for disease and prevention. Sickle Cell Disease, 2016; Key *et al*., 2015).

Então, as moléculas de HbS formadas devido a mutação no gene *HBB* em condições de desoxigenação e de mudança de pH, tendem a se agrupar em longas cadeias rígidas que distorcem a forma bicôncava dos eritrócitos, fazendo com que as mesmas assumam uma forma de foice, gerando uma hemácia falcizada que é característica da doença, e é a chave de toda a fisiopatologia (Steinberg, 2016). A hemoglobina falcizada é menos solúvel que a HbA ou que a HbF, e pode causar complicações sistêmicas, como disfunção orgânica e infecção devido a inadequada perfusão e oxigenação dos tecidos (Vacca & Blank, 2017).

Essas hemácias falcizadas se tornam mais rígidas, perdendo a capacidade de se deformar para se adequar aos vasos sangüíneos e assim passar com facilidade por estes (Saraf *et al*., 2014; Adams, 2014; Conran, 2015). A viscosidade do sangue desses pacientes se mostra aumenta devido a algumas interações anormais dos glóbulos vermelhos com outros componentes sangüíneos, como por exemplo, com leucócitos, plaquetas, e o próprio endotélio vascular e por interação com fatores intrínsecos como os fatores de coagulação. Como consequência dessa falta de maleabilidade dos glóbulos junto com o aumento da viscosidade sangüínea, e como consequência destes e de outros fatores, esses eritrócitos se tornam mais aderentes ao endotélio vascular, podendo causar obstrução dos vasos sangüíneos (Yawn *et al*., 2014)(Figura 7).

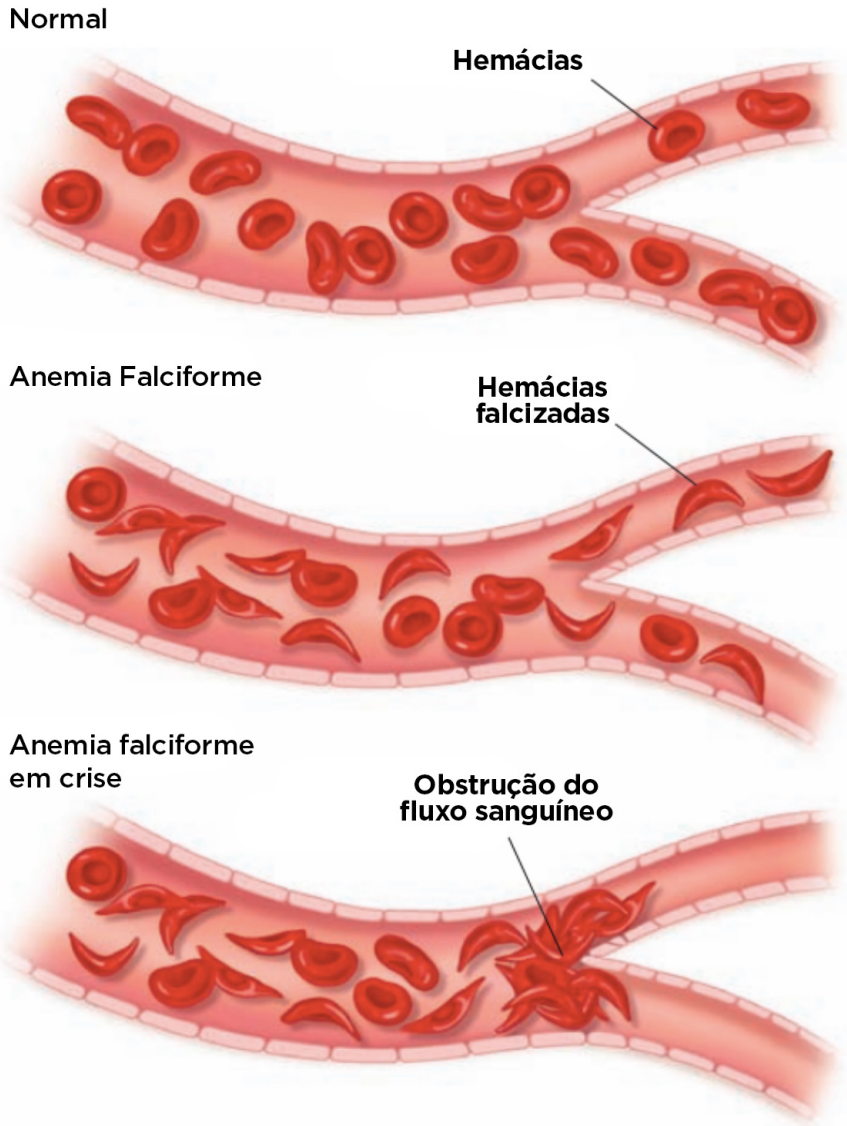


Figura 7. Processo de vaso oclusão presente nos pacientes portadores de anemia falciforme, evidenciado o acúmulo dos glóbulos vermelhos falcizados no lúmen dos vasos sanguíneos que gera como consequência quadros dolorosos, perfusão inadequada dos tecidos e infartos. Fonte: Creasson C. Stedman's Medical Terminology. 2nd ed. Baltimore.

O processo de falcização ocorre de maneira constante, entretanto, sempre que o eritrócito for exposto a concentrações adequadas de oxigênio antes que a membrana eritrocitária se torne muito rígida, a falcização consegue ser revertida, porém, caso isto não ocorra as hemácias já em forma de foice se acumulam no lúmen vascular e levam a diminuição da perfusão tecidual e consequentemente a

complicações clínicas comuns a maioria dos pacientes portadores de AF, como crises de dor, acidente vascular cerebral, hipertensão, esplenomegalia, retinopatias, priapismo, isquemia de órgãos, infarto, entre outros (Blinder *et al*., 2014).

Os eritrócitos falcizados são mais frágeis que as hemácias normais e por este motivo são destruídos com maior facilidade, seja por força mecânica ou por mecanismo fisiológico, como o sequestro esplênico. Os glóbulos vermelhos normais sobrevivem na circulação em torno de 90 a 120 dias, enquanto os falcizados apenas de 10 a 20 dias. Como consequência deste destruição precoce, que não permite que a medula óssea consiga repor os glóbulos perdidos, os portadores da anemia falciforme cursam com uma anemia hemolítica que compromete bastante a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos, sendo assim as principais manifestações a própria anemia hemolítica que apresenta cunho crônico e crise vaso oclusiva (Vichinsky, 2016).

2.5.2 Talassemia β

As talassemias β (β tal) são um grupo de alterações moleculares causadas por redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias de globina β, levando a uma menor produção de hemoglobina, decorrente de mutações no gene da β globina, originando desta forma anemia de graus variados, caracteristicamente microcítica e hipocrômica (Weatherall e Clegg, 1981). Devido ao amplo espectro mutacional que acomete os pacientes com β tal, estes indivíduos podem cursar desde formas com uma anemia leve e assintomática à quadros que exigem regime transfusional mensal (Thein, 1998).

A gravidade do quadro clínico dos portadores de talassemias β depende, em certo grau, da mutação que levou a alteração na produção das cadeias beta, pois quanto menos cadeias β produzidas, maior a quantidade de cadeias α livre, que

podem precipitar e causar destruição de eritroblastos e hemácias. Sendo assim, em geral, a classificação desses indivíduos é feita em grupos de acordo com a quantidade de cadeias finais em: β^0 (ausência de expressão), onde não ocorre formação da cadeia e β^+ (redução de expressão) onde a expressão é reduzida em diferentes graus dependendo do tipo de mutação (Dhaliwal *et al.*, 2004; Urbinati *et al.*, 2006).

Diante da grande diversidade de perfis clínicos apresentados os pacientes são classificados clinicamente em menor, maior e intermediário, sendo os pacientes portadores da talassemia maior os que apresentam menor nível de hemoglobina (Hb ≤ 7,0) e maior gravidade clínica. Esta é uma classificação clínica que depende do nível de hemoglobina e pode apresentar alteração molecular $\beta^0\beta^0$, $\beta^0\beta^+$ ou $\beta^+\beta^+$. Do ponto de vista clínico é caracterizada por uma anemia grave dependente de transfusão, podendo levar, caso a terapia não seja efetiva, ao acúmulo de ferro em tecidos vitais, além de apresentarem todos os sintomas mais severos da anemia, como caquexia, fadiga, insuficiência cardíaca congestiva, e todos os efeitos do aumento da produção de glóbulos vermelhos por outros órgãos que não a medula, gerando anormalidades ósseas, esplenomegalia, compressão da medula espinhal e retardo do crescimento. O processo de hemólise com acúmulo de cadeias alfa precipitadas nas hemácias pode resultar em litíase, úlceras de perna e hipertensão pulmonar (Zago *et al.*, 2004; Birgens *et al.*, 2007). Subjacente à mutação pontual que origina a doença, acredita-se que exista uma heterogeneidade molecular que distingue os pacientes quanto ao seu desfecho clínico. Neste sentido, especial atenção é dada a capacidade de produção de HbF em cada paciente, onde esta hemoglobina contribui para a redução da quantidade de cadeias α-globínicas precipitadas levando a um quadro clínico mais brando (Higgs, 2013). Nos casos de

alterações moleculares $\beta^0\beta^0$ somente existe produção de HbF nos eritroblastos e pouca porcentagem de HbA_2. Na maior parte dos casos a produção total de HbF não é suficiente para a produção de hemoglobina total compatível com a vida, e temos anemia grave. Ocasionalmente alguns pacientes são capazes de produzir maior quantidade de hemoglobina e podemos ter um quadro de talassemia intermediária. Existe a hipótese que apesar de todos os eritroblastos produzirem apenas HbF, alguns apresentem maior produção ("*high* HbF") e outros baixa produção ("Low HbF"). Os eritroblastos "High HbF" seriam mais resistentes a eritropoese ineficaz observada nessa doença. Provavelmente quando há predominância de células com características de "High HbF" haverá maior produção de hemoglobina e maiores níveis de hemoglobina fetal e melhor evolução clínica (Arlet *et al.,* 2016) (Figura 8).

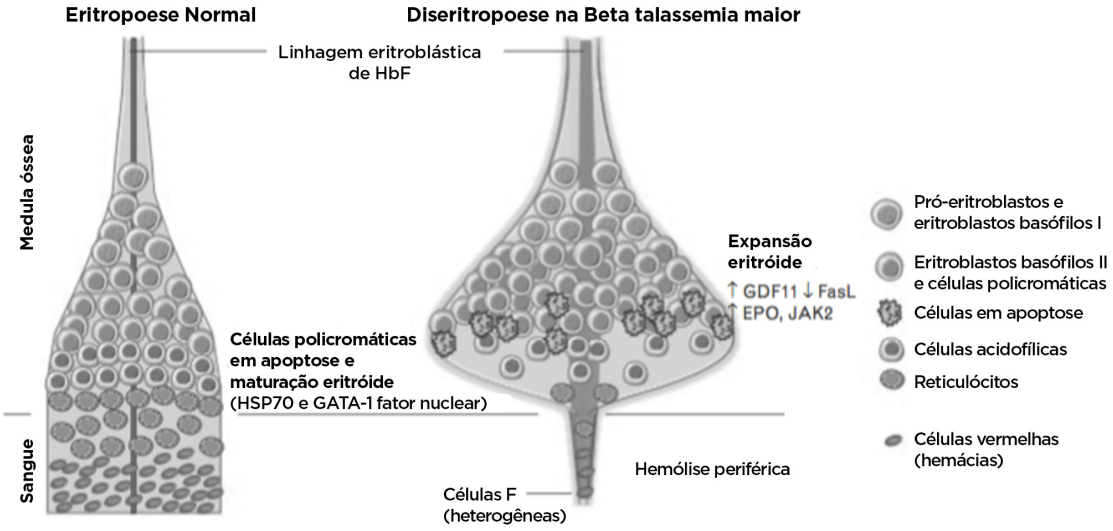


Figura 8. Esquema representando a eritropoese em pacientes portadores de β talassemia: Passos e componentes moleculares. HbF, Hemoglobina F; GCF11, fator de diferenciação de crescimento 11; EPO, eritropoetina; FasL, Fas-ligand; JAK-2, Janus-kinase-2; HSP70, heat shock protein 70; GATA-1, GATA binding protein 1. Fonte: Arlet *et al*, 2016 - Current opinion in hematology.

2.6 Hidroxiureia

Um passo importante em direção a elucidação de novas terapias foi dado quando grupos de pesquisa revelaram que pacientes com anemia falciforme que cursam com persistência hereditária de HbF ou elevação dos níveis de HbF, tendem a ter um quadro clínico mais brando, demonstrando o potencial que o aumento dos níveis de HbF tem no melhoramento da qualidade de vida das pessoas portadoras de DF (Watson*,* 1948). Neste contexto, estudos com cultura de células eritróides maduras *in vitro* revelaram que durante o seu desenvolvimento essas células obtinham a capacidade de expressão das globinas fetais, α e β (Stamatoyannopoulos *et al.,* 2001; Stamatoyannopoulos, 2005, Ware, 2010).

O estudo revelou que para suprimir a transcrição da hemoglobina fetal, ocorre a metilação em ilhas CpGs nas regiões promotoras dos genes responsáveis por produzir a HbF, isto, levou ao início de estudos com a 5-azacitidina, um agente desmetilante (Goren *et al.,* 2006). Contudo, mostrou-se que o aumento da hemoglobina fetal neste estudo se deu pelo efeito citoestático causado pela droga na diferenciação celular, abrindo espaço para o teste de outros fármacos, como a hidroxiuréia (HU). A HU, se mostrou uma opção mais segura, por ser menos tóxica, e se tornou alvo das pesquisas realizadas na época, até que no ano de 1988 o *FDA* aprovou o uso da droga para o tratamento, em adultos, destas enfermidades (Fernandes, 2017). A eficácia e a segurança de uso da HU também foi demonstrada em lactentes e crianças pequenas, demonstrado pelo estudo *BABY HUG* (*Pediatric Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia,* BABY HUG *trial*), um estudo multicêntrico randomizado de fase III, realizado com 213 lactentes com idade entre 9 e 18 meses (Wang *et al.*, 2011). O uso da droga para o tratamento de crianças foi aprovado em

2002 pelo instituto NHLBI, do inglês, *National Heart, Lung, and Blood Institute* (Strouse *et al.,* 2012).

A HU, ou hidroxicarbamida a única droga aprovada para o tratamento das DF no Brasil há 15 anos, é uma droga citostática, citotóxica e antineoplásica, tem uma ação anti-metabólica e é uma inibidora da síntese de DNA (Elford, 1968; Brasil, 2002). A HU é administrada em dose inicial (15mg/Kg/dia) até a dose máxima tolerada (25mg/Kg/dia) de acordo com a resposta de paciente ao medicamento e seguindo os critérios de conduta por toxicidade propostos pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2013).

A HU aumenta os níveis de hemoglobina fetal por inibição da ribonucleotídeo redutase que causa a supressão dos precursores eritróides com ciclagem rápida e favorece os mais quiescestes como a HbF, assim, diminuindo também a leucocitose e a reticulocitose desses pacientes, melhorando as crises vaso-oclusivas, consequentemente, efetiva na redução das crises dolorosas, na síndrome torácica aguda e gera uma diminuição de necessidades transfusionais, reduzindo a mortalidade em cerca de 40% (Garner *et al*, 2000; Steinberg *et al.,* 2007; Davies *et al.,* 2003; Wyszynski *et al.,* 2004). Juntamente a essa função a hidroxiuréia produz óxido nítrico, que se encontra reduzido nos portadores da doença e que é de extrema valia pela sua capacidade de estimular a guanilato ciclase, um estimulador positivo de células HbF. Por ser uma droga mielossupressora, que diminui o número de leucócitos, atribuí-se como outro efeito benéfico a atenuação do quadro inflamatório (Davies *et al.,* 2003; Adams, 2001; Benkerrou *et al.*, 2002; Ware, 2010).

No tratamento da talassemia β, alguns casos podem ser responsivos à HU, porém o seu uso não é extensivo (Zago *et al.,* 2004; Urbinati *et al.,* 2006). Para estes pacientes o mais indicado é o uso de fármacos que atuem no metabolismo do ferro,

como a hepcidina ou outros compostos que atuem na absorção controlada deste metal (Rivera *et al.,* 2005).

De modo geral, a HU reduz a frequência de crises vaso-oclusivas, a necessidade transfusional e as hospitalizações dos pacientes, além de diminuir a taxa de mortalidade em aproximadamente 40%, quando utilizada por pelo menos um ano (Lanzkron *et al.*, 2008; Strouse *et al*., 2008; Steinberg *et al*., 2010). Apesar de conter alguns efeitos adversos temporários, como leucopenia e plaquetopenia, que poderiam predispor os pacientes a infecções e sangramentos, o risco do uso da HU em pacientes falciformes é aceitável quando comparado com o risco de pacientes falciformes não tratados (Brawley *et al.*, 2008).

Entretanto, uma das principais desvantagens subjacente ao uso da HU é a sua toxicidade (Ware, 2010) e a elevada taxa de resistência ao tratamento, motivos pelo qual diversos estudos a cerca dos efeitos adversos do uso da droga a longo prazo foram realizados (Steinberg *et al*., 2003; Segal *et al.,* 2008).

O único tratamento potencialmente curativo atualmente disponível para a AF é o transplante de medula óssea, entretanto, a taxa de mortalidade em pacientes acima de 16 anos de idade e a dificuldade de encontrar doares compatíveis para a cirurgia limitam o potencial efeito do transplante de medula óssea (Hsieh *et al*., 2011; Bolaños-Meade *et al*., 2012; Fernandes, 2017). Uma abordagem alternativa que vem sendo motivadora para o tratamento das hemoglobinopatias é o transplante envolvendo células tronco do sangue do cordão umbilical, que já rendeu bons resultados em estudos prévios. (Locatelli *et al.,* 2013; Burgio *et al*., 2012; Ruggeri *et al*., 2011).

Estes fatores fazem com que a busca por agentes indutores orais de HbF tenha sido extensivamente intensificada nos últimos anos. Neste intuito, trabalhos

têm sido conduzidos na busca por variantes genéticas associadas com uma regulação positiva da HbF, podendo assim serem possíveis alvos farmacológicos futuros (Platt, 2008).

2.7 FOXO3

As proteínas *FOX* (*Forkhead box*) são uma família de fatores de transcrição que desempenham papéis importantes na regulação da expressão de genes envolvidos no crescimento celular, proliferação, diferenciação e longevidade. Muitas proteínas *FOX* são importantes para o desenvolvimento embrionário e têm atividade de transcrição imprescindível ao poder se ligar a cromatina condensada durante os processos de diferenciação celular. A característica definidora das proteínas *FOX* é a caixa *forkhead*, uma seqüência de 80 a 100 aminoácidos formando um motivo que se liga ao DNA. Os genes Forkhead são um subgrupo da classe de proteínas helix-turn-helix (Lehmann *et al.,* 2003; Tuteja & Kaestner, 2007; Zaret & Carroll, 2011).

O fator de transcrição *Forkhead Box O3* (*FOXO3*), localizado no cromossomo 6, na região 6q21 (GeneLoc, 2017), é um membro da família de fatores de transcrição *Forkhead box O, c*omposta pelos genes *FOXO1, FOXO3, FOXO4* e *FOXO6* (Figura 9). Os genes *FOXO* são integrantes fundamentais na regulação de diversos processos biológicos como: regulação do ciclo celular, modulação do estresse oxidativo, regulação dos mecanismos de resposta a danos no DNA, controle da apoptose e da resposta inflamatória (Eijkelenboom & Burgering 2013).

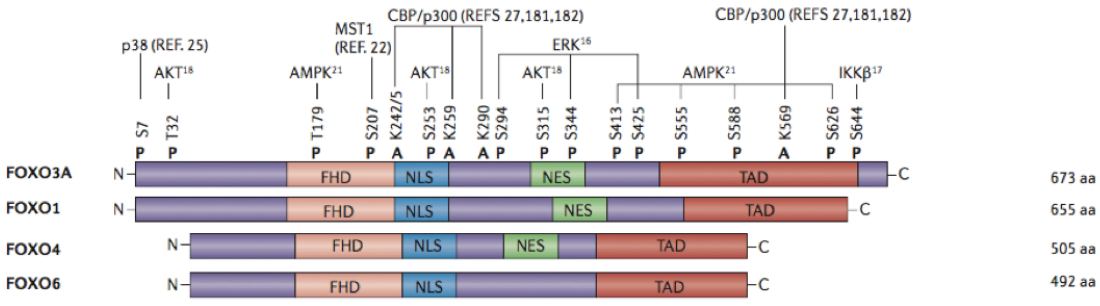


Figura 9. Organização estrutural dos genes da família *FOX.* Diagrama esquemático mostrando os diferentes domínios que caracterizam as proteínas forkhead box (FOX). Todos os fatores de transcrição da família FOX tem um domínio *forkhead* de ligação ao DNA altamente conservado que se liga a sequencias especificas nos genes alvos. Essas domínios podem ser localizados na região amino-terminal ou carboxi-terminal. As modificações pós-tradicionais para o membro melhor caracterizado da família, as quinases e acetilases são mostradas. A - local de acetilação; aa - aminoácidos; AMPK - proteína quinase ativada por AMP; IKKβ - inibidor do fator nuclear - kβ quinase-β; MST1 - quinase semelhante a Ste20 de mamíferos; NES - sequencia de exportação nuclear; NLS - sequencia de localização nuclear; P - local de fosforilação; TAD - domínio de transativação. Fonte: Modificado de: Lam, 2013.

A função das proteínas *FOXO* é amplamente regulada por modificações pós-traducionais, cujo principal exemplo é a fosforilação serina/treonina a jusante da via de sinalização PI3K/AKT. Os fatores *FOXO* fosforilados são exportados do núcleo para o citoplasma e são direcionados para a degradação proteossômica. Esta regulação das proteínas *FOXO* é interrompida em vários tipos de tumores, incluindo câncer de mama, câncer de próstata, glioblastoma e leucemia mielóide crônica (Bakker *et al.,* 2007; Calnan *et al.,* 2008; Miyamoto *et al.,* 2008).

Uma das principais funções das proteínas *FOXO3* é modular a homeostase ROS por ativação transcricional de enzimas desintoxicantes de ROS, como catalase e SOD. A manutenção de níveis apropriados de ROS intracelular é vital para redes de sinalização, que medeiam múltiplos processos fisiológicos, pois a perturbação dos níveis de ROS podem induzir a proliferação, amplificam a sinalização de sobrevivência e limitam a citotoxicidade antitumoral de vários agentes terapêuticos, contribuindo assim para a manutenção e progressão do fenótipo do câncer. Sendo o aumento de ROS também uma das principais causas de danos no DNA, o que leva a anormalidades cromossômicas e instabilidade do genoma. A regulação da homeostase de ROS por *FOXO* pode, portanto, ter um papel significativo na limitação do desenvolvimento e progressão do câncer (Naughton *et al.,* 2009; Rakshit *et al.,* 2009; Sedelnikova *et al.,* 2010; Lazarte *et al.,* 2017).

Dentre os membros da família *FOXO*, *FOXO3* tem seu papel associado com uma regulação do processo de eritropoese, e assim, o camundongo deficiente para *FOXO3* vêm a óbito rapidamente por intenso dano oxidativo aos eritrócitos (Walbert J. Bakker *et al.,* 2007; Hai Wang *et al.,* 2015; Raymond Liang *et al.,* 2015; Dragan Marinkovic *et al.,* 2016).

O *FOXO3* tem sido recentemente associado como modulador de múltiplas patologias humanas incluindo câncer, diabetes e desordens eritróides (Eijkelenboom & Burgering, 2013; Liang & Ghaffari, 2016; Blank & Karlsoon, 2015), e foi significativamente associado a uma regulação positiva dos níveis de HbF em ensaios funcionais (Marinkovic *et al.,* 2007). Numerosas variações, que prejudicam a atividade de *FOXO3,* geram como consequência a diminuição dos níveis de hemoglobina fetal, o que torna esse gene um alvo para estudo de elevação ou diminuição das taxas de HbF (Sheehan *et al.,* 2014).

Estudos que simularam o silenciamento do gene *FOXO3* em células de linhagem eritropoéticas ($CD34^{+}$) humanas, revelaram que os níveis de mRNA γ-globina (*HBG1* e *HBG2*) diminuíram em cerca de 80% quando comparados ao grupo controle que não sofreu o *knockdown.* Um segundo silenciamento, não sobreposto ao primeiro, foi feito e a linhagem celular reduziu sua expressão do mRNA correspondente em 50% e a produção de γ-globina em 31%. Além da alteração nas concentrações de mRNA e de γ-globina reduzidas, o experimento evidenciou um atraso na diferenciação dessas células (Yankai Zhang *et al.*, 2016).

Notavelmente, a expressão e função de *FOXO3* aumenta progressivamente com o decorrer da maturação eritróide, sendo associado com os processos de enucleação e retirada de mitocôndrias do eritrócito maduro, promovendo uma vantagem na produção destas células (Franco *et al.* 2014; Marinkovic *et al.* 2007).

Parece ser consenso que o silenciamento do *FOXO3* está associado com redução nos níveis de HbF e um pior desfecho clínico em β-hemoglobinopatias. Desta forma, o presente projeto tem como proposta determinar o significado funcional (*in vitro*) da hiperexpressão do gene *FOXO3* em linhagem celular (K562).

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1 Análise da expressão do gene *FOXO3* e dos níveis intracelulares de HbF, em pacientes portadores de hemoglobinopatias.

A Figura 10 mostra a quantificação relativa da expressão gênica de *FOXO3* em reticulócitos de indivíduos saudáveis (24 indivíduos), pacientes portadores de anemia falciforme (269 pacientes), talassemia β (28 pacientes), Sβ (12 pacientes) e SC (22 pacientes). A expressão do gene *FOXO3* foi significativamente aumentada no grupo de pacientes portadores de doença falciforme (anemia falciforme, Sβ e SC) versos grupos controle e de talassemia β ($P < 0,001$).

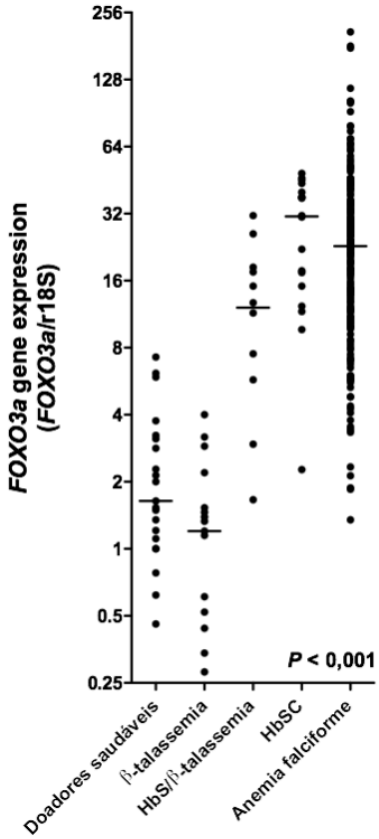


Figura 10. Expressão gênica diferencial do *FOXO3* em reticulócitos de pacientes portadores de hemoglobinopatias. A expressão do gene *FOXO3* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real. As barras horizontais representam o valor médio da expressão do *FOXO3* em relação ao controle saudável. A expressão de *FOXO3* foi maior em amostras de pacientes com doença falciforme, conforme determinado pelo teste de Kruskal-wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

Na sequencia, nós avaliamos se a expressão do gene *FOXO3* estava associada com o número de complicações clínicas apresentadas pelos pacientes

com AF. A Figura 11 mostra níveis aumentados de *FOXO3* em pacientes com anemia falciforme que apresentaram 2 ou mais complicações no ultimo ano. Embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa, naqueles paciente que apresentaram níveis aumentados de *FOXO3* observamos uma tendência (P = 0,062) a presença de mais complicações clínicas frente aqueles que têm níveis mais baixos de expressão do gene.

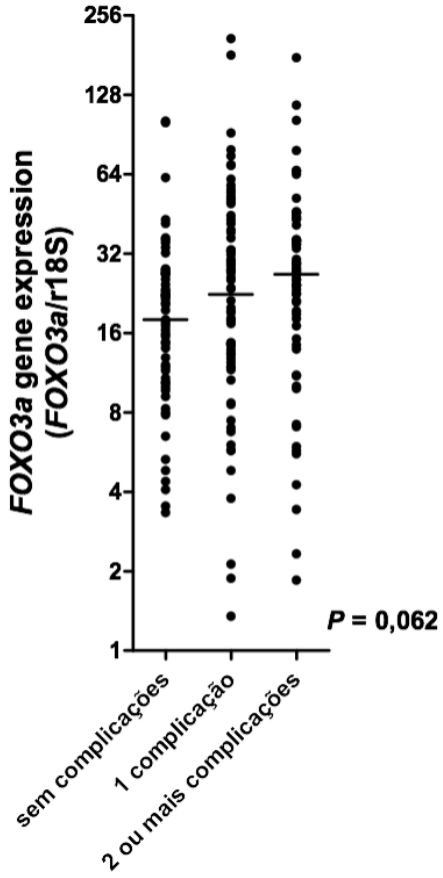


Figura 11. Correlação entre os níveis de expressão do gene *FOXO3* e complicações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. As barras mostram que os indivíduos AF que têm um aumento dos níveis de expressão de *FOXO3* apresentam certa tendência a desenvolver mais complicações clínicas, conforme determinado pelo teste de Kruskal-Wallis seguindo pelo pós-teste de Dunn.

Diante deste resultado, nós decidimos avaliar mais afundo as manifestações clínicas e estratificamos as complicações em: úlcera de perna, priapismo, acidente vascular cerebral, dactilite e outras complicações, além do grupo sem complicações,

e associamos com os níveis de expressão de *FOXO3*. Ao aplicarmos os devidos testes estatísticos, evidenciamos que aqueles pacientes que apresentam menores níveis de expressão do gene *FOXO3* têm maior risco de desenvolver úlcera de perna em relação as demais complicações estudadas (P = 0,003) (Figura 12).

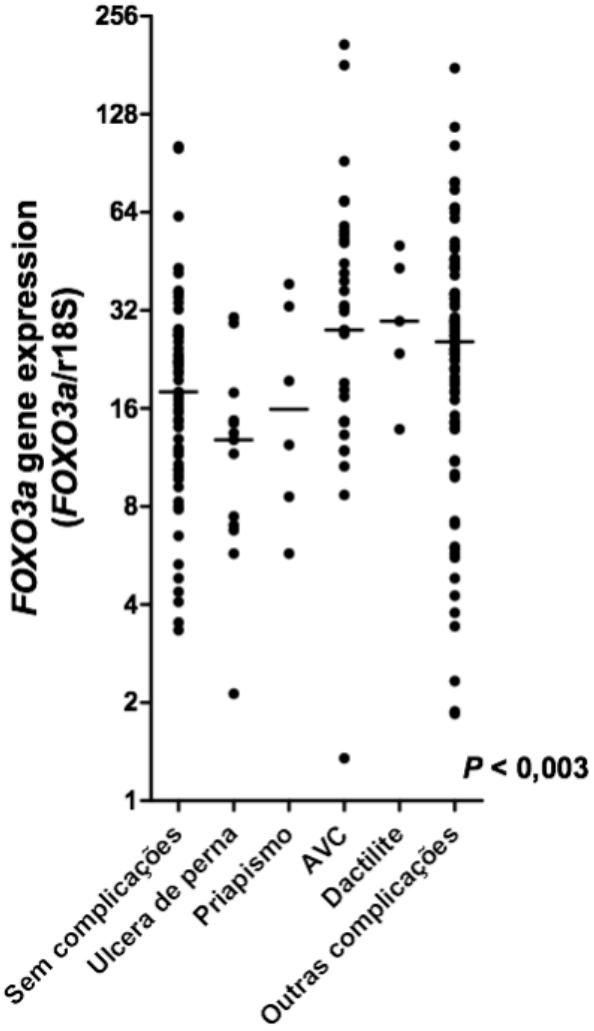


Figura 12. Correlação entre os níveis de expressão de *FOXO3* e grupos de complicações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. As barras mostram que os indivíduos AF que têm um diminuição dos níveis de expressão de *FOXO3* apresentam mais facilidade para desenvolver úlcera de perna do que as demais complicações clínicas, conforme determinado pelo teste de Kruskal-wallis seguindo pelo pós-teste de Dunn.

Dando sequência, decidimos avaliar os níveis de HbF dos pacientes AF e ver se essa diminuição do número de complicações, naqueles pacientes que apresentam aumento da expressão de *FOXO3*, era devida ao aumento da

expressão dessa hemoglobina (Figura 13). Neste experimento, constatamos que não existe correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e de expressão do gene *FOXO3* (r = -0,12). O resultado nos indicam que possivelmente a expressão do gene *FOXO3* não regula, isoladamente, a concentração de HbF nesses indivíduos.

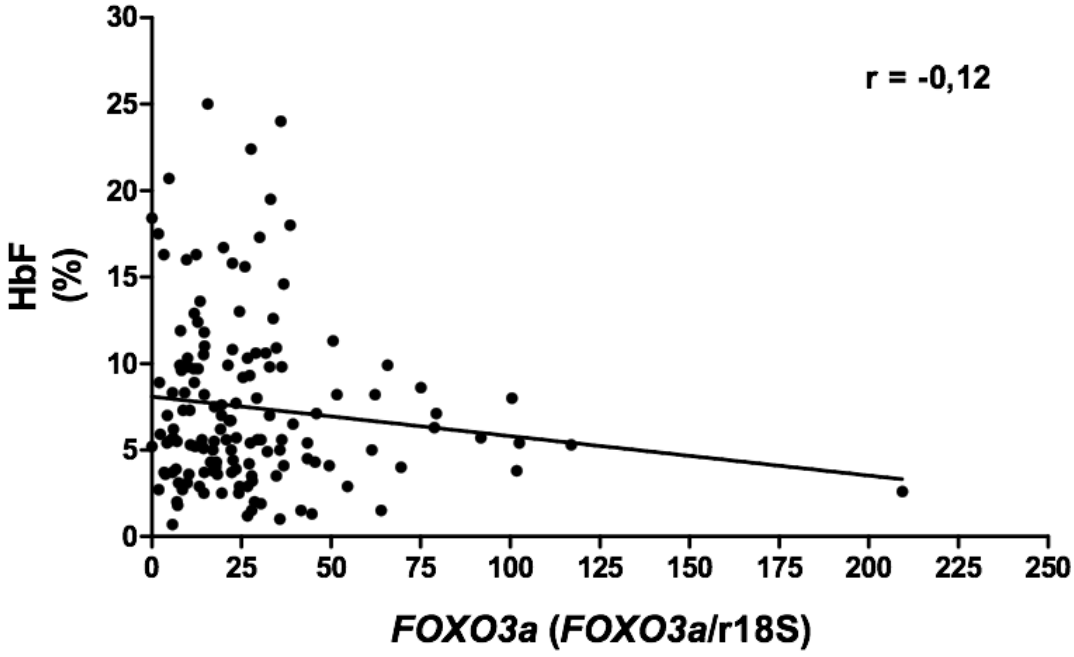


Figura 13. Correlação entre os níveis de expressão do gene *FOXO3* e de hemoglobina fetal em pacientes portadores de anemia falciforme, conforme determinado pelo teste de correlação de Pearson.

Em relação a expressão de hemoglobina fetal e o seu papel de melhoria da qualidade de vida em pacientes com hemoglobinopatias, também foi realizada a associação entre as suas taxas de expressão e os números de possíveis complicações clínicas apresentadas pelos pacientes portadores de AF. Neste estudo encontramos que não existe relação entre a expressão de HbF e número de complicações clínicas, indicando que, mesmo com níveis de hemoglobina fetais aumentados os pacientes podem apresentar em algum momento da vida complicações, cabendo a HbF, provavelmente, a presença de um papel protetor, porém, sem garantir o não desenvolvimento de manifestações clínicas (Figura 14).

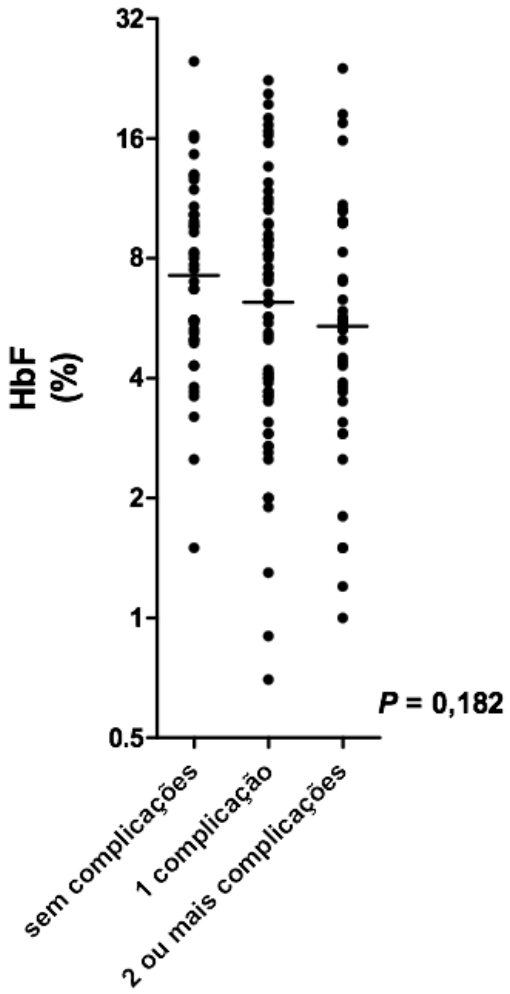


Figura 14. Correlação entre os níveis de expressão de HbF e complicações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. As barras mostram que os indivíduos AF que têm um aumento dos níveis de expressão de HbF não estão protegidos em relação ao desenvolvimento de complicações clínicas, conforme determinado pelo teste de Kruskal-wallis seguindo pelo pós-teste de Dunn.

3.2 Expansão e purificação do gene *FOXO3*

A figura 15 mostra o vetor de clonagem (pGEX) que continha o gene *FOXO3.* Este foi expandido em 5mL de meio de crescimento bacteriano, Luria Bertani (LB), sem antibiótico. Para que houvesse o crescimento bacteriano, a suspensão foi incubada a 37° C overnight e após o devido crescimento o DNA plasmidial foi extraído pelo Kit de midiprep QIAprep Spin Midiprep Kit (QIAGEN) e quantificado no nanodrop DS-11 FX (DeNovix) (286,87 ng/µl).

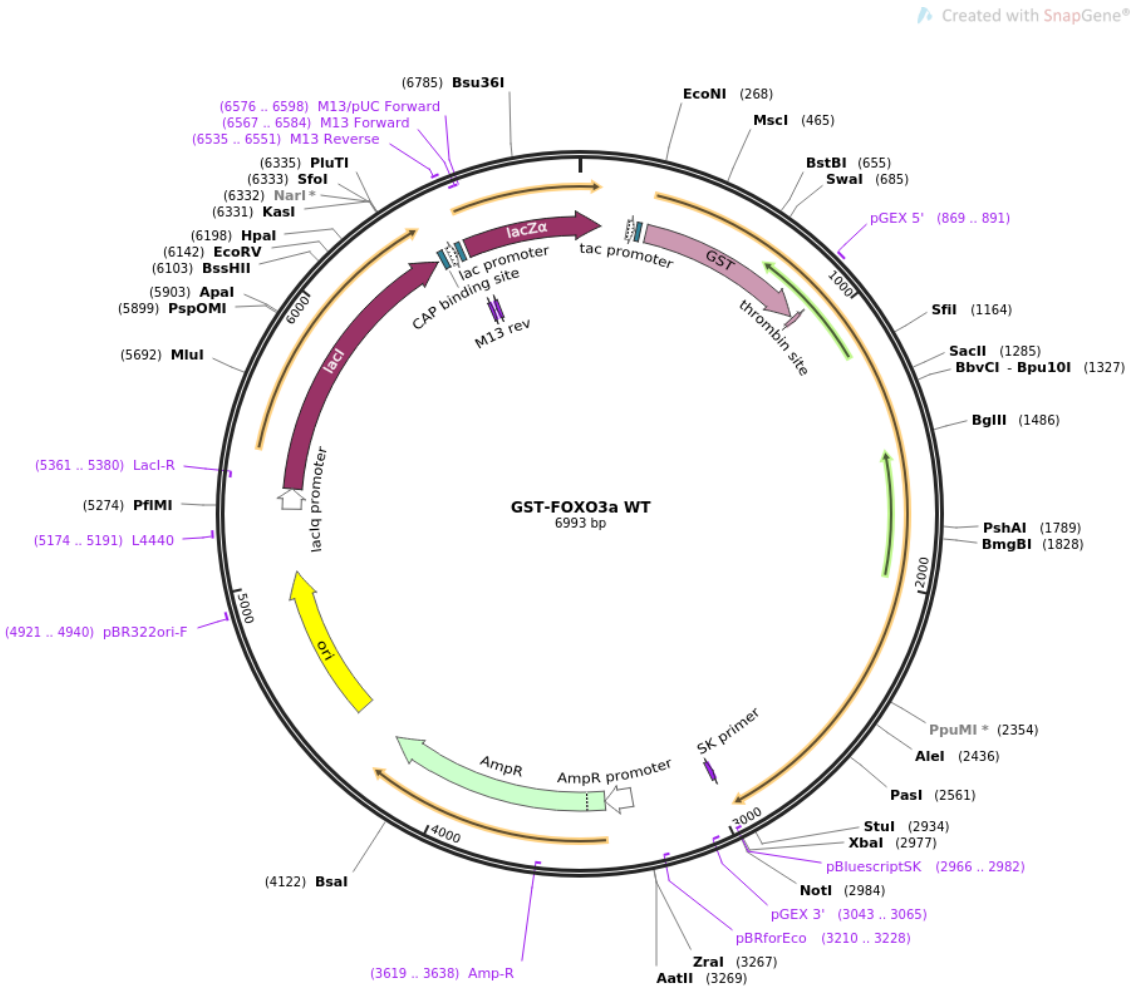


Figura 15. Vetor de clonagem pGEX que contém o gene *FOXO3*. O vetor pGEX, que contém 6993 pares de bases, foi adquirido da empresa addgene, e digerido com as enzimas BstBI (655) e NotI (2984) para remoção do gene *FOXO3*.

Logo após a extração foi realizado o sequenciamento para confirmar que, de fato, o gene de interesse estava inserido no plasmídeo. Após a confirmação da presença do inserto, esta construção passou por um processo de digestão enzimática, onde se utilizou as enzimas BstBI e NotI, para a remoção de um fragmento de 4664 pares de bases (pb), correspondente ao vetor linearizado, e outro de 2316 pb, equivalente ao gene *FOXO3* (Figura 16). O experimento foi seguido por remoção, com lâminas estéreis, das bandas que correspondiam ao gene de estudo e consequente purificação desse fragmento com o kit *Pure Link - Quick Gel Extraction* (Invitrogen) e quantificadas no nanodrop (69,28 ng/µl).

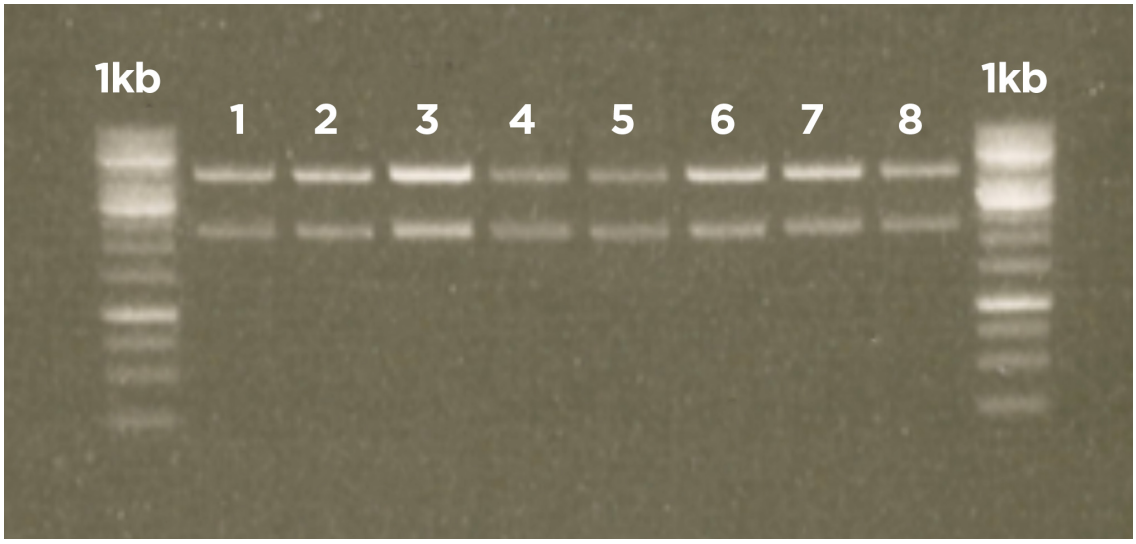


Figura 16. Digestão do vetor de clonagem pGEX. Oito colônias bacterianas que continham o vetor foram digeridas com as enzimas BstBI e NotI para remoção do gene *FOXO3*. O gene *FOXO3* de 4644pb, é representado pelas bandas superiores, enquanto as bandas de baixo representam o vetor linearizado de 2326pb.

3.3 Sub-clonagem do gene *FOXO3* no sistema de expressão lentiviral pMEG

O pCDH1-MCS1-EF1-GFP-PURO (pMEG) (Figura 17), que corresponde ao nosso vetor de expressão lentiviral, passou pelos mesmos processos de expansão, purificação e digestão do vetor de clonagem pGEX. Após digerido com as mesmas enzimas, para criação de extremidades coesivas, BstBI e NotI, e purificado ele foi tratado com a enzima fosfatase e quantificado no nanodrop (169,50 ng/µl). Sendo assim, nesse momento, ambos, o gene *FOXO3* e o vetor pMEG, estavam prontos para serem ligados.

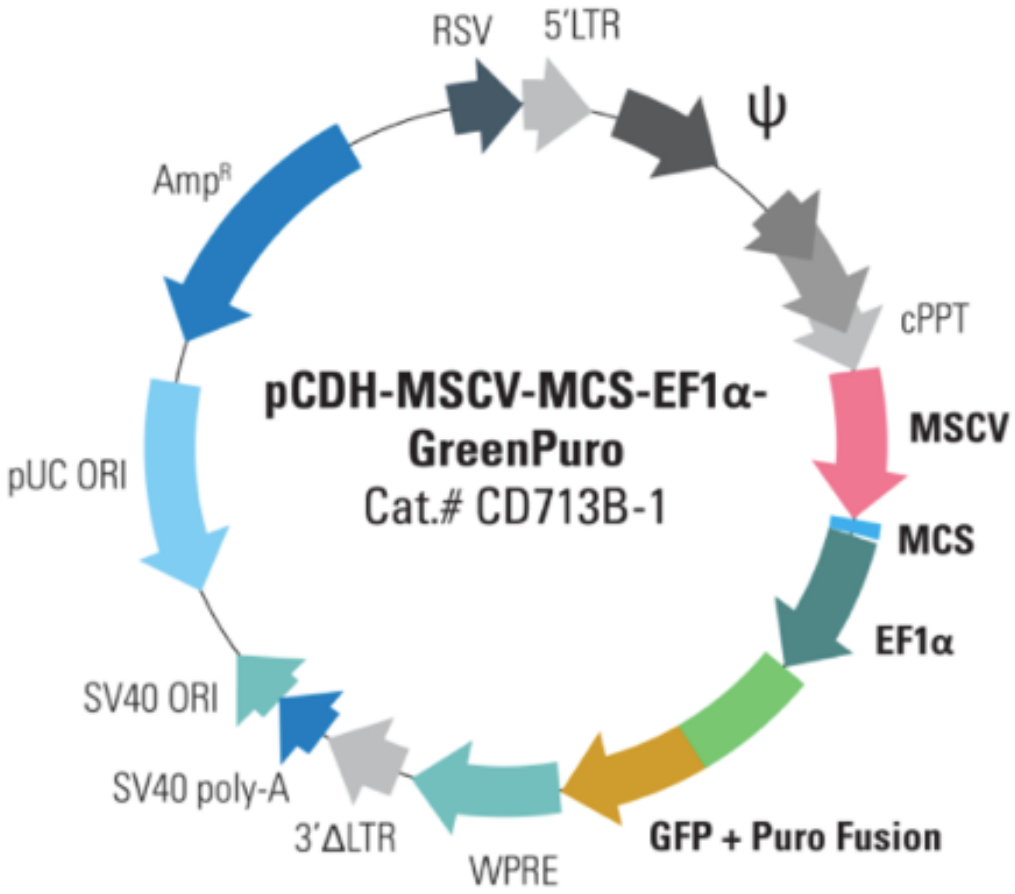


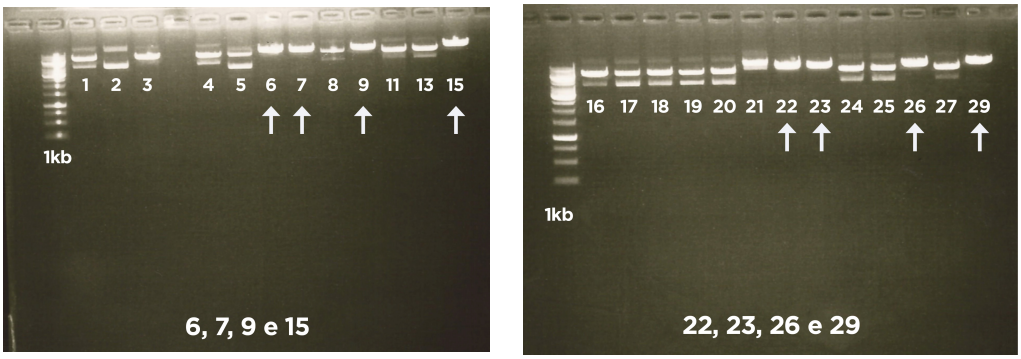
Figura 17. Vetor de expressão pCDH1-MCS1-EF1-GFP-PURO (pMEG). O pMEG contém sítios de resistência a puromicina (Puro *fusion*) e ampicilina (Amp^r), além de uma região de clonagem (MCS), o MSCV corresponde a um promotor com capacidade de permitir a expressão constitutiva do gene que será inserido, o EF1α é um fator de elongação que garante a transcrição do gene e o GFP, do inglês, *green flourescent protein,* é um repórter que emite fluorescência, indicando o sucesso do processo de transfecção/transdução.

Subsequentemente, foi realizada a ligação dos fragmentos lineares, de *FOXO3* e pMEG, com a enzima T4 ligase garantindo a formação de um vetor de expressão circular (plasmídeo), com 10.571pb, que agora contém o gene alvo do nosso projeto e os demais componentes necessários para garantir a expressão constitutiva deste.

Com o plasmídeo foi realizada uma transformação bacteriana, processo no qual, bactérias englobam e aumentam o número de cópias do vetor construído. Depois de 18h foram coletadas as 29 colônias que cresceram em placa com meio

seletivo (permitia apenas o crescimento de colônias resistentes a ampicilina, correspondente a marcação do pMEG) e destas foi extraído o DNA. Essas amostras passaram por dois processos de digestão, primeiro com a enzima NotI e depois com a BstXI, para confirmação da presença do inserto (Figura 18). Como resultado das digestões, obtivemos a confirmação da clonagem do gene *FOXO3* no sistema de expressão lentiviral pMEG. As amostras foram então sequenciadas.

18A.



18B.

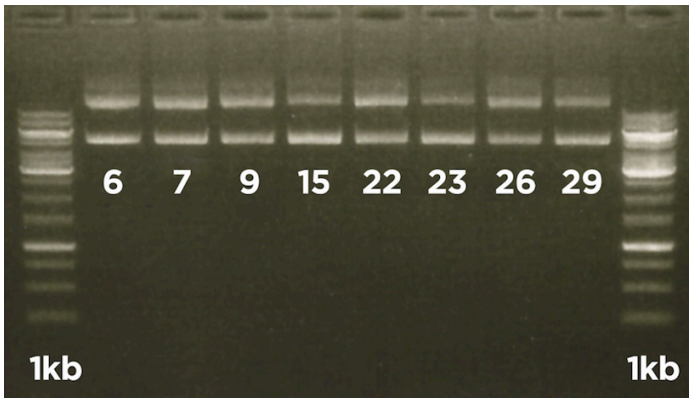


Figura 18. Confirmação do sucesso da sub-clonagem do gene *FOXO3* no vetor de expressão retroviral pMEG. A parte superior da figura (18A) mostra dois géis de agarose *Low Meelting* 1%, nestes estão presentes a digetsão com NotI dos 29 DNAs das colônias obtidas do processo de transformação, e as setas indicam que destas, 8 colônias, foram apresentam, de fato, a construção pMEG + *FOXO3*. Foi feita uma segunda digestão de confirmação (18B), apenas com as 8 colônias positivas, com a enzima BstXI, que continha um sítio de restrição dentro do gene *FOXO3.* Esse segundo experimento reforça o resultado previamente obtido, garantindo a presença do gene no sistema de expressão lentiviral.

3.4 Cultivo e transfecção de células empacotadoras (293T)

Para a produção de células empacotadoras (*HEK293T Phoenix-Eco*), foram utilizadas placas de cultura, que auxiliam na fixação destas células aderentes, e meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino. A cultura foi mantida até o

momento em que as células atingiram 80% de confluência, quando então foi realizado o processo de produção das partículas virais que irão produzir os vírus que contém o plasmídeo de interesse. Pra a produção do capsídeo viral foi utilizado 30*µ*g do DNA plasmidial, PMEG e pMEG-*FOXO3*, 3*µ*g de VSV-G e 4,5*µ*g de pCMVΔR8.74 e lipofectamina na proporção de 1:2, de DNA e lipofectamina, respectivamente. As células foram incubadas por 3h30min à 37° C, o meio foi trocado por um meio completo e as células foram incubadas *overnight* à 37° C. Após 48h da transfecção os vírus começaram a ser coletados, e se seguiu a coleta nos próximos dois dias, completando 72h e 96h. Após coleta os vírus foram utilizados para a transdução em células K562.

Uma vez que o plasmídeo pMEG apresenta integrado em sua estrutura o gene GFP, a porcentagem de sucesso da transfecção pode ser avaliada indiretamente pela intensidade de fluorescência desta proteína, quando excitada com um comprimento de onda específico. A figura 19 mostra a positividade das células empacotadoras (*HEK293T Phoenix-Eco*) frente à excitação com feixe de luz de comprimento de onda de 495 nm em microscópio de fluorescência com aumento de 400 x.

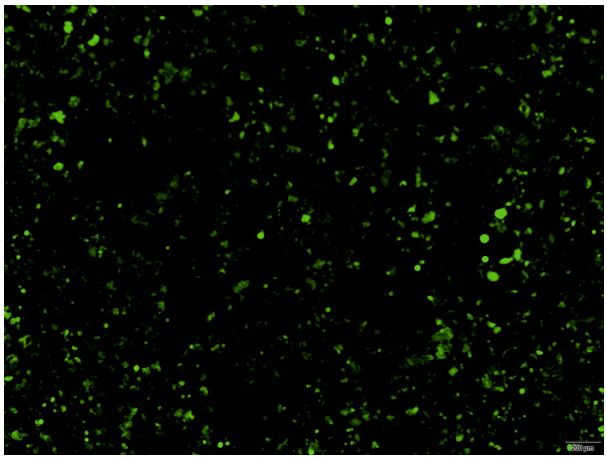


Figura 19. Expressão da proteína GFP em células HEK293T pós transfecção, evidenciando a produção da partícula viral.

3.5 Cultivo de células da linhagem K562 e infecção com partículas virais contendo o gene *FOXO3*

Seguindo o estudo, após a obtenção das células de linhagem K562, que foram descongeladas e mantidas em meio DMEM completo, as mesmas foram infectadas com as partículas virais contendo o vetor vazio (pMEG) ou vetor com o gene *FOXO3* (pMEG-*FOXO3*), adicionando-se os vírus e polybrene, seguido por espinoculação. Após infectadas, as células foram monitoradas e submetidas a tratamento com puromicina, para seleção das devidamente infectadas por 15 dias. Em seguida, esse material foi submetido ao isolamento (do inglês, *sorting*) por citometria de fluxo baseado na expressão da proteína GFP presente no vetor lentiviral pMEG. Parte dessas células foram submetidas à citometria de fluxo no citômetro FACSCalibur, o que revelou que 62,3% e 74,7% das células transfectadas com vetor vazio pMEG e o vetor pMEG-*FOXO3* expressavam a GFP, respectivamente (Figura 20).

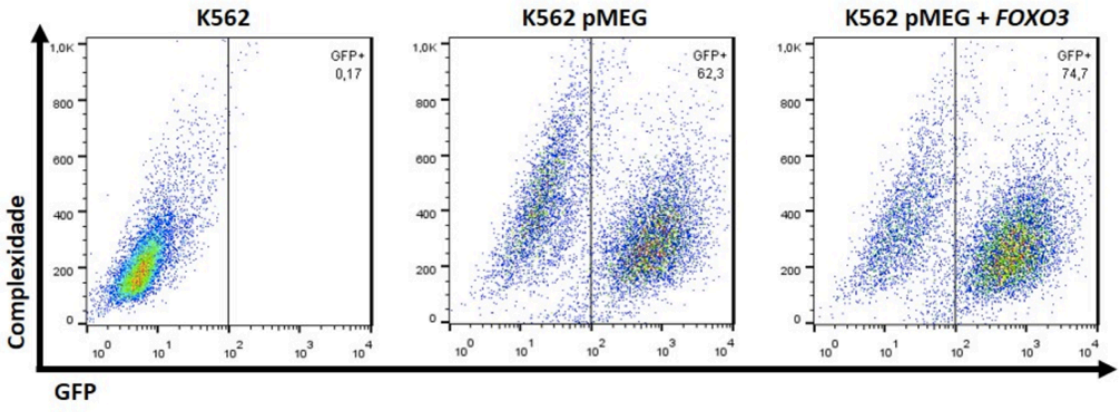


Figura 20. As imagens mostram o resultado da citometria de fluxo para positividade da proteína GFP em células K562 controle (0,17%), K562 pMEG (62,3%) e K562 pMEG + *FOXO3* (74,7%), respectivamente.

3.6 Análise das taxas de produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio

Na figura 21, observamos que as taxas de óxido nítrico produzidas pelas culturas de células K562 infectadas com os vírus pMEG e pMEG + *FOXO3*. A

mensuração foi feita de maneira indireta a partir da quantificação de nitrito produzido no meio de cultura das células. De acordo com os resultados as taxas de nitrito, e consequentemente, óxido nítrico, se encontram elevadas nas amostras que expressam maior conteúdo do gene *FOXO3* quando comparadas com as amostras de K562 basal e pMEG (P = 0,0001).

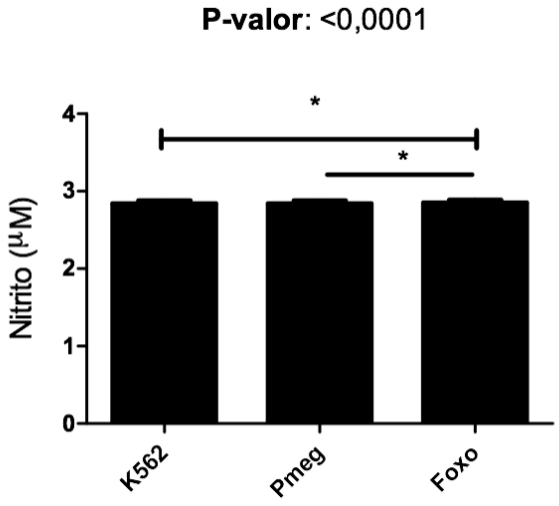


Figura 21. Análise da produção de óxido nítrico. A mensuração foi realizada a partir da concentração de nitrito produzido no meio de cultura celular. As diferenças entre os valores médios foram analisados estatisticamente utilizando o teste ANOVA e o pós teste de Bonferroni (GraphPad Prism7).

Dando continuidade as análises que dizem respeito ao controle de espécies reativas, foi feito o experimento para avaliação das taxas de produção de espécies reativas de oxigênio. A metodologia utilizada foi a do MitoSOX que avalia a atividade mitocondrial no que diz respeito a produção de ROS. A citometria apresentada nos gráficos da figura 22 revela que aquelas células que foram transfectadas com o vetor que contém o gene *FOXO3* possuem a capacidade de controlar a produção de ROS. Curiosamente, as células que possuem o vetor pMEG demonstraram aumento das taxas de espécies reativas frente a K562.

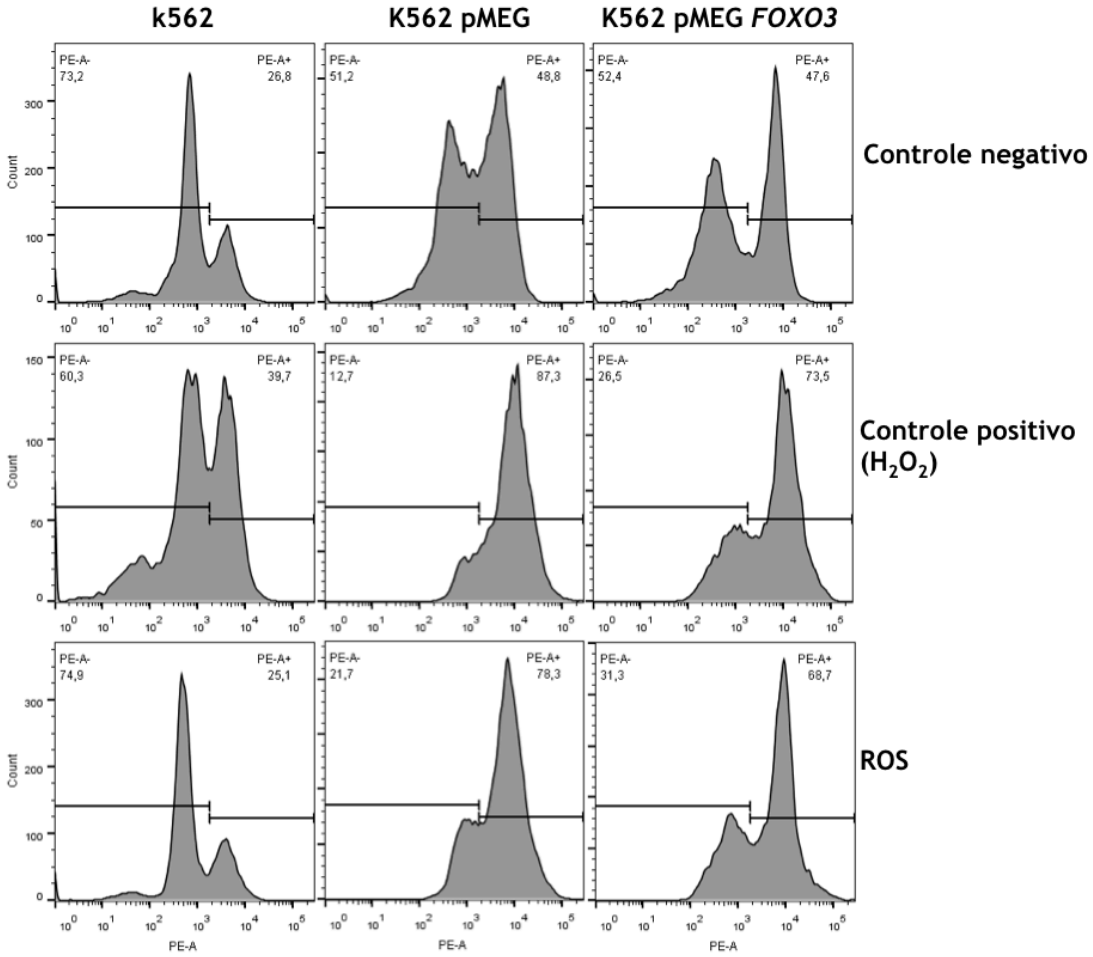


Figura 22. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio. A mensuração foi realizada a partir da produção de ROS mitocondrial. As intensidades médias de fluorescência foram obtidas por estatística de histograma utilizando o programa Flowjow.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gene *FOXO3* vem sendo associado com a maturação de células vermelhas nos últimos anos, além de apresentar possivelmente potencial como indutor positivo de HbF, podendo assim ser alvo farmacológico para o tratamento de hemoglobinopatias, que são doenças onde aumento de HbF esta diretamente relacionado com a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (Yankai *et al.,* 2015; Tsiftsoglou *et al.,* 2009). Nesse contexto decidimos avaliar o papel deste gene nas β hemoglobinopatias e entender melhor qual a sua associação com os níveis de HbF, *in vitro* e *in vivo.*

Os resultados *in vivo* apresentados mostraram que pacientes portadores de doenças falciformes tendem a cursar com aumento dos níveis de expressão de *FOXO3* em relação a indivíduos saudáveis. Entretanto, no que diz respeito a expressão do gene *FOXO3* em pacientes portadores de β talassemia intermediária, nosso estudo revelou que esse grupo tende a ter níveis basais de expressão de *FOXO3,* quando comparado a indivíduos saudáveis (HbAA). Lazarte *et al.,* 2017, mostrou que pacientes portadores de beta talassemia menor (assintomáticos) também não apresentam diferença estatística quanto aos níveis da expressão de *FOXO3.*

Acredita-se que o gene *FOXO3,* ultimamente associado com a maturação eritróide, teria a capacidade de aumentar o número de células quiescentes no processo de maturação, levando a um aumento de hemoglobina fetal (Liang & Ghaffari, 2016). Contudo, o que fica claro nos nossos resultados é que, possivelmente, o gene *FOXO3* possui a capacidade de elevar as taxas de precursores de cadeias globínicas (HBG1 e HBG2) pelo aumento da produção de óxido nítrico e ativação da via da guanilato ciclase, porém, sem necessariamente

levar ao aumento da própria hemoglobina dentro dos eritrócitos. Esta hipótese justificaria a falta de correlação entre *FOXO3* e os níveis de HbF nos indivíduos com anemia falciforme.

Como consequência da hemólise, apresentada por esses pacientes, o heme, um produto da degradação catalítica da hemoglobina, é formado e participa na produção de ROS (Akinsheye & Klings, 2010). Espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio e superóxido, geradas em elevadas taxas em portadores de AF, consomem o NO, contribuindo para diminuição da sua disponibilidade (Wood *et al.,* 2006; Gonçalves, 2012).

Uma das primeiras atividades relacionadas a família dos genes *FOX O* (*FOXO1, FOXO3, FOXO4* e *FOXO6*) foi o papel no controle do estresse oxidativo (Salih & Brunet, 2008; Eikkelenboom & Burgering, 2013). O gene *FOXO3* por ser um potente regulador dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, pode influenciar na existência de um quadro inflamatório local e sistêmico, além de modificar a capacidade de manutenção do tecido hematopoiético por previnir o acúmulo de ROS. Esse aspecto relacionado ao gene *FOXO3* pode justificar o fato de pacientes que apresentaram menores níveis do gene tinham maior risco a desenvolver úlcera de perna (Yalcin *et al.,* 2008; Marinkovic *et al.,* 2007).

Diante da conhecida atividade de *FOXO3* como regulador negativo dos níveis de ROS produzidos, experimentos que avaliaram o estresse oxidativo sofrido pelas células transfectadas foram realizados e revelaram que de fato o gene *FOXO3* apresenta a capacidade de diminuir os níveis de ROS gerados e consequentemente aumentar a concentração de óxido nítrico amenizando o processo de vaso-oclusão.

O NO, um radical livre diatômico gasoso e lipofílico com tempo de meia vida de segundos, produzido pelas células endoteliais vasculares, desempenha importantes papéis, como: vasodilador nas células musculares lisas, inibe a agregação plaquetária, inibição da adesão de leucócitos, diminuição da proliferação celular e exerce atividade antioxidante e anti-inflamatória (Sant'ana dusse *et al.*, 2003; Eeiter & Gladwin, 2003; Gladwin *et al.*, 2004; Akinsheye & Klings, 2010). A diminuição da biodisponibilidade de NO nos pacientes com AF é crítica e responsável por parte das complicações clínicas, como hipertensão pulmonar, priapismo e úlceras de membros inferiores (Kyle mack & Kato, 2006; Kato *et al.,* 2007; Morris, 2011).

Esses resultados nos mostram o incrível potencial do gene *FOXO3* no que diz respeito a melhoria da clínica dos pacientes portadores de hemoglobinopatias, pela indução do aumento das concentrações de NO, e ao mesmo tempo o controle de ROS.

Até hoje, todos os experimentos *in vitro,* relacionados a atividade de *FOXO3* trabalharam com o *knockdown* do gene, nunca a superexpressão. A proposta do nosso trabalho era então mostrar como o fator de transcrição *FOXO3* atuaria em um quadro de aumento de sua atividade, ao invés do seu silenciamento. Para isso utilizamos um sistema lentiviral para a infecção das células K562, o qual têm ganho espaço na área de terapia gênica, baseado na sua capacidade de infectar células, inclusive as que não se apresentam em fase de divisão celular. Esses plasmídeos virais, foram criados com base no funcionamento do vírus de imunodeficiência humana (HIV), que para a aplicação clínica precisou passar por uma série modificações, permitidas graças a engenharia genética, e assim protocolos puderam

ser desenvolvidos, utilizando sistemas lentivirais, inicialmente para terapia contra a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Zacchi *et al,.* 2008).

Experimentos que realizaram o *knockdown* do gene *FOXO3* revelaram que na ausência do gene a maturação de células vermelhas (Yalcin, 2008), controle do estresse oxidativo (Liang *et al*., 2016) e níveis de HbF (Yankai *et al.,* 2015), se mostram alterados.

Outro experimento para *knockdown* do gene *FOXO3* realizado por Wang *et al* em 2015, revelou o aumento acentuado da expressão de *FOXO3* durante a diferenciação e desenvolvimento eritróide em células estaminais embrionárias (HESC). O resultado do silenciamento concorda com os níveis de expressão de *FOXO3* diminuídos, mostrando que o fator de transcrição é, de fato, necessário para a diferenciação de células eritróides, uma vez que, diminuída sua expressão em cultura celular, genes indispensáveis para a maturação de células eritróides como GATA1 e KLF1, assim como genes produtores de cadeias globínicas, HBE, HBG e HBB, tiveram sua expressão também diminuídas (Wang *et al.,* 2015).

Todavia, todos os trabalho desenvolvidos em relação ao gene *FOXO3* associam a produção de HbF com o aumento da cadeia globínica gama. Nossos ensaios com amostras clínicas mostram que pacientes que cursam com aumento da expressão do gene *FOXO3* não apresentam um aumento proporcional de hemoglobina fetal, sugerindo um processo de degradação pós-transcricional na formação de novas moléculas de HbF.

Ao tratarmos da superexpressão do gene *FOXO3* esperávamos observar o aumento da proteína HbF e dos precursores associado a produção desta hemoglobina, entretanto, esses experimentos serão realizados mais adiante, para

que possamos observar qual associação existente, de fato, entre a expressão gênica do *FOXO3* e os níveis de hemoglobina fetal em cultura celular.

A figura 23 mostra a possível atividade do gene *FOXO3,* em pacientes portadores de anemia falciforme, de acordo com os nosso resultados. Ganhando destaque, diante do aumento da expressão de *FOXO3,* temos o aumento da produção de NO, que atua na regulação da via da guanilato ciclase aumento os níveis de GMPc, que pode alterar as taxas de produção de cadeias gama globínicas. Também ressaltamos o controle da produção das espécies reativas de oxigênio durante o processo de hemólise intravascular, diminuindo o quadro de falcização e vaso-oclusão apresentado por esses pacientes.

Com os resultados do nosso trabalho, é possível concluir que:

1. Indivíduos portadores de β-hemoglobinopatias (incluindo anemia falciforme), cursam com um aumento dos níveis de expressão do gene *FOXO3*;
2. A expressão diferencial de *FOXO3* foi associada com o desenvolvimento de úlcera de membros inferiores;
3. Não houve correlação entre os níveis de expressão de *FOXO3* e valores percentuais de HbF.
4. Na cultura celular o gene *FOXO3* parece regular as taxas de estresse oxidativo e induzir, a partir do aumento de óxido nítrico, a expressão dos precursores das cadeias gama globínicas.

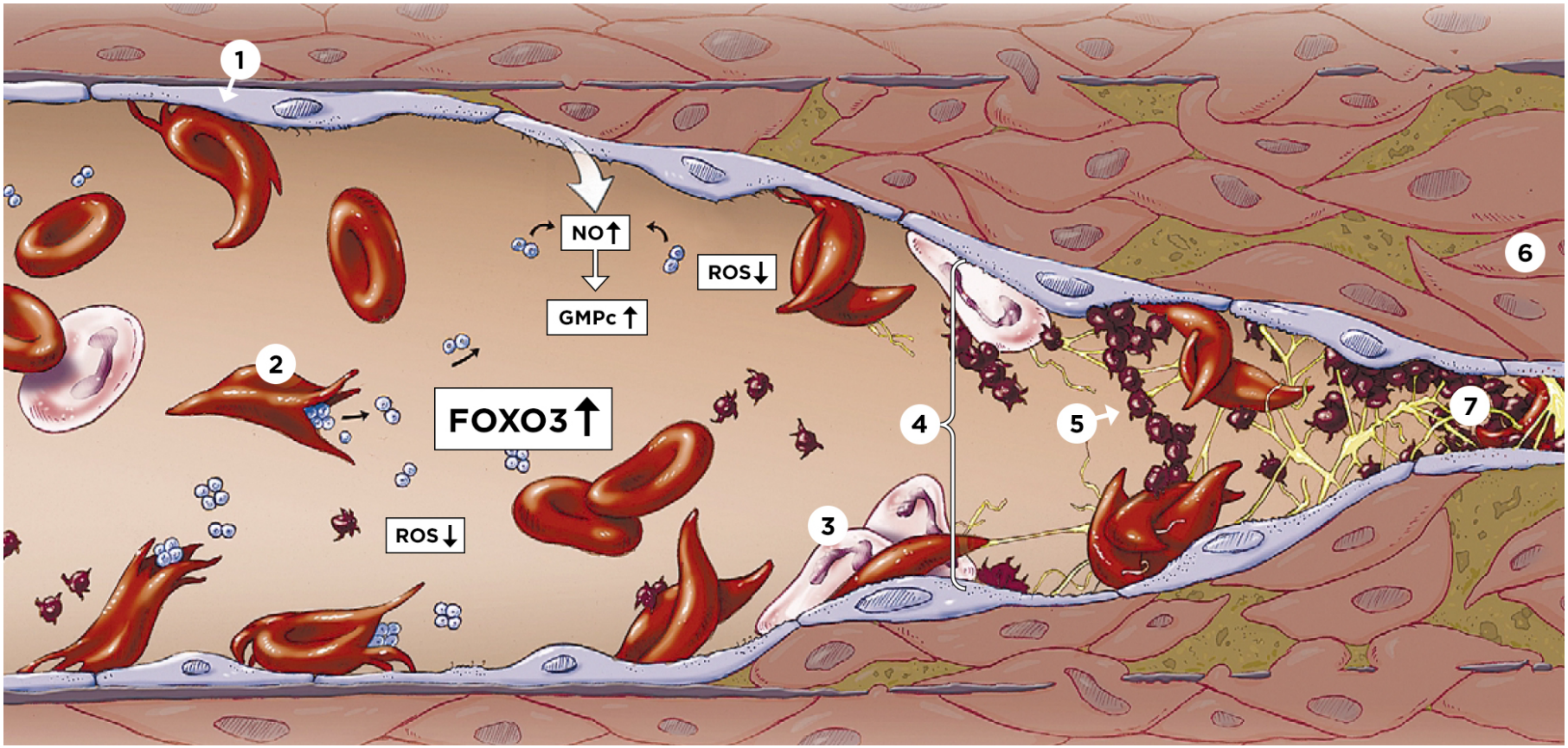


Figura 23. Proposta da atividade do gene *FOXO3* interferindo na fisiopatologia da anemia falciforme. A forma alterada e rígida do eritrócito devido à polimerização da HbS, é mais propensa à aderência anormal ao endotélio vascular (1) e hemólise (2). Esses fatores resultam em um estado proinflamatório manifestado em partes pela adesão de leucócitos (3) e pela agregação plaquetária (5). O aumento da expressão do gene FOXO3 pelas hemácias gera a elevação da secreção de óxido nítrico, ativando a via de GMPc, e a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio, diminuindo a vasoconstricção (4). O resultado final é a atenuação da vasculopatia (7) e vaso-oclusão (8) - Modificado de Switzer *et al*., 2006.

REFERÊNCIAS

Adams, R. Stroke prevention and treatment in sickle cell disease. Arch Neurol, v. 58, n. 4, p. 565–568, 2001.

Adams, R. J. Prevention of Stroke in Sickle Cell Anemia. The Journal of Law, Medicine & Ethics, v. 42, n. 2, p. 135–138, jun. 2014.

Arlet, J.; Dussiot, M.; Moura, I. C.; Hermine, O.; Courtois, G. Novel players in β-thalassemia dyserythropoiesis and new therapeutic strategies. Current Opinion. v. 23, n. 3, p. 181-8, 2016.

Akinsheye, A. Alsultan, N. Solovieff, D. Ngo, C.T. Baldwin, P. Sebastiani, D.H.K. Chui, M.H. Steinberg, Fetal hemoglobin in sickle cell anemia, Blood 118 (2011) 19–27.

Barbosa, E.B.; Vidotto, A.; Polachini, G.M.; Henrique, T.; Marqui, A.B.T.; Tajara, E.H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. Rev Assoc Med Bras 2012; 58(3):366-375.

Birgens H., Ljung R., 2007 The thalassaemia syndromes. Scand J Clin Lab Invest. 67:11-25.

Brasil. Ministério da Saúde, Portaria nº 2.048, de 3 de setembro de 2009, artigos 187 e 188. Condutas Básicas para o Tratamento – Doença Falciforme, 2013.

Brawley, O. W.; Cornelius, L. J.; Edwards, L. R.; Gamble, V. N.; Green, B. L.; Inturrisi, C. E.; James, A. H.; Laraque, D.; Mendez, M. H.; Montoya, C. J.; Pollock, B. H.; Robinson, L.; Scholnik, A. P.; Schori, M. NIH consensus development statement on hydroxyurea treatment for sickle cell disease. NIH Consens State Sci Statements, v. 25, n. 1, p. 1–30, 2008.

Calnan *D.R., Brunet A., 2008 The FoxO code. Oncogene. 27: 2276–2288.*

Cantor, A. B.; Orkin, S. H. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21, 3368-3376, 2002.

Celik, H.; Kramer, A.; Challen, G. A. DNA methylation in normal and malignante hematopoiesis. Int J Hematol. 103:617–626, 2016.

Cumano, A.; Godin, I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu.* Rev. Immunol. 25, 745-785, 2007.

Davies S.C., Gilmore A., 2003 The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. Blood Rev. 17:99-109.

Dhaliwal G., Cornett P.A., Tierney L.M., 2004 Hemolytic anemia. Am Fam Physician. 69:2599-606.

Didati, A.; Sturgeon, M. C.; Keller, G. A view of human haematopoietic development from the Petri dish. Nature Reviews Molecular Cell Biology 18, 56–67, 2017.

Eijkelenboom, A., and B. M. Burgering, 2013 FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 14: 83-97.

Failace R..; Fernandes F.B. Hemograma. 5ed – Porto Alegre: Artmed, 2009; 180-181; 191-194.

Fernandes, Q. Therapeutic strategies in Sickle Cell Anemia: The past present and future. Life Sciences, v. 178, p. 100–108, 2017.

Franco, S. S., F. L. De, S. Ghaffari, C. Brugnara, D. A. Sinclair *et al.* 2014 Resveratrol accelerates erythroid maturation by activation of FoxO3 and ameliorates anemia in beta-thalassemic mice. Haemat logica. 99: 267-275.

Frenette P.S., Atweh G.F., 2007 Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. J Clin Invest. 117:850-8.

Frenette, P. S.; Atweh, G. F. Science in medicine Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. The Journal of Clinical Investigation, v. 117, n. 4, p. 850–58, 2007.

Friedrisch, J. R.; Sheehan, V.; Flanagan, J. M.; Baldan, A.; Summarell, C. C.; Bittar, C. M.; Friedrisch, B. K.; Wilke, I. I.; Ribeiro, C. B.; Daudt, L. E.; da Rocha Silla, L. M. The role of BCL11A and HMIP-2 polymorphisms on endogenous and hydroxyurea induced levels of fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients from southern Brazil. Blood Cells, Molecules & diseases. 62:32-37, 2016.

Fu, X.H.; Liu, D.P.; Liang, C.C. Chromatin structure and transcriptional regulation of the beta-globin locus. Exp Cell Res., v.278, n.1, p.1-11, 2002.

Goren A., Simchen G., Fibach E., et al., 2006 Fine tuning of globin gene expression by DNA methylation. PLoS ONE. 1:e46.

Hai Wang, Yanming Li, Sifeng Wang, Qian Zhang, Jiawen Zheng, Yadong Yang, Heyuan Qi, Hongzhu Qu, Zhaojun Zhang, Feng Liu, Xiangdong Fang, 2015 Knockdown of transcription factor forkhead box O3 (FOXO3) suppresses erythroid differentiation in human cells and zebrafish. Biochemical and Biophysical Research. 460: 923-930.

Higgs, D. R., 2013 The molecular basis of alpha-thalassemia. Cold Spring Harb.Perspect.Med. 3: a011718.

Hoffbrand, A.V.; Moss, P.A.H. Fundamentos em Hematologia. Ed.Artmed – 6a Edição, p.16-24, 2013.

Imperato, M. R.; Cauchy, P.; Obier, N.; Bonifer, C. The RUNX1-PU.1 xis in the control of hematopoiesis. Int J Hematol. 101:319–329, 2015.

Ivanovs, A.; Rybtsov, S.; Anderson, R. A.; Turner, M. L.; Medvinsky, A. Identification of the niche and phenotype of the first human hematopoietic stem cells. *Stem Cell Rep.* 2, 449–456, 2014.

Jagannathan-Bogdan, M.; Zon, I. L. Hematopoiesis. Development at a glance. 140, 2463-2467, 2013.

Jin, H.; Xu, J.; Wen, Z. Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development. *Blood* 109, 5208-5214, 2007.
Kiefer, C.M.; Hou, C.; Little, J.A.; Dean, A. Epigenetics of beta-globin gene regulation. Mutat res., v.1, n. 647, p. 68-76, 2008.

Lettre, G. The Search for Genetic Modifiers of Disease Severity in the β - Hemoglobinopathies. Cold Spring Harbor Perspect Med, 2012.

Madigan C., Malik P., 2006 Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. Expert Rev Mol Med. 8:1- 23.
Makani, J.; Menzel, S.; Nkya, S.; Cox, S.E.; Drasar, E.; Soka, D.; Komba, A.N.; Mgaya, J.; Rooks, H..; Vasavda, N.; Fegan, G.; Newton, C.R. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. Blood. 117: 1390-1392, 2011.

Marinkovic, D., X. Zhang, S. Yalcin, J. P. Luciano, C. Brugnara *et al.* 2007 Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. J.Clin.Invest 117: 2133-2144.

Murayama, E.; Kissa, K.; Zapata, A.; Mordelet, E.; Briolat, V.; Lin, H. F.; Handin, R. I.; Herbomel, P. Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* 25, 963-975, 2006.

Orkin, S. H.; Zon, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644, 2008.
Orkin, S.H.; Higgs, D.R. Sickle Cell Disease at 100 Years. Science. Vol 329, 2010.

Pace B.S., Zein S., 2006 Understanding mechanisms of gamma-globin regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. Dev Dyn. 235:1727–1737.

Paik, E. J. and Zon, L. I. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1127-1137, 2010.

Palis, J.; Yoder, M. C. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp. Hematol.* 29, 927-936, 2001.

Piel, F. B.; Patil, A. P.; Howes, R. E.; Nyangiri, O. A.; Gething, P. W.; Williams T. N.; Weatherall, D. J.; Hay, S. I. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis.Nature communications. 2010.

Piel, F. B.; Hay, S. I.; Gupta, S.; Weatherall, D. J.; Williams, T. N. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. PLoS Medicine, v. 10, n. 7, 2013.

Piel, F. B.; Steinberg, M. H.; Rees, D. C. Sickle Cell Disease. New England Journal of Medicine, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.

Platt, O. S. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia. 2008.

Serjant, G. R.; Vichinsky, E.; Herrick, J.; Mason, V. Blood Cells , Molecules and Diseases Variability of homozygous sickle cell disease : The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. Blood Cells, Molecules and Diseases, n. March, p. 0–1, 2017.

Soares, A. C. N.; Samico, I. C.; Araújo, A. S.; Bezerra, M. A. C.; Hatzlhofer, B. L. D. Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 36, n. 4, p. 250–255, 2014.

Sokolova, A.; Mararenko, A.; Rozin, A.; Podrumar, A.; Gotlieb, V. Hereditary persistence of hemoglobin F is protective against red cell sickling. A case report and brief review. Hematol Oncol Stem Cell Ther. S1658-3876(17)30115-2, 2017.

Sonati, M. F., F. F. Costa, 2008 The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. J.Pediatr.(Rio J.) 84: S40-S51.

Stamatoyannopoulos G., Grosveld F., 2001 Hemoglobin switching. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus P, Perlmutter RM, Varmus H, editors. The Molecular Basis of Blood Diseases. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders. Pp. 135–182.

Stamatoyannopoulos G., 2005 Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. Exp Hematol. 33:259–271.

Steinberg, M. H.; Hsu, H.; Nagel, R. L.; Milner, P. F.; Adams, J. G.; Benjamin, L.; Fryd, S.; Gillette, P.; Gilman, J.; Josifovska, O.; Hellman−Erlingsson, S.; Safaya, S.; Huey, L.; Rieder, R. F. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. American Journal of Hematology, v. 48, n. 3, p. 175–181, 1995.

Steinberg M.H., Barton F., Castro O., Pegelow C.H., Ballas S.K., Kutlar A., et al., 2003 Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. JAMA. 289:1645- 51.

Steinberg, M. H.; Mccarthy, W. F.; Castro, O.; Ballas, S. K.; Armstrong, F. D.; Smith, W.; Ataga, K.; Swerdlow, P.; Kutlar, A.; Decastro, L.; Waclawiw, M. A.; investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell, a.; follow-up, m. s. h. p. the risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. am j hematol, v. 85, n. 6, p. 403–408, 2010.

Strouse, J. J.; Lanzkron, S.; Beach, M. C.; Haywood, C.; Park, H.; Witkop, C.; Wilson, R. F.; Bass, E. B.; Segal, J. B. Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. Pediatrics, v. 122, n. 6, p. 1332–1342, 2008.

Thein, S. L. Genetic association studies in β-hemoglobinopathies. Hematology American Society. 2013:354-61, 2013.

Thein, S.L., Craig, J.E., 1998 Genetics of Hb F/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. Hemoglobin. v.22, n.5, p. 401-14.

Theodorsson E., Birgens H., Hagve T.A., 2007 Haemoglobinopathies and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a Scandinavian perspective. Scand J Clin Lab Invest. 67:3-10.

Tolentino K., Friedman J.F., 2007 An update on anemia in less developed countries. Am J Trop Med Hyg. 77:44-51.

Urbinati F., Madigan C., Malik P., 2006 Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. Expert Rev Mol Med. 8:1-26. Vacca; Blank, 2017.

Verrastro, T.; Neto, S.W. Hematologia e Hemoterapia. Ed. Atheneu – 1a Ed. p. 3-12.

Wang, Q.; Stacy, T.; Binder, M.; Marin-Padilla; M., Sharpe; A. H.; Speck, N. A. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3444-3449, 1996.

Wang, W. C.; Ware, R. E.; Miller, S. T.; Iyer, R. V; Casella, J. F.; Minniti, C. P.; Rana, S.; Thornburg, C. D.; Rogers, Z. R.; Kalpatthi, R. V; Barredo, J. C.; Brown, R. C.; Sarnaik, S. A.; Howard, T. H.; Wynn, L. W.; Kutlar, A.; Armstrong, F. D. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia : a multicentre , randomised , controlled trial (BABY HUG). The Lancet, v. 377, n. 9778, p. 1663–1672, 2011.

Ware, R. E. How I treat How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. Blood, v. 115, n. 26, p. 5300–5312, 2010.

Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. The thalassemia syndromes. 3th ed. oxford: blackwell, 1981.

Wilber, A.; Nienhuis, A. W.; Persons, D. A. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. Blood, 117(15):3945-53, 2011.

Wyszynski, D. F.; Baldwin, C. T.; Cleves, M. A.; et al.. Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), v. 50, n. 1, p. 23–33, 2004.

Yankai Zhang, Mitch Weiss, Pavel Sumazin, Vivien A. Sheehan, 2016 Metformin Induces FOXO3-Dependent Fetal Hemoglobin Production in Primary Erythroid Cells. Oral and Poster - ASH 2016.

Zago M.A., Falcão R.P., Pasquini R., 2004 Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu.

Zago, M.A.; Falcão, R.P.; Paquini, R. Tratado de Hematologia. 1a ed. Ed. Atheneu. 2013.

Zaret K.S., Carroll J.S., 2011 Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. Genes Dev. 25 (21): 2227–41

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Fundação HEMOPE Recife

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças
Recife-PE.
CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771
Fax: 81- 3182-4660
C-eletrônico: cep.hemope@gmail.com

Governo do Estado de PE
Secretaria de Saúde do Estado de PE

1 - DADOS SOBRE O PROJETO — PARECER FINAL: Nº. 035/2010

Título do Projeto: Moduladores genéticos das manifestações clínicas da anemia falciforme
Instituição Solicitante: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Pesquisador: Marcos André Cavalcanti Bezerra, Ph.D.
Identidade: 5867375 **CPF:** 987.061.525-20 **Telefone:** 81 – 3182-4711
Endereço: Rua. Antonio Celso Uchoa Cavalcanti- Graças- Recife – PE – CEP: 52050-002
Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia da Fundação Hemope- UNILABE
Finalidade: Auxílio a projetos de pesquisa Edital FACEPE 10/010.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:
Objetivo Geral: Determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade clínica da anemia falciforme.
Objetivos Específicos: Determinar a co-herança de $\alpha_2^{3.7kb}$ talassemia e da triplicação do α (ααα) influenciam nas manifestações clínicas do acidente vascular cerebral e priapismo na anemia falciforme; Relacionar os níveis de HbFetal e genótipos das Haplótipos β^S com o episódio de priapismo e acidente vascular cerebral; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene da e*NOS* (T-786C) no desenvolvimento do priapismo em pacientes com anemia falciforme; Investigar se a associação de SNPs no gene Kloto podem ser um fator de risco nas complicações vasculares, como priapismo, em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene TNF- α (-308) no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs2228088 (T- >G), localizado na região codificadora do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs3093665 (C- >A), localizado na região 3' não transcrita do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre pacientes portadores de anemia falciforme com e sem priapismo; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre os pacientes portadores de anemia falciforme com e sem AVC; Compreender melhor a heterogenicidade clínica da doença falciforme nas complicações do sistema nervoso central e Compreender melhor a heterogenicidade da doença falciforme nas complicações clínicas do priapismo.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no **Parecer nº. 035/2010**, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 20/10/2010

Ana Lúcia de Sena
Coordenadora - Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE