



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ISABELLA BARBUTTI GONÇALVES

**PADRÃO DE EXPRESSÃO E MECANISMOS DE REGULAÇÃO DOS GENES DAS
HEMOGLOBINAS NA PRÓSTATA**

CAMPINAS

2020

ISABELLA BARBUTTI GONÇALVES

**PADRÃO DE EXPRESSÃO E MECANISMOS DE REGULAÇÃO DOS GENES DAS
HEMOGLOBINAS NA PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

ORIENTADOR: Hernandes Faustino de Carvalho

Este arquivo digital corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Isabella Barbutti Gonçalves, e orientada pelo Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B234p Barbutti, Isabella, 1990-
Padrão de expressão e mecanismos de regulação dos genes das hemoglobinas na próstata / Isabella Barbutti Gonçalves. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citologia. 2. Regulação da expressão gênica. 3. Hemoglobinas. 4. Próstata. 5. Biologia molecular. I. Carvalho, Hernandes Faustino de, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Haemoglobin expression and gene regulation mechanisms in prostate cells

Palavras-chave em inglês:

Cytology

Gene expression regulation

Haemoglobins

Prostate

Molecular biology

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Hernandes Faustino de Carvalho [Orientador]

Alexandre Bruni Cardoso

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Murilo Vieira Geraldo

Vanessa Moraes Freitas

Data de defesa: 14-10-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

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

- ORCID do autor: <http://orcid.org/0000-0001-5478-9834>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5242121301253854>

Campinas, 14 de Outubro de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Dr. Alexandre Bruni Cardoso

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo

Dra. Vanessa Moraes Freitas

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa Biologia Celular e Estrutural da Unidade Instituto de Biologia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao professor Hernandes Carvalho, por ter me aceitado em seu laboratório e ter me ajudado desde o princípio. A escrever o projeto de pesquisa, aceitar diversas ideias de experimentos que nem eu e nem ele sabíamos realizar e, principalmente, por ouvir todas as minhas angústias e me acalmar quando os experimentos/resultados não saíam de acordo com o esperado. Aprendi muito sendo parte do laboratório de Matriz Extracelular, e não me tornei somente uma pesquisadora melhor, mas também uma pessoa melhor.

Por isso gostaria de agradecer também a todos os membros do laboratório: Aline Siqueira, Andrés Osório, Antônio Félix, Ariane Tocci, Breno Teófilo, James Couto, Mariana Baratti, Maraysa Melo, Rony Nunes e Tone Vander. Por todas as conversas, discussões, almoços, risadas, viagens a congressos. Por tudo que partilhamos e aprendemos uns com os outros. Vocês todos fizeram essa jornada ser bem mais gostosa! Também gostaria de agradecer ao Leandro Cardoso, por me ajudar com o manuseio e castração de todos os animais do projeto.

Agradeço também ao INFABIC, onde tive a oportunidade de entrar em contato com microscópios avançados e aprender não só técnicas de microscopia e a utilizar esses microscópios, como também aprender mais sobre física e sobre o funcionamento deles. Agradeço à Mariana Baratti e ao Vítor Pelegati por todo o suporte dado ao longo desses anos utilizando as instalações do INFABIC.

Gostaria de agradecer ao meu namorado Braian Kondo, por todo o apoio durante esse período. Por me acompanhar nessa montanha russa de emoções que é o desenvolvimento do doutorado, por estar presente nos momentos de tristeza pelos experimentos que não funcionaram e por me acompanhar no laboratório em algumas noites e finais de semana. E também por aprender tanto sobre meu projeto que é capaz de discutir os resultados comigo mesmo sendo formado em uma área totalmente diferente!

Um agradecimento especial à minha família, principalmente meus pais Solange e Oswaldo, minha irmã Beatriz, meu cunhado Gabriel, meus avós Nivea, Pedro, Oswaldo e Anna, meus tios e padrinhos Simone e Rogério e minha prima Ana Paula. Eles nem sempre entendiam sobre o meu trabalho, mas estavam sempre me apoiando e me perguntando sobre ele, torcendo para dar resultados incríveis.

Gostaria de agradecer às minhas amigas do Hemocentro, que me acompanham desde a iniciação científica e sempre estiveram ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso, e discutindo resultados comigo mesmo depois que mudei de laboratório. Em especial à Fernanda Niemann e à Bruna Palodetto, que me ajudaram desde o início do doutorado e fizeram a pré banca de qualificação mais difícil pela qual já passei. Agradeço também à Dra. Sara Saad, pelo uso dos equipamentos de citometria, e à Irene Santos, que me ajudou muito na padronização, realização e análise dos experimentos de citometria de imagem.

Ao Dr. Jim Hughes, da Universidade de Oxford, que mesmo sem me conhecer marcou uma reunião comigo e sugeriu que eu realizasse o ATAC-seq, e aos seus alunos Dra. Priscila Hirschfeld e Dr. Damien Downes, que responderam incontáveis e longos e-mails para me ajudar na compra de materiais, desenvolvimento e análise desse experimento tão complexo.

Um agradecimento à instalação aberta de Sequenciamento de Alta Performance (NGS) do LNBR - Laboratório Nacional de Biorrenováveis (CNPEM / MCTIC), principalmente ao responsável Douglas Paixão, que me auxiliou na compra dos materiais e realização do controle de qualidade, quantificação das amostras e sequenciamento do experimento de ATAC-seq.

À Leticia Fröhlich Archangelo, minha primeira orientadora, que além de ter me ensinado muito sobre ser uma pesquisadora durante a Iniciação Científica e o Mestrado, me acolheu em sua casa quando fui fazer um curso de bioinformática em Ribeirão Preto. E que também aceitou fazer parte da banca de defesa.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e defesa de doutorado, por terem aceitado participar e por terem dado sugestões importantes para a finalização do trabalho.

Agradeço enfim à agência de fomento FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 2016/06543-4), sem a qual a realização desse trabalho seria impossível. O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Uma pessoa não é nem mais nem menos que a história de suas paixões e realizações.”

V. M. Straka

RESUMO

Os genes da α (*HBA*) e β -globina (*HBB*) estão organizados em *clusters* situados em diferentes cromossomos e eles são comumente estudados em células eritróides, onde sua expressão é estequiométrica e a regulação gênica é finamente regulada. Na literatura há descrição de expressão de hemoglobinas em diversos outros tecidos, sendo que alguns desses trabalhos esbarram na questão da regulação gênica ou da funcionalidade das proteínas. Trabalhos anteriores de nosso laboratório identificaram a expressão de hemoglobinas na próstata ventral de roedores adultos castrados ou submetidos à dieta normolipídica baseada em banha de porco. Além disso, dados da literatura demonstraram atividade do promotor proximal da HBG humana em células p63⁺ da próstata de ratos e em algumas linhagens humanas de próstata. A partir desses dados, foi de nosso interesse estudar em quais condições os genes das hemoglobinas são expressos na próstata e verificar se sua regulação gênica é similar àquela encontrada em células eritróides. E, como a expressão de hemoglobinas parece estar correlacionada com um estado de indiferenciação de células epiteliais, também decidimos verificar se há correlação entre a expressão desses genes e a progressão tumoral de próstata. Para isso, caracterizamos a expressão de hemoglobinas e a localização subcelular das proteínas em linhagens celulares de próstata humana normais ou tumorais, cultivadas em 2D ou 3D, e tratadas com andrógenos. Também utilizamos a próstata de camundongos submetidos a diferentes estímulos androgênicos, obtidos através de castração e/ou reposição hormonal, e de animais idosos. Concluímos que células epiteliais normais da próstata apresentam maior expressão de hemoglobinas do que as células tumorais e que a sinalização de diidrotestosterona (DHT) não altera a expressão de hemoglobinas *in vitro* ou *in vivo*. A linhagem RWPE1 apresenta expressão basal de *HBA2*, *HBA1* (*cluster* α) e *HBE* (*cluster* β). Há aumento da expressão de *HBA* com o cultivo tridimensional dessa linhagem, acompanhado de alteração na localização subcelular da proteína correspondente em algumas células. As hemoglobinas embriônicas são as únicas do *cluster* β expressas, tanto *in vivo* (*Hbb-by* na próstata de camundongos idosos) como *in vitro* (mRNA e proteína da HBE em RWPE1). A expressão de hemoglobinas na próstata não é regulada de maneira similar à de eritrócitos. As flutuações de expressão encontradas na linhagem RWPE1 também não são explicadas por fatores intrínsecos do tecido prostático (estímulo por DHT ou expressão de p63) nem por outros mecanismos (sinalização da matriz extracelular ou hipóxia), embora o gene *HBA* tenha expressão aumentada no cultivo 3D.

Palavras-chave: HBA; HBB; α -globina; β -globina; próstata; regulação da expressão gênica; regulação androgênica; testosterona

ABSTRACT

HBA and HBB genes cluster in different chromosomes. They are commonly expressed in cells from the erythroid compartment in a stoichiometric manner. Thus, their expression in this compartment is tightly regulated by a series of widely known factors. Nevertheless, there are several papers reporting haemoglobin expression in other tissues, some of them pointing to the gene regulation behind the expression and/or haemoglobin functionality in these foreign tissues. Interestingly, previous studies from our laboratory have found haemoglobin expression in rodent prostate cells: in castrated rats and in mice fed with normolipidic diets based on pork fat (lard). Additionally, published articles have described activity of the human HBG promoter in mice p63⁺ prostate cells and in human prostate cell lines. Thus, we intended to study the conditions in which haemoglobins are expressed in the prostate, as well as whether the gene regulation mechanisms are similar to that found in erythroid cells. Because haemoglobin expression in the prostate seems correlated with an undifferentiated state of the epithelial cells, we have also studied a possible link between haemoglobin expression and tumour progression. Therefore, we have characterized haemoglobin expression and subcellular localization in normal and tumour human epithelial prostate cell lines cultured bi- and three-dimensionally, and treated with androgens. We have also studied the effect of different concentrations of androgens in mice prostate, using castration and/or hormonal readministration, as well as the effects of aging, on haemoglobin expression. We concluded that normal epithelial prostate cell lines have higher haemoglobin expression when compared to tumour cells, and that dihydrotestosterone (DHT) signalling does not alter haemoglobin expression *in vitro* or *in vivo*. RWPE1 cell line expresses *HBA2*, *HBA1* (α cluster) and *HBE* (β cluster), and expression of *HBA* increases when cells are tridimensionally cultured. Moreover, HBA subcellular localization changes in some of the spheroid's cells. Embryonic haemoglobins are the only ones from the β cluster that are expressed, both *in vivo* (*Hbb-by* in aged mice prostate) and *in vitro* (HBE in RWPE1 cell line). Haemoglobin expression in prostate cells is not regulated in the same manner as in erythrocytes. Changes in haemoglobin expression found in the RWPE1 cell line also cannot be explained by DHT stimuli or p63 expression, which are specific features of prostate cells, nor by other mechanisms, such as extracellular matrix signalling or hypoxia, even though HBA is found overexpressed in the three-dimensional culture.

Key-words: HBA; HBB; α -globin; β -globin; prostate; gene expression regulation; androgen regulation; testosterone

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Imagem representativa da estrutura da hemoglobina, adaptada de Openstax College.....25
- Figura 2: Representação gráfica da disposição dos genes dos clusters da α - e β -globinas em (A) humanos e em (B) camundongos.26
- Figura 3: Comparação entre os *clusters* da α -globina humana e murina, extraída de Fu e colaboradores, 2005 [6].....27
- Figura 4: Representação da “fábrica de transcrição” do cluster que inclui o gene da α -globina murina. (A) cluster da α -globina murina representado de forma linear; (B) “fábrica de transcrição” de células eritróides de camundongos, nos quais o cluster da α -globina está ativo e (C) “fábrica de transcrição” em células não-eritróides de camundongos, cujo cluster da α -globina está inativo. Imagem extraída de Zhou e colaboradores, 2006 [11].....29
- Figura 5: Representação das modificações covalentes pós traducionais de histonas no cluster da α -globina de camundongos. (A) células progenitoras eritróides, (B) células eritróides primitivas e (C) células eritróides definitivas. A regulação das histonas nestes sítios em camundongos e em humanos é muito semelhante. Imagem extraída de Fu e colaboradores, 2005 [6].29
- Figura 6: Representação do cluster da β -globina humana e murina. As caixas amarelas representam o LCR. As setas pretas enumeradas representam os HSs. Imagem extraída de Higgs e colaboradores, 1998 [14].30
- Figura 7: Representação do cluster da β -globina murina com indicações das variações nos níveis de acetilação de histonas. A imagem foi extraída de Bulger e colaboradores, 2002 [18]. As barras dos gráficos indicam os níveis de acetilação da histona H3 em dois estudos independentes: Schubeler et al, em verde, [19] e Forsberg et al, em azul [20].....32

Figura 8: Atividade de GATA1 e GATA2 durante a diferenciação eritróide. Imagem retirada de Ferreira e colaboradores, 2005 [21].	33
Figura 9: Representação gráfica da construção do promotor proximal da HBG humana fundido à região codificadora do Antígeno T [45].	41
Figura 10: Representação gráfica do promotor da HBG humana fusionado à luciferase. Em destaque está a sequência de -201 a -140 nucleotídeos do promotor, responsável pela atividade na linhagem DU145 [46], e os respectivos sítios de ligação a fatores de transcrição [49, 50].	41
Figura 11: Expressão de hemoglobinas na próstata de camundongos diferencialmente alimentados. Variação no número de <i>reads</i> de diferentes hemoglobinas, obtidos através de RNAseq realizado com a próstata ventral de camundongos alimentados com óleo de linhaça (representados por barras brancas), óleo de soja (representados por barras verdes) ou gordura de porco (representados por barras cinza).	43
Figura 12: Identificação da α -globina na próstata de ratos. As indicações são animais neonatos com 6 (P6), 2 (P2) e 0 (P0) dias de vida, animais 3 dias após a castração (Cas3, Cas 2 e Cas1) e animais controle não castrados (CT3, CT2 e CT1).	43
Figura 13: Representação gráfica da anatomia da próstata humana dividida em zonas: a central, a de transição e a periférica. Imagem retirada de Verze e colaboradores[60].	45
Figura 14: Representação gráfica do trato geniturinário de camundongos adultos, com foco nos quatro lóbulos que compõe a próstata: ventral, anterior, dorsal e lateral. Imagem retirada de Abbott e colaboradores [44].	46
Figura 15: Representação gráfica dos tipos celulares que compões a próstata. Imagem retirada de Verze e colaboradores [60].	47
Figura 16: Imagem representativa da marcação de HBA (magenta) e HBE (verde) e as respectivas definições do que foi considerado marcação (vermelho).	65

Figura 17: Funcionamento do protocolo de ATAC-seq (do inglês *Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing*). (A) Sítios de corte da transposase Tn5. Imagem extraída de Buenrostro e colaboradores, 2013 [78] e (B) parâmetros que podem ser obtidos com esse protocolo, em comparação com outros protocolos. Imagem retirada de Tsompana e colaboradores, 2014 [80].67

Figura 18: *Workflow* utilizado para análises do ATAC-seq. As análises foram realizadas utilizando o servidor público de usegalaxy.eu, na plataforma *online* Galaxy [82]; ou utilizando o pacote do Bioconductor “ATAC-seqQC” para R [83]. As imagens ilustrativas foram retiradas de artigos sobre análise de ATAC-seq [78, 81, 83] ou do próprio Galaxy.72

Figura 19: Abundância de diferentes hemoglobinas em linhagens celulares humanas cultivadas em meio de cultura 10% FBS. (A) PCR de linhagens celulares humanas, sendo a linhagem de eritroleucemia HEL utilizada como controle positivo da presença de hemoglobinas. Em todos os PCRs, uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras. (B/C) *Western blotting* de HBA (14 kDa), HBG (14kDa), HBB (14kDa) e β -actina (40kDa, controle da quantidade de proteínas) de diferentes linhagens celulares humanas. β -ACTINA foi usada como controle da quantidade de proteínas de cada linhagem.76

Figura 20: Abundância relativa de mRNAs de hemoglobinas na linhagem LNCap tratada ou não com o agonista de andrógeno sintético R1881. Uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras.77

Figura 21: Expressão dos mRNAs de hemoglobinas nas linhagens PNT1A e PNT2 tratadas ou não com o andrógeno DHT. (A/C) Abundância relativa dos mRNAs de diferentes hemoglobinas. Uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras. (B/D) *Western blotting* de HBA (14 kDa) e β -actina (40kDa, controle da quantidade de proteínas).78

Figura 22: Abundância relativa de mRNAs de hemoglobinas em linhagens cultivadas tridimensionalmente em matriz rica em laminina. (A) LNCap, (B) PNT1A e (C) RWPE1. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como controle positivo da presença de hemoglobinas. Uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras.....79

Figura 23: Abundância de hemoglobinas na linhagem RWPE1 cultivada bidimensionalmente ou tridimensionalmente em matriz rica em laminina. Expressão gênica relativa de hemoglobinas analisada por qRT-PCR. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como normalizador. RWPE1 2D n=5; RWPE1 3D n=9; *student t test*.....80

Figura 24: Abundância de hemoglobinas na linhagem RWPE1 cultivada bidimensionalmente ou tridimensionalmente em matriz rica em laminina. *Western blotting* de HBA (14 kDa) e β -actina (40kDa, controle da quantidade de proteínas). 81

Figura 25: Localização subcelular de HBA e HBE. Imagens representativas de imunofluorescência de RWPE1 cultivada bidimensionalmente ou tridimensionalmente em matriz rica em laminina com marcação para HBA (verde), HBE (amarelo), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).81

Figura 26: Corte ortogonal de uma célula com marcação para HBA (verde), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, vermelha).....82

Figura 27: Localização subcelular de HBE em uma célula em divisão. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1 cultivada bidimensionalmente com marcação para HBE (amarelo), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).83

Figura 28: Reconstrução tridimensional de um esferóide. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1 cultivada tridimensionalmente em matriz rica em laminina com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho) e nuclear (DAPI, azul).

Por ser uma reconstrução tridimensional as imagens não possuem barra de escala.

.....84

Figura 29: Localização subcelular de HBA e HBE. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1 cultivada bidimensionalmente ou tridimensionalmente em matriz rica em laminina com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).84

Figura 30: Porcentagem de células expressando HBA e/ou HBE. Citometria de imagem de células marcadas com HBA (magenta), HBE e DAPI (núcleo, azul). (A/C) Gráficos de intensidade de fluorescência HBE *versus* Intensidade de fluorescência HBA. (B/D) Gráficos de intensidade de fluorescência de DAPI *versus* Intensidade de fluorescência HBA, com imagens representativas dos três grupos analisados: HBA negativo, HBA low e HBA high.85

Figura 31: Análise de co-localização de HBA e HBE em células cultivadas (A) bidimensionalmente e (B) tridimensionalmente em matriz rica em laminina. Citometria de imagem de células marcadas com HBA (magenta), HBE (verde) e DAPI (núcleo, azul), com imagens representativas de cada um dos grupos analisados. A co-localização é calculada a partir de imagens de todas as células analisadas.86

Figura 32: Abundância de fatores de transcrição eritróide específicos na linhagem RWPE1 cultivada em 2D ou 3D em matriz rica em laminina. Expressão gênica relativa analisada por qRT-PCR. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como normalizador e β -ACTINA foi utilizada como controle interno. RWPE1 2D n=3; RWPE1 3D n=6.87

Figura 33: Abundância de mRNA de fatores de transcrição eritróide específicos. PCR dos fatores de transcrição *GATA1*, *GATA2*, *KLF1*, *NF-E2 (p45)*, *FOG1* e *TAL1*. Uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi utilizada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras.88

Figura 34: Abundância de hemoglobinas na linhagem RWPE1 cultivada em 2D ou 3D em matriz rica em laminina, na presença ou ausência de DHT. Expressão relativa do mRNA de hemoglobinas analisada por qRT-PCR. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como normalizador e β -ACTINA foi utilizada como controle interno. Os pontos sobrepostos às barras indicam os resultados individuais de cada experimento. RWPE1 2D n=5; RWPE1 2D + DHT n=3; RWPE1 3D n=9; RWPE1 3D + DHT n=5 *Student's t test*.89

Figura 35: Localização subcelular de HBA e HBE em células tratadas com DHT. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1 cultivada em 2D ou 3D em matriz rica em laminina tratadas com DHT, com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).....90

Figura 36: Porcentagem de células tratadas com DHT expressando HBA e/ou HBE. Citometria de imagem de células marcadas com HBA (magenta), HBE e DAPI (núcleo, azul). (A/C) Gráficos de intensidade de fluorescência HBE *versus* Intensidade de fluorescência HBA. (B/D) Gráficos de intensidade de fluorescência de DAPI *versus* Intensidade de fluorescência HBA, com imagens representativas dos três grupos analisados: HBA negativo, HBA low e HBA high.....91

Figura 37: Análise de co-localização de HBA e HBE em células cultivadas (A) bidimensionalmente e (B) tridimensionalmente em matriz rica em laminina, ambas tratadas com DHT. Citometria de imagem de células marcadas com HBA (magenta), HBE (verde) e DAPI (núcleo, azul), com imagens representativas de cada um dos grupos analisados. A co-localização é calculada a partir de imagens de todas as células analisadas.92

Figura 38: Localização subcelular de HBA e RA em esferoides cultivados com ou sem DHT. Imagem representativa de imunofluorescência com marcação para HBA (verde), RA (amarelo), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, vermelho). As pontas de seta apontam para a marcação de RA.93

Figura 39: Reconstrução tridimensional de esferoides tratados com DHT. Imagens de imunofluorescências com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho), F-actina

(magenta) e nuclear (DAPI, azul). (A) Reconstrução demonstrando a presença de uma célula gigante no centro do esferoide com altas quantidades de HBA no citoplasma; e (B) reconstrução demonstrando presença de HBA polarizada em um esferoide. Por ser uma reconstrução tridimensional, as imagens não tem barra de escala.94

Figura 40: Métricas de qualidade do ATAC-seq. (A/D/G/J) Distribuição de tamanho dos fragmentos obtidos. O experimento ideal deve conter fragmentos menores de 100pb (regiões livres de nucleossomos) e fragmentos com periodicidade de 200bp (200pb, 400pb, 600pb - correspondendo a mono-, bi-, trinucleossomos e assim sucessivamente) [78, 79, 83]. (B/E/H/K) *Heatmaps* da distribuição de sinal próximo ao TSS, resultando de dados de fragmentos livres de nucleossomos e fragmentos ligados a nucleossomos. Idealmente, os fragmentos menores de 100pb devem estar imediatamente *upstream* aos *TSSs* [83]. (C/F/I/L) Histogramas demonstrando os dados dos *heatmaps*.96

Figura 41: Picos resultantes do ATAC-seq de uma região representativa do genoma de células cultivadas em 2D e em 3D.97

Figura 42: Abertura da cromatina nos promotores distais da α -globina de RWPE1 cultivada sem ou com tratamento com DHT, em comparação com subpopulações eritróides em diversos estágios de diferenciação. Resultados obtidos no ATAC-seq. Resultados das subpopulações eritróides foram reanalisados de publicações prévias [107, 108]. Os sítios de hipersensibilidade à DNaseI eritróides HS48, HS40, HS33 e HS10 estão anotados em verde.99

Figura 43: Abertura da cromatina nos promotores proximais da α -globina de RWPE1 cultivada sem ou com tratamento com DHT, em comparação com subpopulações eritróides em diversos estágios de diferenciação. Resultados obtidos no ATAC-seq. Resultados das subpopulações eritróides foram reanalisados de publicações prévias [107, 108]. O sítio de hipersensibilidade à DNaseI eritróide HS10 está anotados em verde.101

Figura 44: Abertura da cromatina nos promotores da β -globina de RWPE1 cultivada sem ou com tratamento com DHT, em comparação com subpopulações eritróides em diversos estágios de diferenciação. Resultados obtidos no ATAC-seq. Resultados das subpopulações eritróides foram reanalisados de publicações prévias [107, 108]. Os sítios de hipersensibilidade à DNaseI eritróide HS1, HS2 e HS3 estão anotados em verde.....103

.....103

Figura 45: Sequência genômica dos picos identificados na região promotora distal do *cluster* da β -globina. Os picos podem ser visualizados na Figura 44.....103

Figura 46: Abundância de hemoglobinas na linhagem RWPE1 cultivada em 2D ou em 3D na presença de matriz rica em laminina (MRL). Expressão relativa dos genes das hemoglobinas analisada por qRT-PCR. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como normalizador e β -ACTINA foi utilizada como controle interno. RWPE1 2D n=5; RWPE1 matriz rica em laminina 2D n=3; RWPE1 matriz rica em laminina solúvel n=3; RWPE1 3D n=9; *Student's t test*.105

Figura 47: Localização subcelular de HBA e HBE em células cultivadas em 2D sobre matriz rica em Laminina (MRL) ou com matriz rica em laminina solúvel. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1, com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).106

Figura 48: Localização subcelular de HBA e HIF-1 α em esferoide de RWPE1. Imunofluorescência com marcação para HBA (magenta), HIF-1 α (verde), F-actina (faloidina, vermelho) e nuclear (DAPI, azul).107

Figura 49: Localização subcelular de HBA e p63 Δ N em esferoide de RWPE1. Reconstrução tridimensional de imunofluorescência com marcação para HBA (magenta), p63 Δ N (verde), F-actina (faloidina, vermelho) e nuclear (DAPI, azul). No corte do detalhe é possível observar uma célula que apresenta marcação para HBA e p63 Δ N.109

Figura 50: Abundância de diferentes (A) hemoglobinas e (B) fatores de transcrição em DU145. PCR de DU145 e LNCaP, sendo a linhagem de eritroleucemia HEL utilizada como controle positivo da presença de hemoglobinas e fatores de transcrição. Em todos os PCRs, uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras.....110

Figura 51: Abundância relativa de mRNAs das hemoglobinas murinas *Hba*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* e *Hbb-by* em grupos selecionados de camundongos. A abundância relativa dos mRNAs foi verificada através de qRT-PCR, sendo a β -Actina utilizada como controle interno. Cada ponto representa um animal distinto. O fígado fetal foi utilizado como controle positivo da expressão gênica de hemoglobinas, enquanto o cérebro foi utilizado como controle negativo. Fígado fetal n=3; Cérebro G2 n=3; G2 n=3; G3 1 dia n=4; G3 2 dias n=3; G3 3 dias n=3; G3 7 dias n=4; G4 n=4; G5 n=5. A abundância de todas as hemoglobinas foi analisada; as hemoglobinas cuja expressão são equivalentes a zero não estão representadas por gráficos.....111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens humanas utilizadas e suas respectivas características.....	51
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> humanos para verificação da abundância de mRNAs de hemoglobinas por PCR e PCR em tempo real.....	59
Tabela 3: Sequência de <i>primers</i> humanos para verificação da abundância de mRNAs de fatores de transcrição por PCR e PCR em tempo real.....	60
Tabela 4: Sequência de <i>primers</i> humanos para verificação da abundância de mRNAs de fatores de transcrição por PCR em tempo real.	61
Também fizemos a análise de expressão gênica de hemoglobinas nos órgãos dos grupos de camundongos descritos anteriormente. Verificamos a expressão dos genes dos cluster da α - e β -hemoglobinas murinas com primers para <i>Hba-x</i> , <i>Hba-a</i> , <i>Hbb-by</i> , <i>Hbb-bh1</i> , <i>Hbb-bh2</i> , <i>Hbb-b1</i> e <i>Hbb-b2</i> . O controle positivo das reações foi feito com o primer da β -Actina. (.....	61
Tabela 5: Sequência de primers murinos para verificação da expressão gênica de hemoglobinas por PCR quantitativo em tempo real.	61
Tabela 6: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para indexação das amostras de ATAC-seq.	69
Tabela 7: Lista dos fatores de transcrição preditos para se ligarem às sequências dos picos A, B e C do cluster da β -globina. Os fatores de transcrição cor de rosa são similares entre os picos A e B, e os fatores de transcrição sublinhados são similares entre os picos B e C.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – Receptor de Andr geno (do inglês, *Androgen Receptor*)

ATAC-seq – *Assay for Transposase Accessible Chromatin using Sequencing*, em inglês

ATCC – *American Type Culture Collection*, em inglês

BasoE – *Basophilic Erythroblast*/Eritroblasto Basofílico

BPE – Extrato de Pituitária Bovina (*Bovine Pituitary Extract*, do inglês)

cDNA – DNA complementar

CFU-E – *Colony Forming Unit-Erythroid*/Unidade Formadora de Colônia Eritróide

CMP – *Commom Myeloid Progenitor*/ Progenitor Comum Mieloide

DHT – Di-hidrotestosterona

DMSO – Dimetilsulfóxido

EGF – Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*, do inglês)

EPO – Eritropoetina

FBS – Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*, do inglês)

HATS – Histonas Acetil Transferases

HBA – Hemoglobina α (Alpha)

HBB – Hemoglobina β (Beta)

HBD – Hemoglobina δ (Delta)

HBE – Hemoglobina ϵ ( psilon)

HBG – Hemoglobina γ (Gamma)

HBZ – Hemoglobina ζ (Zeta)

HSs – Sítios de Hipersensibilidade à DNase I (do inglês, *Hypersensitive Sites*)

HSC – *Hematopoietic Stem Cells*/Células Tronco Hematopoiéticas

LCR – *Locus Control Region*, em inglês

MCC – Coeficiente de Colocalização de Manders (*Manders Colocalization Coefficient*, do inglês)

MEP – *Megakaryocyte-Erythroid Progenitor*/ Progenitor Megacariocítico-Eritróide

MPP – *Multipotent Progenitor*/Progenitor Multipotente

MRL – Matriz Rica em Laminina

OrthoE – *Orthochromatic Erythroblast*/Eritroblasto Ortocromático

OrthoRet – *Orthochromatic Reticulocyte*/Reticulócito Ortocromático

PolyE – *Polychromatic Erythroblast*/Eritroblasto policromático

ProE1 – *Proerythroblast*/Proeritroblasto 1

ProE2 – *Proerythroblast*/Proeritroblasto 2

PSA – Antígeno Prostático Específico (do inglês, *Prostatic Apecific Antigen*)

R1881 – Methyltrienolona (Andrógeno Sintético)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

TSSs – Sítios de Início de Transcrição (*Transcription Start Sites*, do inglês)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
Organização e função das hemoglobinas em células eritróides	25
Cluster da α -globina	26
Cluster da β -globina	30
Ligação a fatores de transcrição	31
Família GATA	32
FOG1	33
KLF1	34
NF-E2	34
TAL1	34
Silenciadores e regulação gênica negativa	35
Regulação da eritropoese por hipóxia	35
Expressão de hemoglobinas em outros tecidos	36
Células epiteliais alveolares	36
Células neuronais	36
Hepatócitos	37
Células cervicovaginais	38
Células endometriais	39
Linhagens celulares transformadas por vírus	39
Células prostáticas	40
Regulação gênica X ruído	44
Próstata	45
Anatomia e histologia da próstata humana e de camundongos	45
Regulação androgênica na próstata normal	47
Câncer de próstata e regulação androgênica	48
Expressão de fatores de transcrição na próstata	48
Hipótese	49
OBJETIVOS	50

METODOLOGIA.....	51
Materiais utilizados	51
Linhagens celulares	51
Animais	52
Lise de hemácias	53
Ensaio funcionais em linhagens.....	54
Tratamento com andrógeno	54
Cultivo tridimensional em matriz rica em laminina.....	55
Cultivo bidimensional com matriz rica em laminina.....	57
Cultivo bidimensional com matriz rica em laminina solúvel.....	58
Análise de abundância de mRNAs por PCR.....	58
Extração de RNA total.....	58
Transcrição reversa.....	59
PCR.....	59
PCR quantitativo em tempo real	60
Análise de expressão protéica por Western blotting	62
Identificação e localização das hemoglobinas por imunofluorescência	62
Protocolo experimental.....	62
Captura de imagens e análises.....	64
Citometria de imagem.....	65
ATAC-seq	66
Tagmentação e indexação	68
Controle de qualidade e quantificação das amostras.....	69
Sequenciamento	69
Análise dos resultados	70
Comparação com dados de subpopulações eritróides.....	74
Predição de ligação a fatores de transcrição	75
Análises estatísticas	75

RESULTADOS	76
Presença de hemoglobinas em linhagens celulares de próstata humana	76
Regulação gênica de hemoglobinas em linhagem de próstata.....	86
Expressão gênica de fatores de transcrição	86
Testosterona e sinalização por receptor de andrógeno	88
Mapeamento da acessibilidade da cromatina	94
Sinalização da matriz extracelular	105
Hipóxia e sinalização por HIF-1 α	107
Atividade do promotor de HBG	108
Presença de hemoglobinas na próstata de camundongos	110
DISCUSSÃO	113
CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS	127
ANEXOS	132
ANEXO I – Parecer comitê de ética para uso de animais.....	132
ANEXO II – Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora	133

INTRODUÇÃO

Em nosso laboratório tivemos alguns resultados que indicaram a presença de hemoglobinas em células de próstata. Unindo essas observações com alguns dados da literatura, achamos que seria interessante verificar se realmente há expressão gênica e protéica de hemoglobinas na próstata, e qual seria a regulação por trás dessa expressão.

Organização e função das hemoglobinas em células eritróides

As hemoglobinas estão presentes nas hemácias, onde têm a importante função de transporte de oxigênio. Cada hemoglobina é formada por duas subunidades α e duas subunidades β , formando um tetrâmero ligado à quatro grupamentos heme (Figura 1), que são os verdadeiros responsáveis pela ligação ao oxigênio [1].

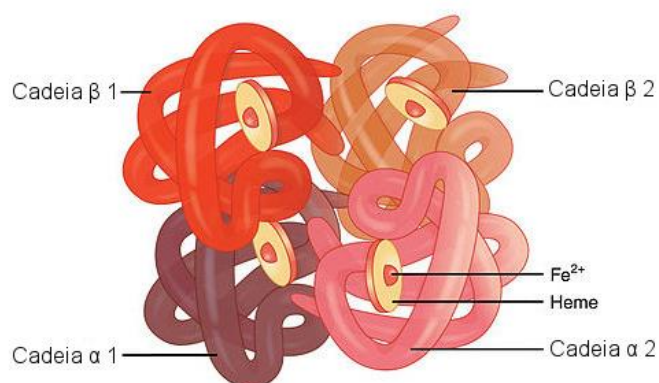


Figura 1: Imagem representativa da estrutura da hemoglobina, adaptada de Openstax College.

Os genes das hemoglobinas estão agrupados em clusters em cromossomos diferentes (Figura 2) e são regulados de formas distintas, porém há relação estequiométrica (1:1) entre as proteínas HBA e HBB, para que se juntem em dois pares para formar a hemoglobina.

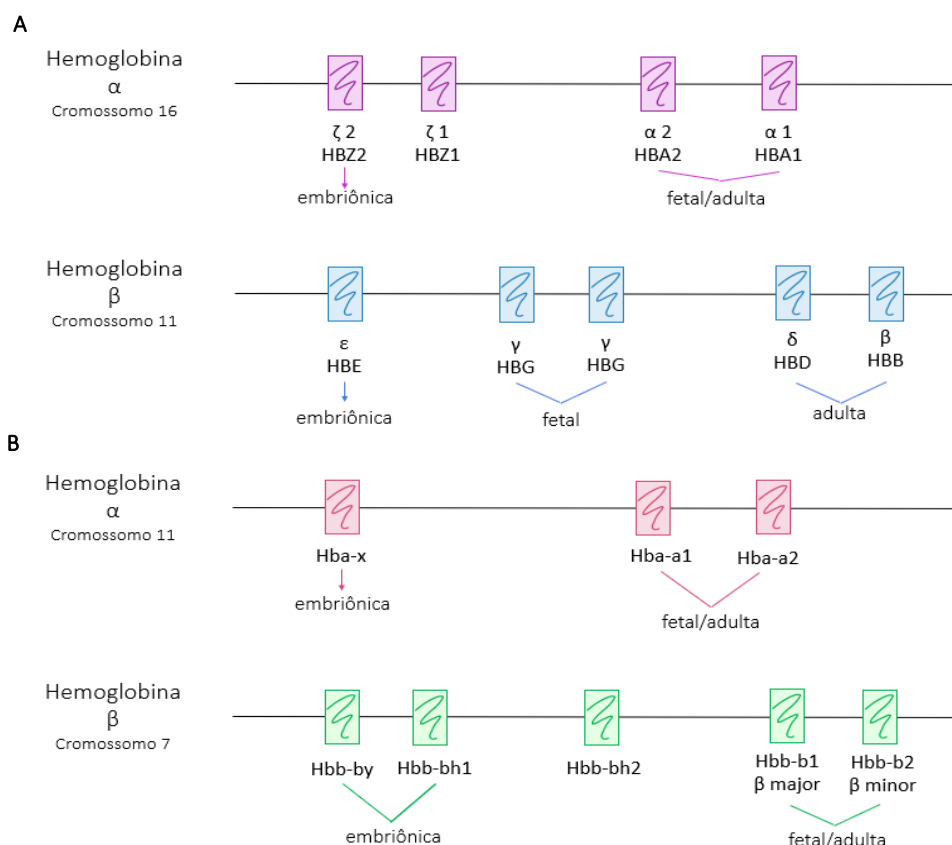


Figura 2: Representação gráfica da disposição dos genes dos clusters da α - e β -globinas em (A) humanos e em (B) camundongos.

Cluster da α -globina

O *cluster* da α -globina humana está próximo ao telômero do braço curto do cromossomo 16 [2]. Esse *cluster* é rico em G + C e apresenta ilhas CpG por toda sua extensão. Normalmente as ilhas CpG são deficientes em histonas H1 e apresentam histonas H3 e H4 hipermetiladas. Este *cluster* também apresenta segmentos de DNA livres de nucleossomos, o que confere ao *cluster* da α -globina a característica de cromatina “aberta”, mesmo em células que não expressam esses genes [3, 4].

O *cluster* da α -globina humana está adjacente a genes que são constitutivamente expressos (*C16orf35/NPRL3*) [5]. Os genes do *cluster* da α -globina são expressos de acordo com sua sequência no cromossomo, sendo que o gene ζ

(HBZ) é preferencialmente expresso em embriões, enquanto os genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (HBA1 e HBA2) são preferencialmente expressos em fetos e adultos, respectivamente (Figura 2A) [4].

O *cluster* da α -globina apresenta alguns reguladores distais, denominados sítios de hipersensibilidade à DNase I (HSs), por serem sensíveis à DNase I. Esses HSs podem estar constitutivamente presentes no *cluster* ou serem formados em tecidos específicos ou em fases específicas do desenvolvimento.

No caso do *cluster* da α -globina humana, os HS-40, HS-33 e HS-10 são específicos da linhagem eritróide [6]. É interessante notar que o HS-40, tido como o *enhancer* mais importante do *cluster* da α -globina, está situado em um íntron de um gene *upstream*, e que a presença desse *enhancer* não modifica a estrutura da cromatina ou a metilação do DNA localmente [3, 7] (Figura 3).

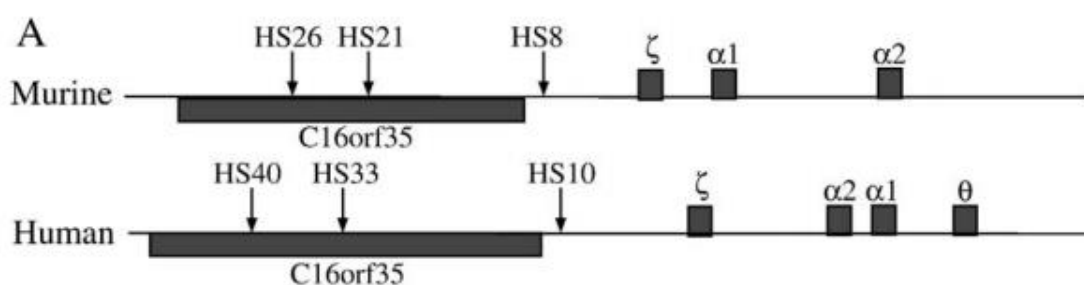


Figura 3: Comparação entre os *clusters* da α -globina humana e murina, extraída de Fu e colaboradores, 2005 [6].

O *cluster* da α -globina em camundongos é muito semelhante ao humano, apesar de se encontrar em região não telomérica do cromossomo 11 [8, 9]. Os genes que flanqueiam o *cluster* murino são homólogos aos genes que flanqueiam o *cluster* humano (Figura 3). O *cluster* da α -globina de camundongos também apresenta uma alta porcentagem de G+C [8]. Diferentemente do *cluster* humano, poucas ilhas CpG estão presentes no *cluster* da α -globina murina, apesar da presença de muitas ilhas CpG nos genes adjacentes ao *cluster*, sugerindo que essas ilhas não são importantes na regulação da α -globina desses animais [8].

Em camundongos, o HS correspondente ao HS-40 humano é o HS-26

[10]. O HS-26 também é específico de precursores eritróides, e também está presente em um íntron do gene denominado *C16orf35*, adjacente ao *cluster* da α -globina (Figura 3) [6, 11, 12]. Apesar da similaridade na sequência nucleotídica, o *enhancer* HS-26 não é tão forte quanto o HS-40 humano, sendo que sua deleção resulta em redução de apenas 50% da expressão de *Hba* [9]. Assim, outros elementos devem atuar na regulação do *cluster* da α -globina de camundongos. Outros HSs específicos da linhagem eritróide de camundongos são os HS-21 e HS-8, que equivalem aos HS-33 e HS-10 humanos, respectivamente (Figura 3) [6, 9, 11].

Em células de camundongos que expressam a α -globina há uma proximidade física entre os genes ativos do *cluster* do gene da α -globina, suas regiões regulatórias distais (HSs), os genes que flanqueiam o *cluster* e suas respectivas regiões promotoras. Isto ocorre devido a formação de várias estruturas em forma de laço, em conjunto denominadas “fábrica de transcrição”. Já em células cujos genes da α -globina estão inativos, essa “fábrica de transcrição” envolve apenas os genes adjacentes ao *cluster* da α -globina, mas não os genes do *cluster* propriamente ditos (Figura 4) [11].

Com relação à regulação da estrutura da cromatina durante o desenvolvimento, ela é muito semelhante entre humanos e camundongos. De acordo com Fu e colaboradores [6], em células progenitoras eritróides há uma leve abertura da cromatina do *cluster* da α -globina, principalmente devido à acetilação da histona H3 e metilação da lisina 4 da histona H3 nos HS-26, HS-21 e HS-8.

Já as células eritróides primitivas apresentam uma maior abertura da cromatina, devido à maior acetilação e metilação de histonas nos HSs e também nos genes da ζ e da α -globina. Porém, o gene ζ seria o único expresso nessas células, pois está mais próximo das regiões regulatórias.

Por fim, com o *switching* da hemoglobina embrionária para a fetal/adulta, há uma maior modificação de histonas nos genes da α -globina, tornando a cromatina mais aberta nesta região, enquanto há a desacetilação e desmetilação das histonas no gene da ζ -globina. Assim, a ζ -globina deixa de ser expressa e as α -globinas passam a ser expressas (Figura 5) [6].

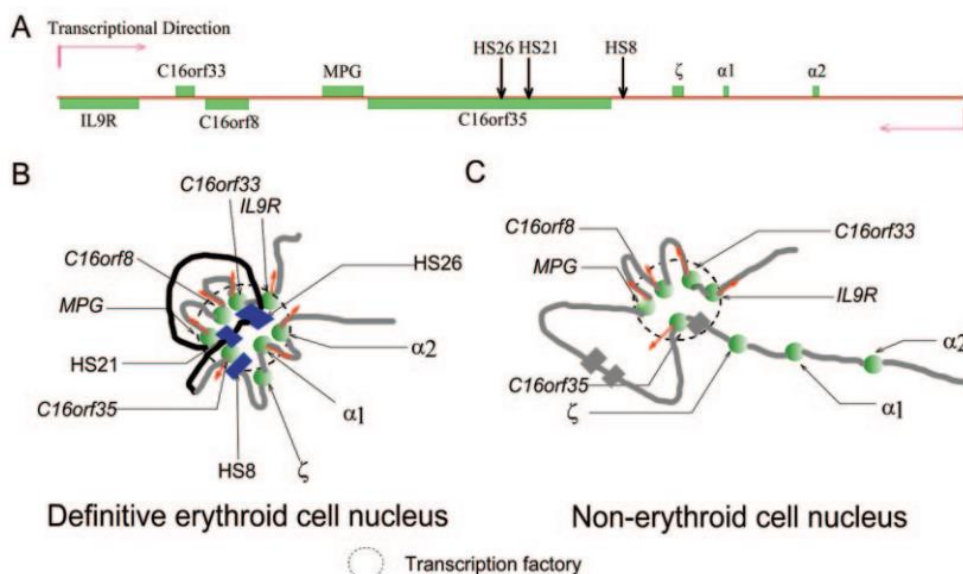


Figura 4: Representação da “fábrica de transcrição” do cluster que inclui o gene da α -globina murina. (A) cluster da α -globina murina representado de forma linear; **(B)** “fábrica de transcrição” de células eritróides de camundongos, nos quais o cluster da α -globina está ativo e **(C)** “fábrica de transcrição” em células não-eritróides de camundongos, cujo cluster da α -globina está inativo. Imagem extraída de Zhou e colaboradores, 2006 [11].

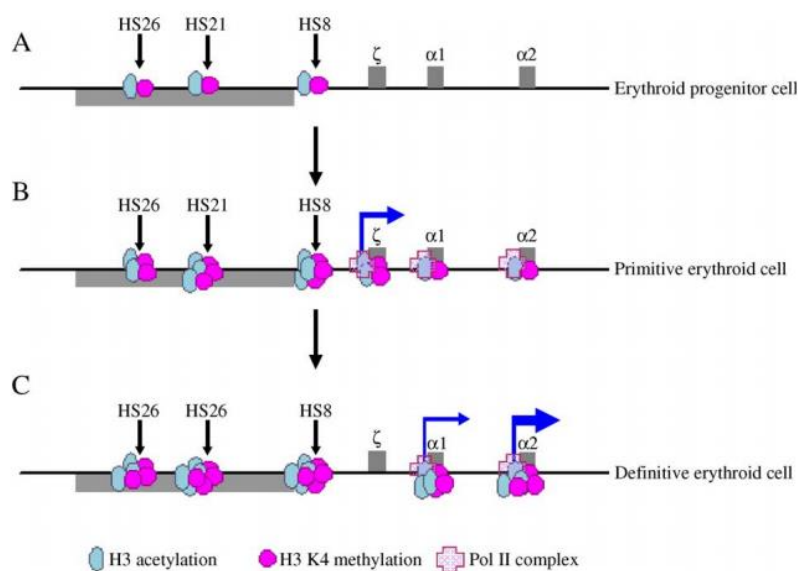


Figura 5: Representação das modificações covalentes pós traducionais de histonas no cluster da α -globina de camundongos. (A) células progenitoras eritróides, **(B)** células eritróides primitivas e **(C)** células eritróides definitivas. A regulação das histonas nestes

sítios em camundongos e em humanos é muito semelhante. Imagem extraída de Fu e colaboradores, 2005 [6].

Cluster da β -globina

O *cluster* humano da β -globina, por sua vez, está presente no cromossomo 11, e apresenta uma estrutura diferente do *cluster* da α -globina. Ele é rico em A + T e não possui ilhas CpG em sua extensão [4]. O *cluster* da β -globina, tanto em humanos quanto em camundongos, está flanqueado por genes codificadores de receptores olfativos nas porções 5' e 3', e esses genes não são expressos em células eritróides [13].

Os HSs também estão presentes no *cluster* da β -globina, sendo que os principais HSs são numerados de 1 a 5. Todos os HSs humanos apresentam correspondentes em camundongos, e a organização do *cluster* da β -globina é muito semelhante entre os dois organismos (Figura 6). A formação dos HSs precede a ativação dos genes do locus, e eles se situam em uma região denominada *Locus Control Region* (LCR) (Figura 6, caixa amarela) [4, 14]. O LCR confere especificidade da expressão dos genes do *cluster* da β -globina à linhagem eritróide [15].

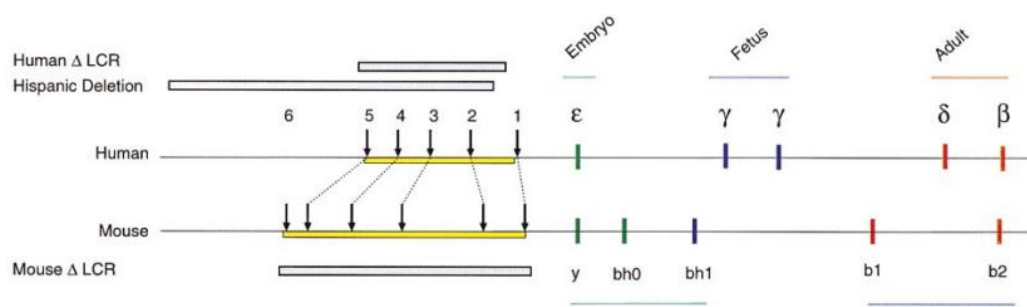


Figura 6: Representação do cluster da β -globina humana e murina. As caixas amarelas representam o LCR. As setas pretas enumeradas representam os HSs. Imagem extraída de Higgs e colaboradores, 1998 [14].

É provável que o LCR interaja com um gene das globinas de cada vez, sendo que o tempo em que o LCR passa em associação com cada gene irá definir a

proteína prevalente no citoplasma da célula. A expressão dos genes da β -globina depende da ordem dos genes e, conseqüentemente, da distância relativa em que se encontram do LCR [5].

A presença do LCR é essencial, já que os HSs, quando individualizados ou desordenados, nunca chegam ao nível de atividade de um LCR intacto [5]. Em humanos cujo *cluster* encontra-se mutado e o LCR está ausente ou inativo, a transcrição do gene da β -globina cai para 1% [16]. Em camundongos, a falta de regulação pelo LCR não resulta em inativação tão forte, mas a expressão desses genes é também menor do que nos camundongos selvagens [17]. É interessante notar que, em camundongos, o LCR não é importante para a sensibilidade do *cluster* à DNase I, para o remodelamento da cromatina ou para a hiperacetilação de histonas no promotor da β -globina, embora funcione como um *enhancer* e participe do processo de transcrição dos genes do *cluster* [16, 17].

Ligação a fatores de transcrição

Os fatores de transcrição desempenham um papel importante na regulação dos genes das hemoglobinas, sendo que eles podem se ligar tanto aos reguladores distais já descritos quanto aos reguladores proximais, na região imediatamente *upstream* ao ponto inicial da transcrição dos genes. Portanto, a expressão destes genes depende do *pool* de fatores de transcrição presentes nas células [4, 5].

A ligação aos promotores distais, no caso do *cluster* da β -globina, leva ao aparecimento dos HSs [13]. Ligados ao LCR do *cluster*, são capazes também de recrutar histonas acetiltransferases (HATs), de modo que há uma maior acetilação de histonas nessas regiões regulatórias e nos próprios genes do *cluster* (Figura 7) [18]. Essa acetilação de histonas confere estrutura mais aberta à cromatina desta região nas células eritróides, onde estes genes são expressos [4].

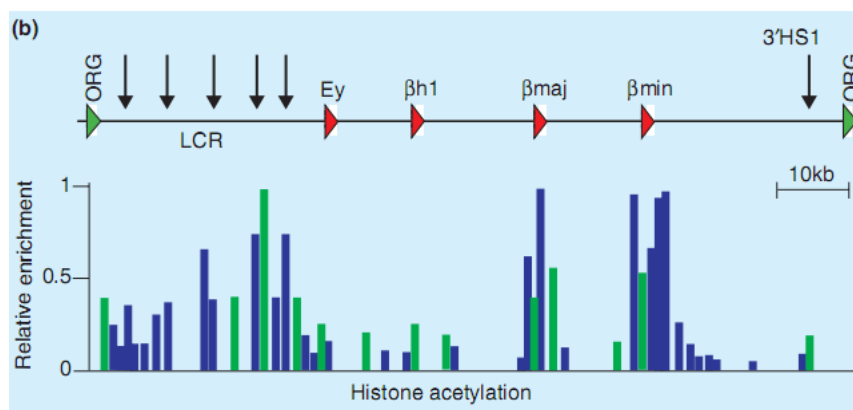


Figura 7: Representação do cluster da β -globina murina com indicações das variações nos níveis de acetilação de histonas. A imagem foi extraída de Bulger e colaboradores, 2002 [18]. As barras dos gráficos indicam os níveis de acetilação da histona H3 em dois estudos independentes: Schubeler et al, em verde, [19] e Forsberg et al, em azul [20].

A seguir os fatores de transcrição mais relevantes para a diferenciação eritróide e expressão de hemoglobinas nessas células serão discutidos.

Família GATA

Dentre os fatores de transcrição eritróide-específicos mais importantes estão os da família GATA, mais especificamente GATA1 e GATA2. Eles são expressos no sistema hematopoiético, tanto em células eritróides primitivas quanto definitivas [21]. GATA3, outro membro da família relacionado ao desenvolvimento hematopoiético, tem sua expressão restrita a células T [22].

GATA1 e GATA2 são capazes de se ligar em múltiplas regiões regulatórias dos clusters da α e β globinas [21], porém o cluster da β globina apresenta mais sítios de ligação a GATA em comparação ao cluster da α globina [23]. Inclusive a expressão dos genes do cluster α não varia de acordo com variações na quantidade de proteínas da família GATA [23].

GATA1 e GATA2 apresentam diferentes níveis de expressão ao longo da diferenciação eritróide (Figura 8), sendo que GATA2 é expresso em estágios iniciais da diferenciação, enquanto GATA1 só é expresso com a maturação das células eritróides [23]. De fato, em células comprometidas porém indiferenciadas, GATA2

liga-se ao locus da β globina e ativa baixos níveis de expressão do gene apropriado. Somente depois o fator de transcrição GATA1 o substitui e induz a expressão de hemoglobinas [24]. Nesse caso GATA1 utiliza FOG1, outro fator de transcrição eritróide específico, para retirar GATA2 da cromatina [25]. GATA1 e FOG1 interagem para formar o *loop* entre LCR e os promotores proximais do cluster da β globina, sendo críticos para a expressão correta das hemoglobinas desse cluster [24].

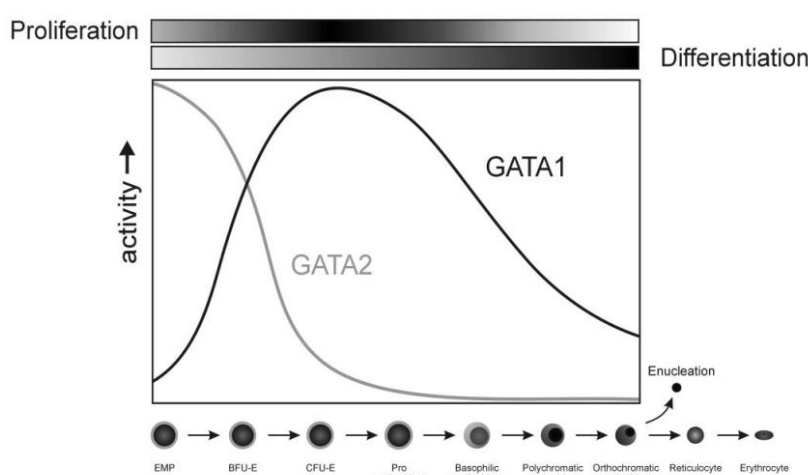


Figura 8: Atividade de GATA1 e GATA2 durante a diferenciação eritróide. Imagem retirada de Ferreira e colaboradores, 2005 [21].

É importante ressaltar que a expressão de genes da família GATA nem sempre estão relacionados à ativação gênica. No caso da *HBE*, o silenciador presente entre regiões -300 e -250pb tem sítios de ligação a GATA-1, sendo que esse fator de transcrição é capaz de reprimir a expressão de *HBE in vivo* [26].

FOG1

FOG1 é um fator de transcrição que não se liga diretamente ao DNA [22]. Sua expressão é induzida por GATA1 em linhagens eritróides e megacariocíticas. FOG1 interage com GATA1 para causar ativação ou inativação de alguns genes [21]. FOG1 facilita a ligação de GATA1 ao DNA e sem a interação com FOG1, GATA1 não consegue exercer sua função [22, 25].

KLF1

KLF1, também conhecido como EKLF, é um fator de transcrição exclusivamente expresso em células eritróides [27]. Em camundongos ele é capaz de se ligar ao promotor de Hbb-b1, ao LCR do cluster da β globina e às regiões regulatórias proximais e distais do cluster da α globina [28].

Apesar de se ligar em ambos os clusters, KLF1 só é essencial para o *switching* dos genes do cluster da β globina. Em camundongos, a deleção de KLF1 resultou no bloqueio de expressão dos genes adultos do cluster β , enquanto os genes do cluster α continuaram sendo expressos corretamente, de acordo com as fases do desenvolvimento, devido à ligação de outros fatores na posição do KLF1 [27]. KLF1 tem um papel importante no remodelamento da cromatina, formação dos HSs no LCR e coordenação da conformação tridimensional do locus da β globina [24, 27].

NF-E2

O fator de transcrição NF-E2 reconhece regiões promotoras dos clusters da α e β globinas, inclusive o promotor distal da α globina [29, 30]. O LCR da β -globina também apresenta sítios de ligação a esse fator, sendo que a atividade do LCR depende da integridade desses sítios [16, 30].

NF-E2 é um heterodímero composto pelas seguintes subunidades: p18, expressa na maioria dos tecidos, e p45, praticamente restrita às células hematopoiéticas, como eritrócitos, megacariócitos e mastócitos [29]. Mesmo que as células hematopoiéticas sejam um dos poucos subtipos celulares que expressam a subunidade p45, os níveis de expressão dessa subunidade não se alteram ao longo da diferenciação eritróide, sendo que elas precisam colocalizar-se nas regiões de heterocromatina para serem funcionais e poderem ativar os genes da β -globina [30].

TAL1

TAL1, também conhecido como SCL, é expresso em eritrócitos, megacariócitos e mastócitos, assim como GATA1 e a subunidade p45 de NF-E2. TAL1 é capaz de formar um complexo que interage com GATA1. A região promotora

distal do cluster da α globina contém sítios de ligação a esse fator de transcrição [22].

Silenciadores e regulação gênica negativa

Muito se estuda a respeito da regulação positiva de genes, com a definição de diversos *enhancers* e promotores específicos para cada tecido/gene. Apenas muito recentemente alguns cientistas viram a necessidade de tentar localizar silenciadores gênicos de maneira sistemática. De maneira sintética, esses autores descobriram que, assim como os *enhancers*, os silenciadores também se encontram, em sua maioria, em regiões promotoras, íntrons e regiões intergênicas; e eles parecem ser tecido específicos, apesar de alguns poucos silenciadores serem mais gerais [31].

Antes desse estudo sistemático acerca dos silenciadores, um artigo tentou verificar possíveis reguladores negativos das hemoglobinas embriônica (*HBZ* e *HBE*). As regiões encontradas se localizavam entre -300 e -112 no promotor proximal de *HBZ* e entre -400 e -368 no promotor proximal de *HBE*. Apesar de ambas serem hemoglobinas embriônicas, não foi encontrada homologia entre as regiões de regulação negativa desses dois genes [32]. Mesmo que os promotores dos genes das hemoglobinas sejam regulados pelos mesmos fatores de transcrição, isso parece não ocorrer no caso dos silenciadores desses genes.

Regulação da eritropoese por hipóxia

Além da regulação das hemoglobinas em condições fisiológicas, esses genes podem ser ativados também em situação de hipóxia. Nesse caso não há ativação somente dos próprios genes das hemoglobinas, mas de toda a sinalização de eritropoese, num processo que envolve diversos órgãos.

Os fatores de transcrição da família HIF são os principais iniciadores dessa sinalização. Esses fatores são constitutivamente expressos e constantemente produzidos pelas células eritróides, mas são degradados rapidamente na presença de oxigênio e ferro. Quando as células são submetidas à hipóxia, a degradação proteossomal de HIF-1 α é minimizada e, portanto, essa proteína acumula-se e consegue dimerizar-se com HIF-1 β no núcleo. Assim ela pode exercer seu papel de

fator de transcrição, ligando-se a genes responsivos à hipóxia [22].

Um desses genes é o da eritropoetina (EPO), que, em nível de organismo, é produzida principalmente pelo fígado e pelo rim. Quando sai de seus órgão de origem, a EPO atua principalmente na promoção da sobrevivência de precursores eritróides, sendo que o aumento de sua expressão leva ao aumento a quantidade de células precursoras que passam pelo processo de diferenciação eritróide e, fundamentalmente, à ativação da regulação das hemoglobinas nessas células [33, 34].

Expressão de hemoglobinas em outros tecidos

Como foi visto até aqui, a regulação das hemoglobinas é muito bem conhecida no contexto das células eritróides, onde essas proteínas exercem uma função bem definida. Porém, ao longo dos anos muitas evidências foram acumuladas de que esse não é o único local onde esses genes/proteínas são expressos [35].

Células epiteliais alveolares

Nessas células, a hipóxia induz inicialmente o aumento de quantidade da proteína HIF-1 α , e períodos mais longos de hipóxia induzem o aumento da proteína HIF-2 α . O aumento na quantidade dessas proteínas, por sua vez, leva ao aumento da expressão dos fatores de transcrição eritróide específicos GATA1, GATA2, NF-E2, KLF1 e CP2. Por fim, tanto o mRNA quanto a proteína de HBA e HBB são expressos nas células epiteliais alveolares [36]. Apesar de não se saber a função da expressão dessas proteínas nesse tecido, os autores do artigo indicam como possibilidade a proteção ao estresse oxidativo.

Células neuronais

As células neuronais normalmente expressam a neuroglobina que, apesar de fazer parte da família das globinas, apresenta menos de 25% de similaridade de sequência de aminoácidos que as hemoglobinas. Elas também expressam EPO e são capazes de responder a ela, sendo que essa sinalização tem função neuroprotetora [37].

Transcritos de hemoglobinas foram encontrados em neurônios dopaminérgicos, astrócitos corticais e hipocampus e todos os oligodendrócitos maduros do cérebro de camundongos [35]. Em células de glioblastoma em condições de normóxia, os transcritos de hemoglobinas também foram descritos, sendo que *HBE* é a predominante [38].

As proteínas HBA e HBB também estão presentes em culturas primárias de neurônios de roedores, sendo que elas apresentam sinais mais fortes em dendritos e axônios. Nessas culturas, a hipóxia leva à expressão de EPO que, por sua vez, induz a expressão de hemoglobinas [37]. Vale lembrar que, diferentemente da regulação da eritropoese por hipóxia, a EPO é produzida e atua no mesmo órgão que sofre hipóxia, e que não há eritropoese, somente expressão de hemoglobinas.

Nas células de glioblastoma, a hipóxia também tem um papel importante na indução da expressão de transcritos de hemoglobinas. A *HBE*, que tinha expressão predominante na normóxia, tem expressão reduzida com 48h de hipóxia, sendo que as hemoglobinas predominantes nesse caso são *HBA* e *HBG*. De toda forma, todos os transcritos são encontrados nessas células durante a hipóxia, na ordem decrescente de expressão: *HBA*, *HBG*, *HBD*, *HBE*, *HBB* e *HBZ*. Como em outros estudos, as células de glioblastoma também apresentaram aumento na expressão de transcritos de *EPO* e de seu receptor [38], reforçando a importância dessa via no cérebro.

Nas culturas primárias de neurônios de roedores há também o aumento de ALAS, uma enzima importante para a síntese de heme, o que leva à conjectura de que as hemoglobinas produzidas estejam formando tetrâmeros funcionais [37]. Outros estudos já haviam demonstrado a formação de tetrâmeros $\alpha\beta_2$ após a superexpressão de hemoglobinas em neurônios dopaminérgicos [35], de forma que é possível que essa proteína seja funcional nesse tecido.

Hepatócitos

HBA e HBB livres foram encontradas no soro de pacientes com esteatohepatite não alcoólica, em comparação com o grupo controle; além de serem

encontradas também em biópsias desses pacientes, no citoplasma das células hepáticas. Isso demonstra que as hemoglobinas produzidas não precisam necessariamente formar tetrâmeros. Nesses pacientes, o fator de transcrição GATA1 não está aumentado, de modo que outros fatores podem ser responsáveis expressão de hemoglobinas. Os mesmos pesquisadores verificaram então a presença de hemoglobinas em células de linhagem hepática HepG2, e reportaram que os transcritos de *HBA* são 17 vezes mais expressos que os transcritos de *HBB* [35].

Células cervicovaginais

Análises de *microarray* demonstraram a expressão aumentada de *HBA1* e *HBB* em células de câncer cervical em comparação com células saudáveis. Interessantemente essas foram as únicas hemoglobinas alteradas, sendo que também não houve aumento da expressão dos fatores de transcrição eritróide específicos *NF-E2*, *KLF1*, *TAL1* e *GATA1*. Em biópsias de pacientes, foi possível observar que tanto a proteína HBA1 quanto a HBB se encontram difusas no citoplasma das células tumorais [39].

Em células de linhagem de câncer cervical humanas, *HBA1* é aproximadamente 10x mais expresso que *HBB*. Essas proteínas também se localizam no citoplasma, sendo que em termos quantitativos, a quantidade de hemoglobinas presentes nessas células é menor que a quantidade encontrada em células do sangue. Apesar de ambas proteínas estarem presentes, há pouca formação de heterodímeros HBA1/HBB [39].

Interessantemente, o tratamento com H_2O_2 aumenta a expressão do mRNA e das proteínas HBA1 e HBB, sendo que esse aumento é tempo e dose dependente e não depende da expressão de *GATA1* ou *KLF1*. A hiperexpressão dessas proteínas em conjunto (ou somente da HBA1) leva à supressão da produção de H_2O_2 , ânion superóxido e ROS endógenos. Isso aumenta a viabilidade das células quando elas são tratadas com H_2O_2 , sendo que células que não hiperexpressam essas proteínas têm maior ativação de caspase-3 e, consequentemente, maior morte por apoptose. O fato de a hiperexpressão de HBA1 somente também resultar nessas alterações leva à suposição de que ela esteja

atuando em monômeros ou homodímeros. Ainda mais interessante, as alterações na produção de ROS e de viabilidade celular dependem da ligação das proteínas ao grupamento heme [39].

Outro grupo demonstrou que células epiteliais vaginais apresentam uma expressão basal de HBA e HBB, que aumenta com a indução por H₂O₂ através do fator de transcrição NFE2L2. Interessantemente a indução por H₂O₂ é capaz de aumentar mais os níveis de HBB do que HBA, demonstrando mecanismos de regulação diferentes entre esses genes [40]. Novamente, apesar de não se saber a função da expressão de HBA ou HBB nesse tecido, os autores do artigo indicam como possibilidade a proteção ao stress oxidativo. Mesmo porque uma das funções conhecidas de NFE2L2 é a ativação de genes relacionados à proteção ao stress oxidativo [41].

Células endometriais

Transcritos de hemoglobinas foram encontrados no endométrio humano em todas as fases do ciclo menstrual, sendo que essa expressão é estável, ou seja, não varia de acordo com o ciclo. De todas as hemoglobinas identificadas, *HBA* e *HBB* são as mais expressas, e essa expressão não foi alterada pela sinalização do hormônio estradiol [42].

O anticorpo utilizado por esse trabalho, que reconhece todas as hemoglobinas dos dois clusters, identificou que essas proteínas estão presentes em maior quantidade em células epiteliais do endométrio, mas também se encontram nas células estromais e endoteliais. O grupo acredita que a presença dessas proteínas no endométrio está relacionada à regulação do ferro e heme locais, protegendo as células dos efeitos nocivos do excesso desses compostos [42].

Linhagens celulares transformadas por vírus

Além de células de humanos e roedores expressarem os transcritos e/ou proteínas dos *clusters* das hemoglobinas, há descrição na literatura de linhagens não eritróides que apresentam a expressão de hemoglobinas do *cluster* α devido ao vírus utilizado para realizar a imortalização [43].

A infecção de células com o vírus da herpes simples (HSV, do inglês *Herpes Simplex Virus*) leva ao aumento da expressão dos transcritos de *HBA2* e *HBA1* (*cluster α*), mas não dos transcritos de *HBZ* (*cluster α*) ou *HBB* (*cluster β*). Interessantemente, esse aumento de expressão foi inibido quando a síntese de proteínas virais foi inibida, demonstrando uma relação direta entre os dois acontecimentos.

A indução de expressão dessas hemoglobinas foi relacionada às proteínas virais ICP0 e ICP4, sendo que ICP4 é considerada a mais potente. Apesar de os pesquisadores acreditarem que a diferença de acessibilidade entre os dois *clusters* possa ser uma das causas para a expressão de *HBA2* e *HBA1*, a falta de expressão de *HBZ*, presente no mesmo *locus*, contradiz esse pensamento. Dessa forma, uma outra sugestão seria que essas proteínas fossem capazes de contornar os mecanismos de silenciamento dos genes em questão, já que ICP4 é um equivalente funcional da proteína humana SP1, que é suficiente para induzir a expressão gênica.

Interessantemente, a proteína E1a, uma proteína equivalente à ICP4 presente nos adenovírus por ser importante para a expressão dos genes virais, está relacionada à expressão de *HBB*, mas não de *HBA*, em linhagens transfectadas [43].

Células prostáticas

Até o momento, em roedores, a expressão de hemoglobinas está descrita somente na próstata de recém-nascidos. *Hba* é expressa na próstata até aproximadamente o terceiro mês após o nascimento, enquanto *Hbb* é expressa somente até o 10º dia pós-nascimento [44].

Apesar disso, a atividade do promotor da HBG, um dos genes presentes no cluster da β -globina humana, também já foi reportada na próstata de camundongos. Perez-Stable e colaboradores fizeram uma construção contendo aproximadamente 1000 nucleotídeos do promotor proximal da HBG humana fusionado à região codificadora do Antígeno T (Figura 9) para estudar os mecanismos do *switching* de hemoglobina fetal para a adulta em eritrócitos e, surpreendentemente, encontraram atividade do promotor/expressão do Antígeno T na próstata dos camundongos [45].

atividade na linhagem DU145 [46], e os respectivos sítios de ligação a fatores de transcrição [49, 50].

POU2F1, também conhecido como Oct1, é um fator de transcrição expresso amplamente expresso, que não controla nenhum órgão ou sistema específico [51]. Apesar de não ser específico, POU2F1 tem um papel importante em eritrócitos adultos, onde, em conjunto com GATA1, faz parte de um complexo repressor que silencia a expressão de HBG [52]. O fator de transcrição c-Myb tem um papel importante no desenvolvimento hematopoiético, com maior expressão em células hematopoiéticas imaturas e menor expressão em células diferenciadas [53]. Seu papel mais importante está na transição da eritropoiese fetal para a adulta. O *knockdown* de c-Myb em eritrócitos progenitores adultos resultou num aumento dramático na produção de HBG [53, 54]. A função dos outros fatores de transcrição já foi descrita anteriormente.

Além dos resultados da literatura demonstrando a expressão de hemoglobinas em diversos tecidos não eritróides, incluindo a próstata, resultados preliminares de nosso laboratório demonstraram um aumento na expressão de hemoglobinas na próstata de camundongos e ratos adultos, quando submetidos a determinadas condições.

Dados de RNAseq demonstraram um aumento na expressão de *Hba* e *Hbb* na próstata de camundongos alimentados com dietas normolipídicas (7% gordura) rica em gordura saturada (gordura de porco) por 32 semanas em comparação com camundongos alimentados com dieta rica em óleo de linhaça ou óleo de soja. A variação da expressão de cada uma das globinas estudadas (β *major* e β *minor*, β , $\alpha 1$ e $\alpha 2$) foi estequiométrica (em nível de mRNA) em cada camundongo analisado, demonstrando uma possível associação entre os elementos de regulação da expressão desses genes (D. Ferrucci, comunicação pessoal)

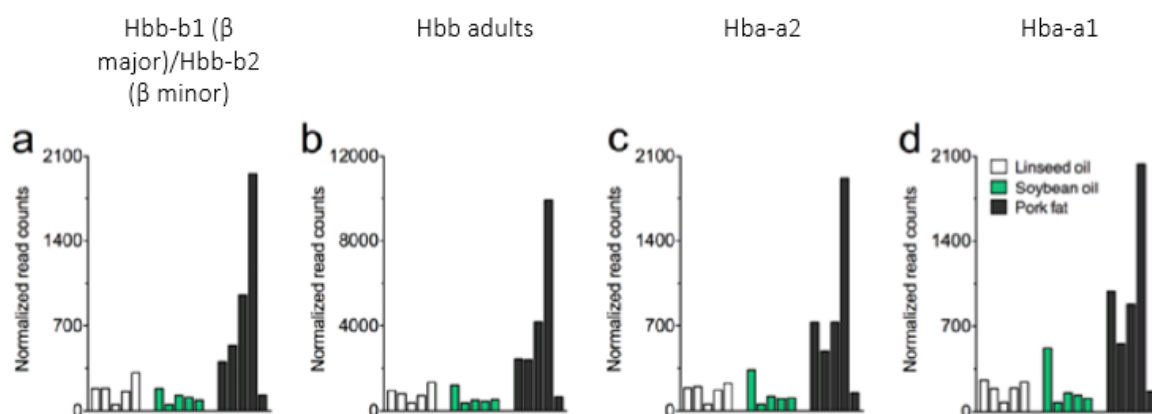


Figura 11: Expressão de hemoglobinas na próstata de camundongos diferencialmente alimentados. Variação no número de *reads* de diferentes hemoglobinas, obtidos através de RNAseq realizado com a próstata ventral de camundongos alimentados com óleo de linhaça (representados por barras brancas), óleo de soja (representados por barras verdes) ou gordura de porco (representados por barras cinza).

Além disso, uma análise feita por *Western blotting* identificou a proteína HBA na próstata de animais adultos após a castração (Rosa-Ribeiro, comunicação pessoal; Figura 12). O fato de a banda da hemoglobina (16kDa) aparecer entre os marcadores de 70kDa e 55kDa é um indicativo de que essa proteína estaria organizada em tetrâmeros (64kDa).

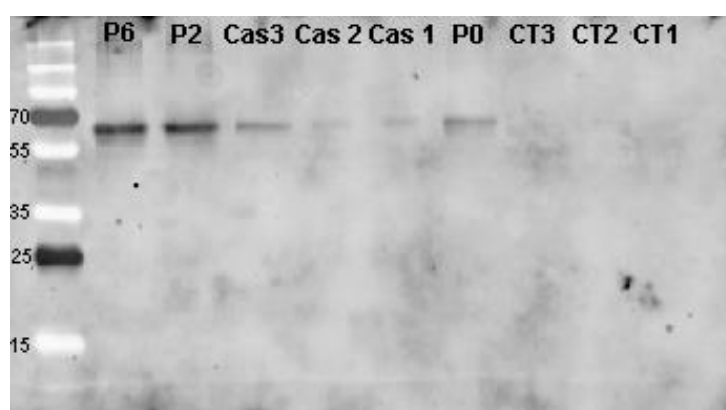


Figura 12: Identificação da α -globina na próstata de ratos. As indicações são animais neonatos com 6 (P6), 2 (P2) e 0 (P0) dias de vida, animais 3 dias após a castração (Cas3, Cas 2 e Cas1) e animais controle não castrados (CT3, CT2 e CT1).

Regulação gênica X ruído

Apesar de muito ter sido falado a respeito dos mecanismos de regulação gênica específicos das hemoglobinas, é importante ressaltar outro mecanismo fisiológico relacionado à transcrição de genes: o ruído. Esse é um mecanismo muito interessante conservado ao longo da evolução dos organismos, principalmente os unicelulares, pois enquanto a regulação gênica permite que as células respondam a mudanças ambientais de forma focada, no denominado “ruído” as células não estão propriamente adaptadas a condições normais, mas estão preparadas para responder rapidamente e sobreviver a condições de stress [55].

O ruído transcricional é definido pela sequência promotora dos genes, e esse ruído pode ser propagado da seguinte forma: a expressão e ligação/desligamento de fatores de transcrição nas regiões promotoras podem causar flutuações gênicas, que são propagadas para os genes alvo. Esse é um efeito colateral da regulação gênica, sendo que quanto mais mecanismos de regulação determinado gene tem, mais ruidosa tende a ser sua expressão [55]. Inclusive, genes co-regulados tendem a mostrar flutuações de expressão correlacionadas [55]. Se a expressão de um regulador *upstream* é ruidosa, sua variabilidade será transmitida para todos os alvos *downstream* [56].

Quando há uma quantidade limitada de fatores de transcrição disponível, a arquitetura do promotor determina os níveis expressão e ruído, ou seja, esses níveis dependem da velocidade em que um promotor sai da posição inativa para a ativa com a ligação dos fatores de transcrição e a subsequente ligação da RNA polimerase II [57]. É claro que a ligação da RNA polimerase II está intrinsicamente ligada à quantidade de RNA polimerase II disponível, que também pode variar de célula para célula [58].

Já quando há abundância de fatores de transcrição disponíveis, a maioria dos promotores está ocupada por eles, então os níveis de expressão gênica dependem somente da eficiência da transcrição/tradução [57]. Por sua vez, esse mecanismo pode variar de acordo com a quantidade de proteínas repressoras disponíveis [58] e da sequência do promotor [59]. Genes que estão associados a promotores que empregam o reinício da transcrição tem produção mais rápida de

grande quantidade de transcritos, pois o complexo de transcrição estabilizado continua no promotor, sem a necessidade de que ele precise ser remontado a cada rodada de transcrição [59].

Próstata

Como esse estudo foca na próstata, é importante ressaltar alguns dos aspectos principais de sua morfofisiologia e sinalização celular. De modo geral, a próstata é um órgão glandular cuja principal função é aumentar a fertilidade através da secreção de compostos como zinco, citrato, glicose, fosfatases, poliaminas e PSA, que protegem os espermatozoides durante a passagem pelos sistemas reprodutores masculino e feminino [60].

Anatomia e histologia da próstata humana e de camundongos

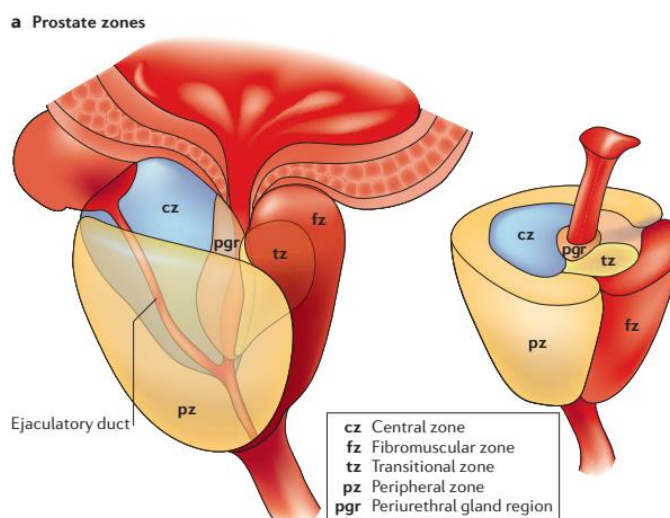


Figura 13: Representação gráfica da anatomia da próstata humana dividida em zonas: a central, a de transição e a periférica. Imagem retirada de Verze e colaboradores[60].

A próstata fica posicionada ao redor da uretra, próxima à bexiga, sendo que a próstata de humanos e roedores apresenta diferenças anatômicas importantes. A próstata humana é dividida em três zonas: a central, a de transição e a periférica (Figura 13) [60]. Já a próstata de roedores é composta por quatro lóbulos

diferentes: ventral, anterior, dorsal e lateral. Os dois últimos lóbulos podem ser agrupados e nomeados como dorso-lateral [44] (Figura 14).

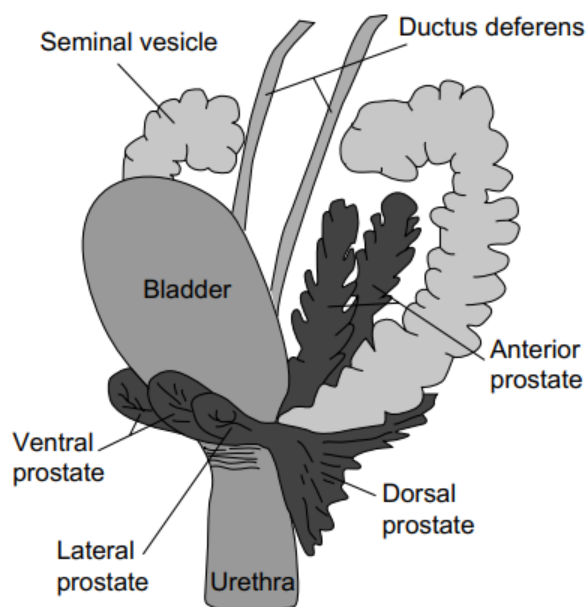


Figura 14: Representação gráfica do trato geniturinário de camundongos adultos, com foco nos quatro lóbulos que compõe a próstata: ventral, anterior, dorsal e lateral. Imagem retirada de Abbott e colaboradores [44].

Histologicamente, a próstata é composta por vários tipos celulares (Figura 15). O epitélio é formado por duas camadas: a camada de células secretoras, mais próximas ao lúmen; e uma camada descontínua composta por células basais (p63⁺ [61]) e células neuroendócrinas, que ficam mais próximas da lâmina basal. Abaixo da lâmina basal se encontra o estroma fibromuscular [60].

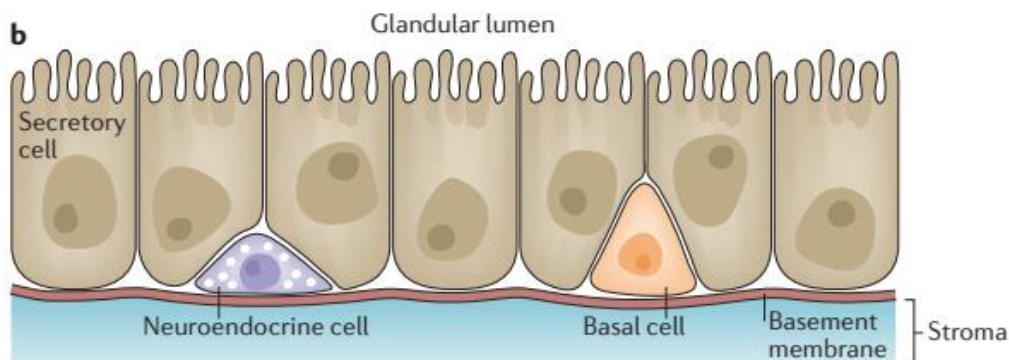


Figura 15: Representação gráica dos tipos celulares que compões a prstata. Imagem retirada de Verze e colaboradores [60].

Regulaço androgênica na prstata normal

A prstata é um exemplo clássico de órgão regulado por hormônio, sendo que o Receptor de Andrôgeno (AR) tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento normal da prstata [62].

O AR é uma proteína que funciona como fator de transcriço quando ligada a andrógenos como a testosterona ou a diidrotestosterona (DHT). A testosterona é, em grande parte, produzida pelos testículos, e é convertida em DHT pela enzima 5 α -redutase, presente na maioria das células da prstata e tecidos genitais. Apesar de conseguir ligar-se em ambas, o AR apresenta maior afinidade à DHT do que à testosterona [62].

Sem a presença dos ligantes, AR se localiza preferencialmente no citoplasma das células, onde se associa com diversas proteínas. Na presença de testosterona ou de DHT o AR dimeriza-se e é translocado para o núcleo, onde é capaz de se ligar a sequências de DNA específicas denominadas “Elementos Responsivos a Andrôgenos” (AREs) e induzir a expressão de genes [62].

A privação androgênica, então, causa a involução da prstata, sendo que ela pode chegar a perder até 80% de seu peso inicial [63]. Essa involução pode ocorrer por diversos mecanismos, sendo os principais que envolvem as células

epiteliais da próstata a apoptose, com um pico de após 3 dias de castração [64]; e descamação, no qual a camada de células epiteliais da próstata se destaca da lâmina basal [65].

Câncer de próstata e regulação androgênica

Assim como as células normais da próstata, as células tumorais da próstata também dependem da sinalização do AR. No adenocarcinoma de próstata, uma série de alterações celulares e moleculares resultam em células luminais nas quais o AR passa a regular a proliferação celular em vez de regular a diferenciação, como acontece em células não transformadas [66]. Dessa forma, um dos meios de tratamento de câncer de próstata responsivos a hormônio é a castração cirúrgica ou química, que interromperia a sinalização do AR, levando à involução do tumor. A privação androgênica é, inclusive, a terapia mais efetiva contra o câncer de próstata metastático responsivo a hormônio [66].

Infelizmente, com a privação androgênica há o surgimento do câncer refratário a hormônio, ou seja, aquele que não responde a variações nos níveis androgênicos. Nesse caso, as células tumorais da próstata são capazes de manter a sinalização do AR por mecanismos independentes à disponibilidade de testosterona/DHT [66].

Expressão de fatores de transcrição na próstata

Além de serem importantes para as linhagens hematopoiéticas, a expressão de GATA2 e GATA3 também é predominante na próstata. Esses fatores podem ser detectados na próstata de camundongos neonatos, fetos ou adultos, porém sua expressão diminui em tumores de próstata [67]. Interessantemente o gene do PSA apresenta sítios funcionais de ligação a GATA, que podem modular a expressão desse gene em conjunto com o receptor de andrógeno [67]. A expressão de GATA2 na próstata não varia após a castração, demonstrando que sua expressão é independente de AR [68].

Hipótese

Considerando que há atividade do promotor da HBG na próstata de animais adultos e em algumas linhagens epiteliais prostáticas na próstata de animais alimentados com dieta baseada em gordura de porco e após a castração, e em outros tipos celulares diversos além dos eritrócitos; nossa hipótese é que os genes presentes nos clusters da α e da β -globina de células epiteliais de próstata submetidas a determinadas condições sejam expressos e sejam regulados de maneira organizada e semelhante ao que acontece na diferenciação eritróide. Outra hipótese é que, com a progressão tumoral, haveria resgate da expressão destes genes.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Determinar padrões de expressão dos genes das α - e β -hemoglobinas em células epiteliais prostáticas em diferentes situações, e se há elementos de regulação similares àqueles observados durante a diferenciação de células eritróides ou relacionados à regulação gênica específica da próstata.

Objetivos específicos:

1. Verificar o padrão de expressão de α - e β -hemoglobinas em células da próstata em diferentes condições, sendo elas:
 - 1.1 Progressão tumoral;
 - 1.2 Alterações na sinalização por testosterona;
 - 1.3 Cultura com membrana basal solúvel
2. Caracterizar os mecanismos de regulação da expressão gênica dos *clusters* da α e β -globina nas condições determinadas com a execução do objetivo específico 1, através da análise:
 - 2.1 Da expressão de fatores de transcrição eritróides;
 - 2.2 Do aparecimento de HSs eritróides;
 - 2.3 De elementos de sinalização específicos da próstata;
 - 2.4 Da sinalização envolvida com o mecanismo de hipóxia.

METODOLOGIA

Materiais utilizados

Linhagens celulares

As linhagens celulares humanas utilizadas nesse estudo foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) ou recebidas por doação por colaboradores e estão descritas na Tabela 1. Todas as linhagens celulares foram cultivadas de acordo com recomendações da ATCC e mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C.

Tabela 1: Linhagens humanas utilizadas e suas respectivas características.

Linhagem	Descrição
HEL	Linhagem de eritroleucemia
LNCaP	Célula tumoral epitelial de próstata com presença de receptor de andrógeno
PC3	Célula tumoral epitelial de próstata
DU145	Célula tumoral epitelial de próstata
RWPE1	Célula epitelial de próstata com presença de receptor de andrógeno
PNT1A	Célula epitelial de próstata com presença de receptor de andrógeno
PNT2	Célula epitelial de próstata com presença de receptor de andrógeno
HeLa	Célula tumoral epitelial de cervix
HT1080	Célula tumoral de tecido conjuntivo (morfologia mesenquimal)
HEK293	Célula epitelial de rim embriônico

Como a linhagem RWPE1 foi a mais utilizada ao longo desse estudo, é importante ressaltar algumas características dela. Essa linhagem foi imortalizada através da transfecção com o vírus do papiloma humano 18 (HPV18), o que mantém as características de crescimento e diferenciação de células normais. Sendo assim, essa linhagem expressa a proteína viral E7, que é capaz de se ligar a pRb [69].

No geral, as células dessa linhagem têm morfologia epitelial, expressam AR e PSA, além das citoqueratinas 8 e 18, demonstrando que essas células são

derivadas de um tipo secretor. Por ser não tumoral, ela não forma colônias em ágar, e nem tumores em camundongos [69]. Apesar de apresentar características gerais, essa não é uma linhagem homogênea; ela é composta por duas subpopulações: WPE-stem e WPE-int [70].

A denominada WPE-stem tem alta expressão de p63 Δ N e citoqueratinas 14, e baixa expressão de citoqueratinas 18, AR e PSA. Esse subtipo é fisicamente menor e tem fenótipo condizente com células tronco/progenitoras. A denominada WPE-int, por sua vez, tem baixa expressão de p63 Δ N e das citoqueratinas 5 e 14, e maior expressão da citoqueratina 18, com indução de AR e PSA após tratamento com andrógenos. Esse é um subtipo celular intermediário, que está passando pela diferenciação luminal, mas que ainda apresenta baixa expressão de p63. Ele pode dar origem a células luminais terminalmente diferenciadas, que não expressam p63 [70].

Já foi descrito na literatura que a linhagem RWPE1 é capaz de formar ácinos com células polarizadas e lúmen, quando cultivada em matriz rica em laminina, sendo que o componente mais importante para a formação desses ácinos é a Laminina I. Ela não é capaz de formar esses ácinos em colágeno tipo IV ou fibronectina [71].

Animais

Camundongos Swiss machos foram utilizados nesse estudo de acordo com o protocolo para uso de animais em pesquisa aprovado (nº 4223-1, Anexo I). Os animais foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciências em Animais de Laboratório (CEMIB – UNICAMP).

Eles foram mantidos em racks com sistema de exaustão, em gaiolas microisoladas. Tanto a disponibilidade de alimentação quanto a de água foram *Ad Libtum*, com ração padrão para biotério.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos, de acordo com os interesses do projeto:

G1 - Grupo de 15 dias de gestação: fêmeas grávidas com 15 dias de

gestação foram eutanasiadas para a retirada dos fetos e posterior extração do fígado fetal (controle positivo de expressão de hemoglobinas).

G2 - Grupo de camundongos machos não submetidos a tratamento:

camundongos machos de 80 dias não submetidos a tratamento e eutanasiados para extração do cérebro (controle negativo da expressão de hemoglobinas) e da próstata.

G3 - Grupo de camundongos machos submetidos à castração:

camundongos machos com 80 dias submetidos à castração e eutanasiados após 1, 2, 3 ou 7 dias para extração da próstata.

G4 - Grupo de camundongos machos submetidos à castração e reposição hormonal:

camundongos machos com 80 dias submetidos à castração por 3 dias, seguida de reposição hormonal por 4 dias, eutanasiados para remoção da próstata. A reposição hormonal foi feita por injeção subcutânea no dorso do animal de dose fisiológica de cipionato de testosterona 2 mg/kg, diluído em óleo de milho, em dias alternados [72].

G5 - Grupo de camundongos idosos:

camundongos machos com mais de 25 semanas não submetidos a tratamento e eutanasiados para extração da próstata.

Os animais foram anestesiados com xilazina (5mg/kg) e cetamina (100mg/kg), e a castração dos animais foi realizada por orquiectomia bilateral. A eutanásia foi realizada com o aprofundamento da anestesia. Após eutanásia as próstatas ventrais, cérebros e fígados fetais foram dissecados e utilizados para extração de RNA, como descrito em materiais e métodos.

Lise de hemácias

Os diferentes órgãos de camundongos (cérebro e próstata) foram submetidos à lise de hemácias no momento da retirada, para que não houvesse contaminação por hemoglobinas oriundas de hemácias nos experimentos subsequentes de PCR. A lise não foi realizada no fígado fetal, utilizado como

controle positivo.

Para a lise, os órgãos foram macerados em um cadinho com nitrogênio líquido, com posterior incubação por 15 minutos a 4°C em 1mL de tampão de lise de hemácias (NH_4Cl 0,15M e KHCO_3 0,01M). Após a lise, as células foram lavadas por duas vezes em PBS a 1500 rpm por 5 minutos e o pellet foi armazenado a -80°C para extração de RNA.

Ensaio funcionais em linhagens

Tratamento com andrógeno

As linhagens LNCaP, PNT1A, RWPE1 e PNT2, que contém o receptor de andrógeno, foram utilizadas para verificar uma possível influência do estímulo androgênico, via receptor de andrógeno, na expressão das hemoglobinas. Esse estímulo foi dado a partir de R1881, um andrógeno sintético, ou de di-hidrotestosterona (DHT), dependendo da linhagem.

Previamente ao experimento as células da linhagem LNCaP foram cultivadas por 24h em meio contendo 0,5% soro fetal bovino (FBS) tratado com carvão ativado, para que não houvesse influência de outros hormônios no meio de cultura. Nessa linhagem verificamos a possível influência do estímulo androgênico na ausência/presença de outros estímulos proliferativos (soro fetal bovino). Dessa forma, foram utilizadas 5 condições: (1) LNCaP tratada com o veículo DMSO cultivada em meio de cultura 0,5% FBS; (2) LNCaP tratada com o agonista de andrógeno sintético R1881 cultivada em meio de cultura 0,5% FBS; (3) LNCaP cultivada em meio de cultura 10% FBS; (4) LNCaP tratada com o veículo DMSO cultivada em meio de cultura 10% FBS e (5) LNCaP tratada com o agonista de andrógeno sintético R1881 cultivada em meio de cultura 10% FBS. Após 12h de cultivo nos tratamentos descritos, todas as células foram coletadas para extração de RNA como descrito em materiais e métodos.

A linhagem PNT1A foi dividida em 3 condições: (1) PNT1A cultivada em meio de cultura 10% FBS; (2) PNT1A tratada com DHT 0,01nM cultivada em meio de cultura 10% FBS e (3) PNT1A tratada com o veículo etanol cultivada em meio de

cultura 10% FBS. Após 12h de cultivo, todas as células foram coletadas para extração de RNA e de proteínas como descrito em materiais e métodos.

Previamente ao experimento as células da linhagem PNT2 foram cultivadas por 24h em meio contendo 10% soro fetal bovino (FBS) tratado com carvão ativado, para que não houvesse influência de outros hormônios no experimento. A linhagem PNT2 foi dividida em 3 condições: (1) PNT2 cultivada em meio de cultura 10% FBS; (2) PNT2 tratada com DHT 0,01nM cultivada em meio de cultura 10% FBS e (3) PNT2 tratada com o veículo etanol cultivada em meio de cultura 10% FBS. Após 12h de cultivo nos tratamentos descritos, todas as células foram coletadas para extração de RNA e proteínas como descrito em materiais e métodos.

Para os experimentos iniciais de PCR e *Western blotting*, a linhagem RWPE1 foi cultivada em duas condições: (1) meio para queratinócitos suplementado com EGF e BPE e (2) tratada com DHT 0,01nM cultivada em meio para queratinócitos suplementado com EGF e BPE. Após 12h de cultura as células foram coletadas para extração de RNA, como descrito em materiais e métodos.

Para todos os outros experimentos realizados nessa linhagem, o tratamento com DHT foi realizado da seguinte maneira: 0,01nM de DHT adicionados nos pontos 0h, 2h e 4h, sendo que as células foram coletadas para os diferentes experimentos subsequentes após 5h do início do tratamento. Dessa forma nós asseguramos que haveria tempo suficiente para alterações na regulação gênica (5h do início do tratamento), bem como seríamos capazes de observar alterações mais rápidas, como a movimentação protéica (1h após a adição da última dose de DHT). As células não tratadas com DHT foram incubadas com o mesmo volume do veículo etanol nos mesmos pontos. Esse sistema de tratamento foi utilizado tanto para o cultivo bidimensional quanto para o cultivo tridimensional.

Cultivo tridimensional em matriz rica em laminina

A cultura tridimensional foi feita em *Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix* (nº de catálogo A1413202,

ThermoFisher). Ele é um tipo de membrana basal solúvel, composto por laminina, colágeno IV, entacitina e proteoglicanos de heparina sulfato, e apresenta uma quantidade reduzida de fatores de crescimento.

A linhagem RWPE1 foi cultivada em matriz rica em laminina para a formação de estruturas tridimensionais (esferóides). Para isso, 6×10^3 células foram cultivadas em meio de cultura:matriz rica em laminina (3:1) por poço de uma lâmina de vidro com câmara em poliestireno de 8 poços. Após a gelificação da matriz rica em laminina, 250µL meio de cultura com DHT 0,01nM foram adicionados e trocados a cada 3 dias por 15 dias consecutivos. Após esse período, as células foram fixadas para imunofluorescência.

Os esferóides de RWPE1, LNCap e PNT1A também foram cultivados em placas de 24 poços, para posterior coleta e realização de outros experimentos (PCR, *Western blotting*, PCR em tempo real, citometria de imagem e ATAC-seq). O cultivo é muito semelhante ao descrito acima, com as seguintes alterações: 3×10^4 células foram cultivadas por poço, em um volume final de 300µL de meio de cultura:matriz rica em laminina (3:1); e após a gelificação da matriz rica em laminina, 500µL meio de cultura com DHT 0,01nM foram adicionados. A manutenção do meio de cultura com a presença de DHT é importante para a formação adequada dos esferóides. Em experimentos de cultura tridimensional denominados sem tratamento por DHT, a nomenclatura se refere a apenas 12h sem tratamento por DHT antes da coleta das células.

Quando os esferóides estavam formados, aproximadamente 12-15 dias após o início do experimento, eles foram coletados de diversas formas, dependendo das análises subsequentes.

Para a extração de RNA, as células dos esferóides foram coletadas de duas maneiras. (1) Cada poço foi tratado com 300µL de dispase e incubado por 1 hora a 37°C. Os esferóides de todos os poços foram unidos e lavados com PBS por 3 vezes a 1500 rpm por 5 minutos e incubados novamente em 300µL de dispase por 40 minutos a 37°C, para assegurar a degradação total do matriz rica em laminina. Os esferóides foram então centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos e armazenados a -80°C para posterior extração de RNA. (2) Adição direta de Trizol® na cultura

tridimensional, que já é suficiente para a degradação do matriz rica em laminina, e armazenamento a -80°C para posterior extração de RNA.

Para extração de proteínas, cada poço foi tratado com 400µL de PBS-EDTA (5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄ e 1,5mM NaF em PBS) gelado, e a placa foi incubada no gelo por 15 a 30 minutos. Após esse período, todo o conteúdo dos poços foi centrifugado a 200G por 5 minutos a 4°C, e a extração de proteínas foi realizada como descrito a seguir.

Para os experimentos de ATAC-seq e citometria de imagem, além de as células precisarem ser retiradas do matriz rica em laminina, elas também precisaram ser dissociadas umas das outras. Para isso, cada poço foi incubado com 1mL de PBS gelado por 5 minutos no gelo. Após esse período as células foram centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos a 4°C. Os esferóides dissociados do matriz rica em laminina foram então incubados com 2mL de tripsina:PBS (1:1) por 10 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada com 4mL de PBS 2% FBS e as células foram centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos a 4°C. Dessa forma, as células dos esferóides foram individualizadas e puderam ser utilizadas para os experimentos subsequentes.

Cultivo bidimensional com matriz rica em laminina

No cultivo bidimensional em matriz rica em laminina, a ideia foi cultivar as células na superfície dele, o que manteria a sinalização pelos componentes da membrana basal sem a formação de estruturas tridimensionais.

Para isso, inicialmente 200µL de meio de cultura:matriz rica em laminina (3:1) foram colocados por poço de uma placa de 24 poços, com ou sem lamínula de vidro embaixo – dependendo se o experimento final seria a extração de RNA ou imunofluorescência. Uma a duas horas depois, com a gelificação da matriz rica em laminina, foram adicionadas 9×10^4 células por poço, diluídas em 500µL de meio de cultura. Essas células foram incubadas por 24h, com posterior fixação (para imunofluorescência) ou adição de Trizol® (para extração de RNA).

Cultivo bidimensional com matriz rica em laminina solúvel

Outra maneira de manter a sinalização da matriz extracelular sem cultivar estruturas tridimensionais foi cultivando as células em matriz rica em laminina solúvel. Para isso, 9×10^4 células foram colocados por poço de uma placa de 24 poços, com ou sem lamínula de vidro embaixo – dependendo se o experimento final seria a extração de RNA ou imunofluorescência, diluídas em 500µL de meio de cultura 5% matriz rica em laminina. Essas células foram incubadas por 24h, com posterior fixação (para imunofluorescência) ou adição de Trizol[®] (para extração de RNA).

Análise de abundância de mRNAs por PCR

Extração de RNA total

O RNA total das células de linhagem humanas e dos órgãos foi extraído pelo método RNeasy Mini or Micro Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, ou através da adição do reagente Trizol[®] (Life Technologies).

A extração utilizando o Trizol[®] é dividida em duas etapas. Na primeira, de separação de fase, 1mL de Trizol[®] e 200µL de clorofórmio são adicionados à amostra, e a fase aquosa (que contém o RNA) é separada após centrifugação. Na segunda etapa o RNA é precipitado pela adição de 500µL de álcool isopropílico e centrifugação, com posterior adição de 1mL de álcool etílico a 75% e nova centrifugação.

A quantificação do RNA obtido foi realizada independentemente do método utilizado para extração, através da leitura da densidade óptica (DO) da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260nm, considerando que 1 DO a 260nm equivale a 40µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260nm e 280nm foi utilizada como parâmetro para a estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, variando normalmente entre 1,6 e 1,8.

Transcrição reversa

Foram utilizados 5µg de RNA para a transcrição reversa em DNA complementar (cDNA) através do kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas), de acordo com o protocolo do fabricante. Como a reação foi iniciada com 5µg de RNA, assumimos que ao final da transcrição a amostra também continha 5µg de cDNA.

PCR

A análise de abundância de mRNAs de hemoglobinas em linhagens celulares humanas foi feita através de PCR. As reações de foram feitas com 1µg de cDNA e volume final de 10µL. Uma reação sem cDNA foi utilizada como controle negativo para cada primer. Verificamos a expressão dos genes dos cluster da α - e β -hemoglobinas com primers para *HBZ*, *HBA2*, *HBA1*, *HBE*, *HBG*, *HBD* e *HBB* (Tabela 2). O controle positivo das reações foi feito com o primer da β -*ACTINA* e 200ng de cDNA.

Tabela 2: Sequência de *primers* humanos para verificação da abundância de mRNAs de hemoglobinas por PCR e PCR em tempo real.

Gene	Forward	Reverse
<i>HBA1</i>	5'CCGGTCAACTTCAAGCTCCT3'	5'AAGAAGCATGGCCACCGAG3'
<i>HBA2</i>	5'CCGGTCAACTTCAAGCTCCT3'	5'AGGAGGAACGGCTACCGAG3'
<i>HBZ</i>	5'CCGGTCAACTTCAAGCTCCT3'	5'CTCAGCGGTACTTCTCGGTC3'
<i>HBB</i>	5'TGCACGTGGATCCTGAGAACT3'	5'AGCGAGCTTAGTGATACTTGTGG3'
<i>HBD</i>	5'AACTTCAGGCTCTTGGGCAAT3'	5'GAAACAGTCCAGGATCTCAATG3'
<i>HBG1/HBG22</i>	5'ACGCCATGGGTCATTTACA3'	5'AGACAACCAGGAGCCTTCCC3'
<i>HBE</i>	5'TGAGAACTTCAAGCTCCTGGG3'	5'CATGTGCAGAAGGAGGGTGT3'
β - <i>ACTINA</i>	5'TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA3'	5'CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG3'

As reações foram realizadas no equipamento Mastercycler gradient (Eppendorf) de acordo com o programa: 5 minutos a 94°C e 29 ciclos de 30 segundos a 94°C, seguido de 15 segundos a 60° e 20 segundos a 72°C. O resultado das reações foi visualizado em gel de agarose 2% com 0,01% Sybr safe.

Também realizamos a análise de abundância de mRNAs dos seguintes fatores de transcrição na linhagem DU145: *GATA1*, *GATA2*, *GATA3*, *KLF1*, *OCT1* e *c-MYB*. (Tabela 3), da mesma forma em que os mRNAs de hemoglobinas foram analisados.

Tabela 3: Sequência de *primers* humanos para verificação da abundância de mRNAs de fatores de transcrição por PCR e PCR em tempo real.

Gene	Forward	Reverse
<i>GATA1</i>	5'AGAAGCGCCTGATTGTCACT3'	5'ATGGTCAGTGGCCGGTTC3'
<i>GATA2</i>	5'CCTCCAGCTTCACCCCTAAG3'	5'GGTCGGTTCTGCCCATTCAT3'
<i>GATA3</i>	5'ACAGGCAGGGAGTGTGTGAA3'	5'CTGACAGTTCGCACAGGACG3'
<i>KLF1</i>	5'GTGTGATAGCCGAGACCGC3'	5'CGTATGGCTTCTCCCTGTGT3'
<i>OCT1</i>	5'GGTGATGTTGGGCTCGCTAT3'	5'GCTGGAGAGGGACGAATCAG3'
<i>c-MYB</i>	5'TCTGGAAAGCGTCACTTGGG3'	5'TGCACATCTGTTCGATTCTGGG3'

PCR quantitativo em tempo real

Para uma análise quantitativa da expressão gênica de hemoglobinas na linhagem RWPE1, utilizamos os mesmos *primers* já descritos para fazer o PCR quantitativo em tempo real. As reações foram feitas em triplicata utilizando o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems), 50ng de cDNA e os *primers* de interesse (utilizados a 800nM). Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi feito para cada par de *primers*. A linhagem HEL foi utilizada como controle positivo da presença de hemoglobinas, e como normalizador nas análises dos resultados.

Também realizamos a análise quantitativa da abundância de mRNAs dos seguintes fatores de transcrição: *GATA1*, *GATA2*, *KLF1*, *NF-E2 (p45)*, *FOG1* e *TAL1*, da mesma forma com que os mRNAs de hemoglobinas foram analisados. Parte dos *primers* foi a mesma utilizada para o PCR da linhagem DU145 (Tabela 3); os outros estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Sequência de *primers* humanos para verificação da abundância de mRNAs de fatores de transcrição por PCR em tempo real.

Gene	Forward	Reverse
<i>NF-E2 (p45)</i>	5'GAGCAGGAACAGGGTGATACA3'	5'GGGGCTCAAATGATGGCTCA3'
<i>FOG1</i>	5'ACATGTCCAGGCGGAAACAG3'	5'GTGAGTTAACATCTGCGCTGG3'
<i>TAL1</i>	5'AGATTACTGATGGTCCCCACAC3'	5'GCGGAGGATCTCATTCTTGC3'

Também fizemos a análise de expressão gênica de hemoglobinas nos órgãos dos grupos de camundongos descritos anteriormente. Verificamos a expressão dos genes dos cluster da α - e β -hemoglobinas murinas com primers para *Hba-x*, *Hba-a*, *Hbb-by*, *Hbb-bh1*, *Hbb-bh2*, *Hbb-b1* e *Hbb-b2*. O controle positivo das reações foi feito com o primer da β -Actina. (

Tabela 5). O fígado fetal foi utilizado como controle positivo da expressão de hemoglobinas, e como normalizador para as análises dos resultados.

Tabela 5: Sequência de primers murinos para verificação da expressão gênica de hemoglobinas por PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Forward	Reverse
<i>Hba-a1/Hba-a2</i>	5'TGATGTAAGCCACGGCTCTG3'	5'CAGTGGCTCAGGAGCTTGAA3'
<i>Hba-x</i>	5'TCCGGTCAACTTCAAGCTCC3'	5'ATAGCTGGTCATGGGGGTC3'
<i>Hbb-b2</i>	5'TGTGACAAGCTGCATGTGGA3'	5'GGACATATAACCTTTGTGCATAGAC3'
<i>Hbb-b1</i>	5'TGTGACAAGCTGCATGTGGA3'	5'GTTACACAGGCAAGAGCAGGA3'
<i>Hbb-bh2</i>	5'TGAGAACTTCAAGCTCCTGGG3'	5'GCGAAAGAAGGGGTCTCAGTA3'
<i>Hbb-bh1</i>	5'GGGAAACCCCGGATTAGAG3'	5'CATGTTGCCAGGAGCTTGAA3'
<i>Hbb-y</i>	5'CTTCAAACCTTGGGTAATGTGCT3'	5'GAAAGGAGGCATAGCGGACA3'
β -ACTINA	5'CCACCATGTACCCAGGCATT3'	5'ACGCAGCTCAGTAACAGTCC3'

As reações foram realizadas no equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) de acordo com o seguinte programa para curva de amplificação: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguido de 15 segundos a 59°C e 1 minuto a 72°C. Para verificar amplificações não específicas foi feita uma curva de dissociação, definida pelo equipamento. O controle interno utilizado para todas as amostras foi β -ACTINA, e a expressão relativa dos genes foi calculada através da equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ [73].

Análise de expressão protéica por Western blotting

A análise de expressão protéica foi feita através de Western blotting. As células de interesse foram incubadas por 40 minutos com tampão de lise RIPA 1% inibidores de protease (cat. P8340, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). O sobrenadante contendo proteínas foi coletado após centrifugação.

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford. Tampão de Laemmli 5X foi adicionado às proteínas, seguido de desnaturação a 96°C antes da separação em gel SDS-PAGE a 12%. A quantidade de proteína aplicada no gel foi equivalente a 60µg.

Após a corrida no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com TBS contendo BSA 5% por pelo menos 1h, antes de serem incubadas com os anticorpos primários específicos diluídos em TBS-T contendo BSA 3%.

A incubação com os anticorpos primários foi 12h a 4°C, e a incubação com os anticorpos secundários específicos foi por 1h à temperatura ambiente. A fluorescência foi detectada através do aparelho Typhoon TRIO Variable Mode Imager (GE Healthcare) no comprimento de onda adequado.

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-HBA (H-80, sc-21005, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), anti-HBG (51-7, sc-21756, Santa Cruz Biotech), anti-HBB (37-8, sc-21757, Santa Cruz Biotech) e anti-HBA (D-4, sc-514378, Santa Cruz Biotech) diluídos 1:1000, e anti- β -ACTINA (A5316, Sigma-Aldrich) diluído 1:5000. Os anticorpos secundários utilizados foram Alexafluor 488-conjugated goat anti-rabbit Ig, Alexafluor 488-conjugated goat anti-mouse Ig e Alexafluor 647-conjugated goat anti-mouse, diluídos a 1:2000.

Identificação e localização das hemoglobinas por imunofluorescência

Protocolo experimental

Após os diferentes cultivos já descritos, as células foram fixadas no fixador para imunofluorescência aquecido a 37°C (PBS 4% paraformaldeído 5%

sacarose 0,6% Triton 100-X), por 20 minutos à temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas três vezes de 5 minutos com PBS. As células foram permeabilizadas com PBS 0,5% triton por 10 minutos à temperatura ambiente, e lavadas por mais uma vez de 5 minutos com PBS.

O bloqueio foi realizado por pelo menos 1h em PBS 0,8% Triton 10% soro produzido em cabra/camundongo, dependendo do anticorpo secundário utilizado. Essa solução de bloqueio assegura que não haverá ligação inespecífica do anticorpo secundário produzido em cabras/camundongos, e também mantém a permeabilização das membranas.

Após bloqueio, as células foram lavadas por uma vez de 5 minutos com PBS 0,05% Tween20, e incubadas por 12h a 4°C em anticorpo primário diluído em PBS 5% soro. Os controles negativos foram incubados somente com PBS contendo 5% soro. As células foram então lavadas três vezes de 10 minutos com PBS 0,05% Tween20 e incubadas com anticorpo secundário, DAPI (marcação nuclear) e Faloidina (marcação da F-actina, para delimitação celular) por 1h a temperatura ambiente no escuro. O anticorpo secundário também foi diluído em PBS 5% soro. Após esse período as células foram lavadas três vezes de 10 minutos com PBS, e as lâminas foram montadas com meio de montagem (90% glicerol, 10% Tris 20 mM pH 8, 0,5% N-propilgalato).

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-HBA (D-4, sc-514378, Santa Cruz Biotech), anti-AR (N-20, sc-816, Santa Cruz Biotech) e anti-p63 ΔN (619002, Biolegend), todos diluídos 1:50; e anti-HBE (ab156041, Abcam) e anti-HIF1 α (NB100-134, Novus Biologicals), ambos diluídos 1:500.

Os seguintes anticorpos secundários foram utilizados: goat-anti-mouse 647 (A21235, Life Technologies, donkey-anti-rabbit 488 (sc-362261, Santa Cruz Biotech) e rabbit-anti-mouse 488 (A11059, Life Technologies), todos diluídos 1:1000. Além disso, utilizamos também Faloidina TRITC diluída 1:1000 e DAPI (D9542, Sigma Aldrich) diluído 1:2000.

Captura de imagens e análises

As amostras foram examinadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas, usando confocal LSM880 Zeiss no microscópio *Axio Observer 7* (Carl Zeiss AG, Alemanha), e objetiva de 63x. As imagens foram coletadas usando lasers BP 420-480nm, BP 495-550nm, BP570-620nm e DAPI para excitação e filtros de emissão BP 495-620nm, LP 570nm e LP 645nm; para os fluoróforos Alexa488, TRITC, Alexa647 e DAPI, respectivamente, com *pinhole* ajustado diferencialmente para cada canal, formato da imagem de 512×512 e zoom óptico de 1,8. O INFABIC é cofinanciado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo: 2014/50938-8) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo: 465699/2014-6).

Após adquiridas, todas as imagens passaram pelo processo de *Airyscan* no *software* do equipamento (Zen Blue Edition). As reconstruções tridimensionais também foram feitas utilizando o *software*. As análises básicas de imagem foram feitas utilizando o *software* FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*) [74], um pacote de análises de imagem no qual vários *plugins* importantes do ImageJ [75] já vêm instalados.

Para as análises de colocalização, o plugin JACoP (*Just Another Colocalization Plugin*) [76], instalado no FIJI, foi utilizado, de acordo com indicações da literatura [77]. O coeficiente utilizado para essas análises foi o MCC (*Manders Colocalization Coefficient*), que depende da co-ocorrência de sinal no mesmo pixel, mas não depende da intensidade de fluorescência de cada canal. Ele mede a porcentagem de um canal que é coincidente com o outro canal, então, no caso de analisarmos dois canais diferentes, obtemos dois MCCs [77].

O uso desse coeficiente depende de uma boa distinção entre a marcação e o *background*, e esse limiar pode ser definido de modo manual ou matemático com o *plugin* JACoP. Para as análises realizadas aqui, o modo manual foi utilizado. Um exemplo da marcação de HBA ou HBE e as respectivas definições do que pode ser considerado marcação (vermelho, painéis da direita) é representado na Figura 16.

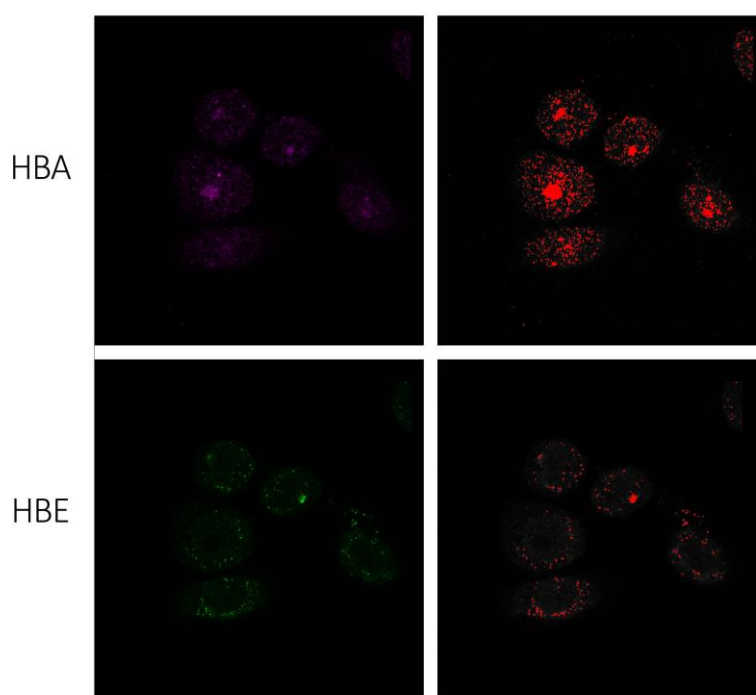


Figura 16: Imagem representativa da marcação de HBA (magenta) e HBE (verde) e as respectivas definições do que foi considerado marcação (vermelho).

Citometria de imagem

Os grupos de células submetidos à citometria de imagem foram: 2D, 2D + DHT, 3D e 3D + DHT. As células cultivadas tridimensionalmente foram dissociadas da matriz rica em laminina como descrito anteriormente.

Para a citometria de imagem, 5×10^6 células foram utilizadas para cada condição. Essas células foram fixadas em 100 μ L de reagente A (GAS001, ThermoFisher) por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro, com posterior lavagem com *wash buffer* (PBS 1% BSA) por 5 minutos a 1500rpm a 4°C. Elas foram permeabilizadas em 100 μ L de reagente B (GAS002, ThermoFisher) por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, e novamente lavadas com *wash buffer* por 5 minutos a 1500rpm a 4°C. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito por pelo menos 1 hora com PBS 10% soro de cabra (onde foi produzido um dos anticorpos secundários), e depois as células foram lavadas como descrito anteriormente.

A incubação com os anticorpos primários foi feita por 16 horas a 12°C com agitação constante. Os anticorpos foram diluídos em PBS 5% soro de cabra. Após esse período, as células foram lavadas por duas vezes antes da incubação com os anticorpos secundários. Esses anticorpos também foram diluídos em PBS 5% soro de cabra e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Além dos anticorpos secundários, o reagente DAPI foi adicionado nos 30 minutos finais da incubação. Todas as incubações foram realizadas no escuro. Após essa etapa, as células foram lavadas por três vezes em *wash buffer* e ressuspensas em 50µL de *FACS buffer* (PBS 5% BSA), e adquiridas pelo citômetro de imagem Amnis (Luminex Corporation).

Os anticorpos primários utilizados foram anti-HBA (D-4, sc-514378, Santa Cruz Biotech) diluídos 1:50 e anti-HBE (ab156041, Abcam) diluído 1:100. Os anticorpos secundários utilizados foram goat-anti-mouse 647 (A21235, Life Technologies) e donkey-anti-rabbit 488 (sc-362261, Santa Cruz Biotech) ambos diluídos a 1:200. DAPI (D9542, Sigma Aldrich), para marcação nuclear, foi diluído 1:1000.

As células foram analisadas através citômetro de imagem Imagestream Amnis Mark II (Luminex Copr, TX, USA). Os resultados obtidos foram analisados utilizando o *software* IDEAS 6.2, no qual é possível visualizar a imagem correspondente a cada ponto dos gráficos. A ferramenta de colocalização foi utilizada para extrair informações das imagens obtidas, considerando as marcações para HBA e HBE.

ATAC-seq

O experimento de ATAC-seq (do inglês *Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing*) foi sugerido pelo colaborador Dr. Jim Hughes (*MRC Weatherall Institute of Molecular Medicine*, Oxford, Reino Unido) para mapear a acessibilidade da cromatina nos locus da α - e β -globina, incluindo os sítios de Hipersensibilidade à DNase I previamente descritos. Com esse protocolo também é possível verificar a ocupação de sítios por fatores de transcrição e a posição nucleossomal [78, 79].

Ele é baseado na hiperatividade da transposase Tn5, que está acompanhada de adaptadores, e pode simultaneamente fragmentar o DNA em sítios de cromatina aberta (livres de nucleossomos) e regiões internucleossomais, enquanto adiciona adaptadores para sequenciamento de nova geração (atividade conhecida como “tagmentação”) [78]. A Figura 17 demonstra os sítios onde a transposase Tn5 pode cortar o DNA, e as parâmetros que podem ser inferidos subsequentemente, em comparação com outras técnicas.

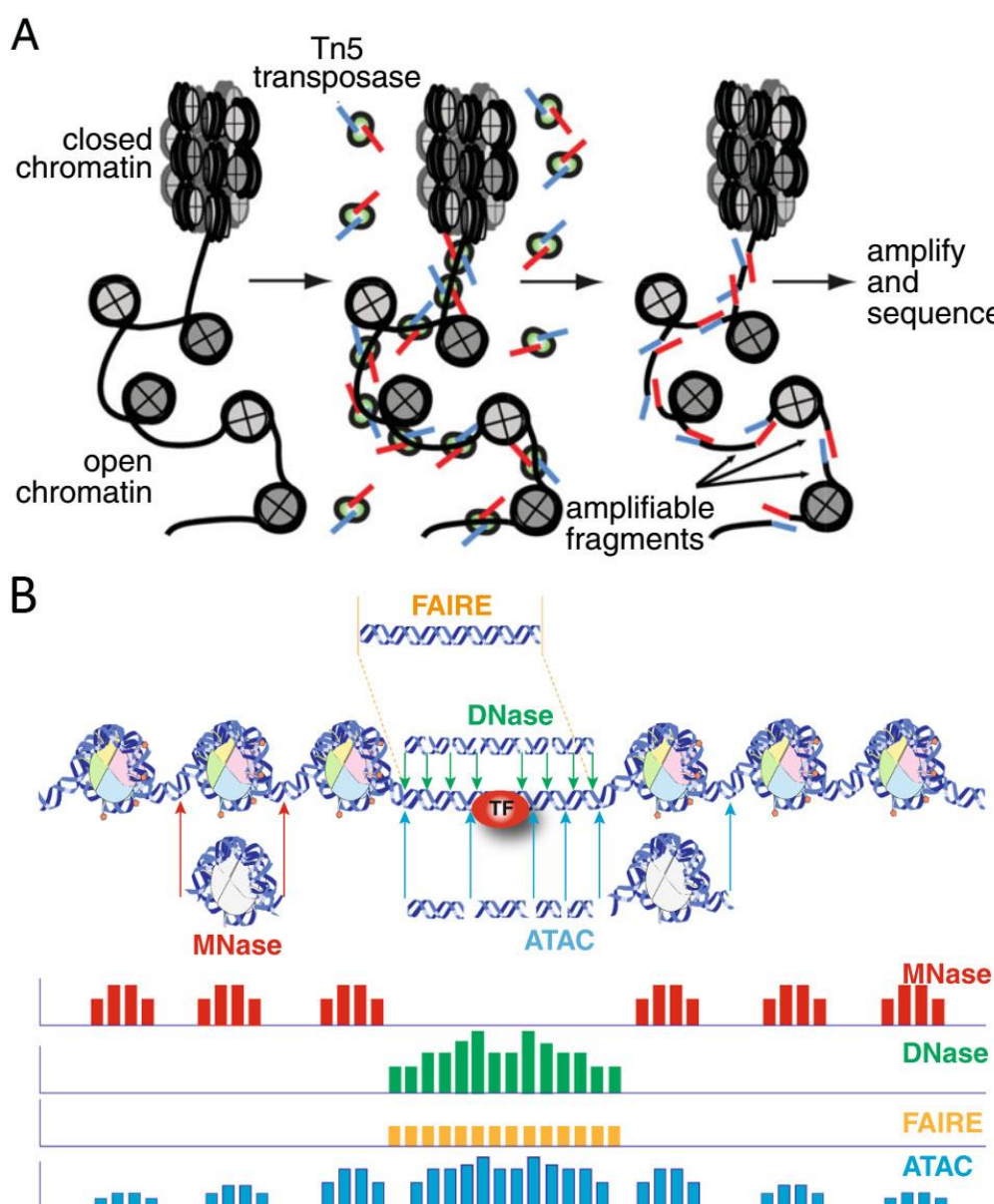


Figura 17: Funcionamento do protocolo de ATAC-seq (do inglês *Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing*). (A) Sítios de corte da transposase Tn5. Imagem extraída de Buenrostro e colaboradores, 2013 [78] e (B)

parâmetros que podem ser obtidos com esse protocolo, em comparação com outros protocolos. Imagem retirada de Tsompana e colaboradores, 2014 [80].

Tagmentação e indexação

O protocolo experimental para ATAC-seq foi adaptado de protocolos previamente publicados [78, 79]. Os grupos submetidos a esse protocolo foram RWPE1 2D, RWPE1 2D + DHT, RWPE1 3D e RWPE1 3D + DHT, realizados em duplicata. As células cultivadas tridimensionalmente foram dissociadas como descrito anteriormente.

Para esse experimento foram necessárias $1,5 \times 10^5$ células por replicata, misturadas a 50µL de tampão de lise gelado (10mM Tris-HCl pH 7.5; 10mM NaCl; 2mM MgCl₂; 0,1% Igepal CA-630). Após a mistura, as células foram imediatamente centrifugadas a 500G/4°C por 10 minutos. As células foram então lavadas com PBS pelo mesmo tempo de centrifugação.

A reação de tagmentação foi realizada adicionando ao pellet 47,5µL buffer 1X (Illumina, nº catálogo 15027866) e 2,5µL Tn5 transposase (Illumina, nº catálogo 15027865), e incubando por 30 minutos a 37°C. A reação foi imediatamente purificada utilizando a coluna Qiagen MinElute (nº catálogo 28004) e eluída em 23µL *Elution Buffer* aquecido a 37°C.

As amostras foram indexadas para que pudessem ser identificadas após sequenciamento. O PCR foi realizado com 10µL do DNA eluído na etapa anterior, 10µL água livre de nucleases, 25µM *primer Forward* (Ad1_noMX, idêntico para todas as amostras), 25µM *primer Reverse* (Ad2.1-8, um primer diferente para cada amostra), 25µL *NEBNext High-Fidelity 2X PCR Master Mix* (NEB, nº catálogo M0541S). Os nomes e sequências dos *primers* podem ser verificados na Tabela 6.

As reações foram realizadas no equipamento Mastercycler gradient (Eppendorf) de acordo com o programa: 5 minutos a 72°C, 30 segundos a 98°C e 11 ciclos de 10 segundos a 98°C, seguido de 10 segundos a 63° e 1 minuto a 72°C. Cada reação foi imediatamente purificada utilizando a coluna Qiagen PCR *cleanup kit* (nº catálogo 28104) e eluída em 20µL *Elution Buffer* aquecido a 37°C.

Tabela 6: Sequências dos *primers* utilizados para indexação das amostras de ATAC-seq.

	Nome	Sequência Primer
	Ad1_noMX	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTG
N701	Ad2.1_TAAGGCGA	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
N702	Ad2.2_CGTACTAG	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
N703	Ad2.3_AGGCAGAA	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCTGCCTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
N704	Ad2.4_TCCTGAGC	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTCAGGAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
N705	Ad2.5_GGACTCCT	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGGAGTCCGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
N706	Ad2.6_TAGGCATG	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATGCCTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
N707	Ad2.7_CTCTCTAC	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGAGAGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
N708	Ad2.8_CAGAGAGG	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCCTCTCTGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT

Controle de qualidade e quantificação das amostras

O controle de qualidade, quantificação das amostras e o sequenciamento foram realizados na instalação aberta de Sequenciamento de Alta Performance (NGS) do LNBR - Laboratório Nacional de Biorrenováveis (CNPEM / MCTIC).

O controle de qualidade e análise do tamanho dos fragmentos foram realizados no equipamento Bioanalyzer 2100 com o kit 12000 DNA assay (Agilent). As amostras deveriam ter um perfil demonstrando a existência de fragmentos de 180pb, 300pb e 550pb [79].

As amostras foram quantificadas por PCR em tempo real, utilizando o *KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms* (Kappa Biosystems). Elas foram então unidas para ficarem na concentração equimolar de 9pM.

Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no sequenciador HiSeq. A corrida realizada foi *paired-end* com 50 ciclos, que resulta em alinhamentos adequados com custos mais baixos do que corridas com ciclos mais longos [79]. Os kits utilizados no sequenciador foram *HiSeq Rapid SBS Kit v2 (50 cycles)* (Illumina, nº catálogo FC-

402-4022) e *HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 - Paired-end cluster generation kit for HiSeq 2500* (Illumina, nº catálogo PE-402-4002).

Análise dos resultados

Os resultados foram analisados utilizando como guia o *workflow* sugerido por Yan e colaboradores [81]. A Figura 18 sumariza o *workflow*, bem como as ferramentas utilizadas para cada etapa, com algumas imagens ilustrativas.

Os dados obtidos no sequenciamento de nova geração foram adicionados ao servidor público de usegalaxy.eu, na plataforma online Galaxy [82], onde a maioria das análises foi realizada. O servidor Galaxy utilizado é parcialmente financiado pelo *Collaborative Research Centre 992 Medical Epigenetics* (DFG grant SFB 992/1 2012) e pelo *German Federal Ministry of Education and Research* (BMBF grants 031 A538A/A538C RBC, 031L0101B/031L0101C de.NBI-epi, 031L0106 de.STAIR (de.NBI)).

Uma pequena parte do controle de qualidade foi realizada no R, através do pacote de Bioconductor “ATAC-seqQC” [83]. Algumas considerações importantes a respeito das análises foram retiradas do Github [84, 85].

A primeira etapa da análise consistiu na união das *reads* presentes nas duas *lanes* da corrida (L1 e L2), feita com a ferramenta “*Concatenate datasets tail-to-head (Galaxy Version 1.0.0)*”. Após essa etapa as sequências foram renomeadas para não haver sobreposição entre os nomes das *reads* advindas de L1 e L2, utilizando a ferramenta “*Rename sequences (Galaxy Version 0.0.14+galaxy0)*” [86]. A qualidade das sequências foi checada através do “*FastQC Read Quality reports (Galaxy Version 0.72+galaxy1)*” [87]. Essa é uma checagem preliminar da qualidade do sequenciamento, não podendo ainda ser considerada um critério para exclusão do mesmo, pois na maioria das vezes indica que a qualidade do sequenciamento está baixa.

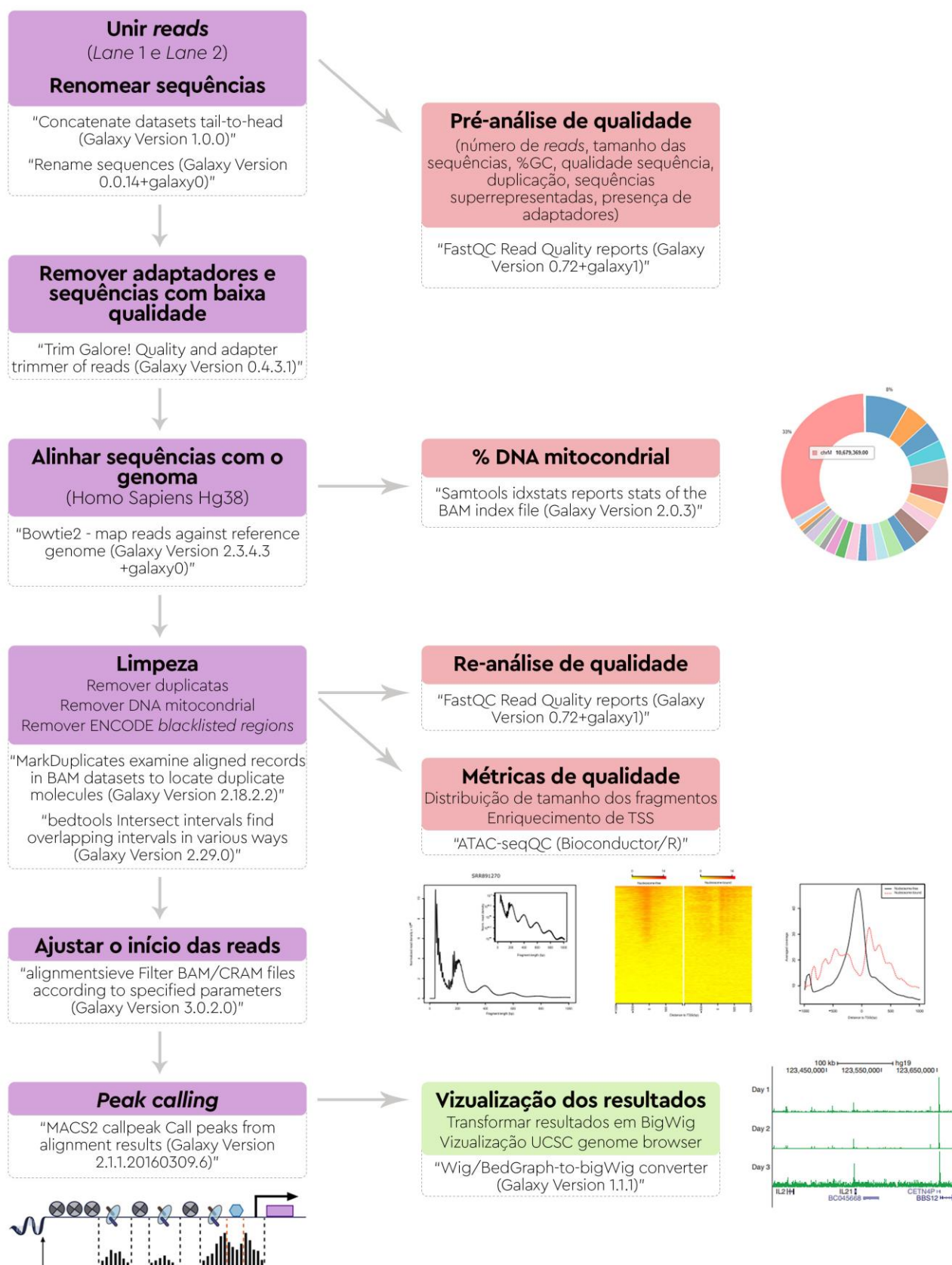


Figura 18: Workflow utilizado para análises do ATAC-seq. As análises foram realizadas utilizando o servidor público de usegalaxy.eu, na plataforma *online* Galaxy [82]; ou utilizando o pacote do Bioconductor “ATAC-seqQC” para R [83]. As imagens ilustrativas foram retiradas de artigos sobre análise de ATAC-seq [78, 81, 83] ou do próprio Galaxy.

Para melhorar a qualidade do sequenciamento foi feita a retirada de sequências cuja qualidade não estava adequada. Além disso, é necessário retirar a sequência de adaptadores de cada *read*, pois essas não se anelam no organismo de interesse e podem dificultar essa etapa. Ambas as etapas foram realizadas simultaneamente com “*Trim Galore! Quality and adapter trimmer of reads (Galaxy Version 0.4.3.1)*”. Os parâmetros utilizados nessa etapa foram: `--phred33 --quality 20 --stringency 3 -e 0.1 --length 5 --retain_unpaired --length_1 15 --length_2 15 --output_dir ./ --paired`, com autodetecção do tipo de adaptador.

As sequências, agora com qualidade adequada e sem adaptadores, foram alinhadas à versão mais recente do genoma de interesse (*Homo sapiens* Hg38) utilizando a ferramenta “*Bowtie2 - map reads against reference genome (Galaxy Version 2.3.4.3+galaxy0)*” [88, 89]. Os parâmetros utilizados foram: `-l 0 -X 2000 --fr --dovetail --very-sensitive`. Após essa etapa foi possível verificar a porcentagem de sequências correspondentes ao DNA mitocondrial, utilizando a ferramenta “*Samtools idxstats reports stats of the BAM index file (Galaxy Version 2.0.3)*” [90-98].

Para a análise final foi necessária a retirada de algumas sequências. São elas: Sequências alinhadas ao genoma mitocondrial, mais acessível devido à falta de empacotamento por cromatina e que, por ser uma porcentagem considerável do sequenciamento, poderia interferir nas análises subsequentes; as consideradas *ENCODE blacklisted regions*, sequências repetitivas do genoma que poderiam causar ruído nas análises [99]; e as sequências duplicadas, advindas de duplicatas de PCR e que não agregam valor biológico às análises [81].

O genoma mitocondrial e as *ENCODE blacklisted regions* foram retiradas utilizando a ferramenta “*bedtools Intersect intervals find overlapping intervals in various ways (Galaxy Version 2.29.0)*” [100, 101]. Para isso, dois arquivos BED, um contendo o genoma mitocondrial e outro contendo as *ENCODE blacklisted regions*

foram intersectados com alinhamento de cada amostra com o parâmetro -v. Para a retirada de duplicatas de PCR foi utilizada a ferramenta “*MarkDuplicates examine aligned records in BAM datasets to locate duplicate molecules (Galaxy Version 2.18.2.2)*” [102], com os seguintes parâmetros: REMOVE_DUPLICATES='true' ASSUME_SORTED = 'false' DUPLICATE_SCORING_STRATEGY = 'SUM_OF_BASE_QUALITIES' OPTICAL_DUPLICATE_PIXEL_DISTANCE = '100' VALIDATION_STRINGENCY = 'LENIENT' QUIET = true VERBOSITY = ERROR.

Após essa limpeza foi feita uma reanálise utilizando a mesma ferramenta “*FastQC Read Quality reports (Galaxy Version 0.72+galaxy1)*” [87], que agora deve mostrar uma quantidade menor de *reads*, porém com alta qualidade. Além disso, outras métricas de qualidade devem ser aplicadas às amostras, para verificar a distribuição de tamanho dos fragmentos obtidos e também o enriquecimento em Regiões de Início de Transcrição (do inglês “*Transcription Start Sites*, ou *TSSs*). Essas métricas foram realizadas no R, através do pacote do Bioconductor “*ATACseqQC*” [83].

A distribuição de fragmentos foi analisada com a ferramenta *fragSizeDist*. Por ser um experimento que faz o corte do DNA nas regiões livres de nucleossomos, ele deve conter fragmentos menores de 100pb (regiões livres de nucleossomos) e fragmentos com periodicidade de 200bp (200pb, 400pb, 600pb - correspondendo a mono-, bi-, trinucleossomos e assim sucessivamente) [78, 79, 83]. O enriquecimento de TSS foi analisado com a ferramenta *enrichedFragments*. As regiões promotoras de genes ativos estão em regiões de cromatina descompactada. Idealmente, os fragmentos menores de 100pb devem estar imediatamente *upstream* aos *TSSs* [83].

Concluída a análise de qualidade, e verificando que as amostras estão adequadas, é necessário fazer o ajuste do início das *reads* para representar o centro da ligação com a transposon. A transposase Tn5 se liga como um dímero e adiciona dois adaptadores separados por 9pb. Dessa forma, todas as *reads* alinhadas com a fita positiva devem ter a posição alterada para +4, enquanto as *reads* alinhadas com a fita negativa devem ter a posição alterada para -5 [78]. Essa etapa é particularmente importante quando são feitas análises de ligação a fatores de transcrição. A ferramenta do Galaxy utilizada para realizar essa alteração foi a “*alignmentsieve Filter BAM/CRAM files according to specified parameters (Galaxy*

Version 3.0.2.0)", com o parâmetro –ATACshift [84, 103].

Para verificar as regiões de enriquecimento de *reads*, e fazer o denominado *Peak Calling*, a ferramenta "MACS2 callpeak Call peaks from alignment results (Galaxy Version 2.1.1.20160309.6)" foi utilizada [104, 105], com os seguintes parâmetros: --format BED --gsize '2700000000' --nolambda --keep-dup 'all' --bdg --pvalue '0.01' --nomodel --extsize '200' --shift '-100' [84, 85]. Para a visualização dos resultados, o arquivo em formato Bedgraph obtido na etapa de *Peak Calling* teve de ser transformado em formato BigWig, utilizando a ferramenta "Wig/BedGraph-to-bigWig converter (Galaxy Version 1.1.1)". O *pipeline* da ENCODE foi utilizado como guia dos diferentes formatos de arquivo resultantes de cada etapa do *workflow* [106]. Enfim, os resultados puderam ser observados no UCSC genome browser.

Comparação com dados de subpopulações eritróides

Como era de nosso interesse comparar a conformação da cromatina dos locus da α - e β -globina em nossos grupos com a de células eritróides, foi necessário fazer a análise de dados previamente publicados de ATAC-seq de eritrócitos [107, 108]. Essa análise foi feita pelo colaborador Dr. Damien Downes (MRC Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford, Reino Unido) através da ferramenta NGseqbasic [109].

As subpopulações eritróides analisadas foram: o progenitores comuns HSC (*Hematopoietic Stem Cells/Células Tronco Hematopoiéticas*), MPP (*Multipotent Progenitor/Progenitor Multipotente*), MEP (*Megakaryocyte-Erythroid Progenitor/Progenitor Megacariocítico-Eritróide*) e CMP (*Commom Myeloid Progenitor/Progenitor Comum Mieloide*) [107]; e células comprometidas com a diferenciação eritróide CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid/Unidade Formadora de Colônia Eritróide*), ProE1, ProE2 (*Proerythroblast/Proeritroblasto*), BasoE (*Basophilic Erythroblast/Eritroblasto Basofílico*), PolyE (*Polychromatic Erythroblast/Eritroblasto policromático*), OrthoE (*Orthochromatic Erythroblast/Eritroblasto Ortocromático*) e OrthoRet (*Orthochromatic Reticulocyte/Reticulócito Ortocromático*) [108].

Predição de ligação a fatores de transcrição

Para verificar quais fatores de transcrição poderiam se ligar a sequências específicas do DNA utilizamos o laboratório virtual PROMO [110, 111]. Ele se baseia nos fatores de transcrição definidos pelo banco de dados TRANSFAC (versão 8.3) para fazer os cálculos de predição dos sítios de ligação. A espécie selecionada para a análise de fatores de transcrição foi Homo sapiens, com taxa de dissimilaridade da matriz máxima de 15%.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5. As análises utilizadas foram teste T de Student não pareado ou ANOVA com pós teste de Bonferroni, dependendo do número de amostras a serem comparadas. Em todas as análises o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

RESULTADOS

Presença de hemoglobinas em linhagens celulares de próstata humana

Inicialmente, como triagem do material de estudo, verificamos a abundância relativa de mRNAs de hemoglobinas em linhagens celulares prostáticas humanas e de outros tecidos, quando submetidas a condições normais de cultura (meio de cultura 10% FBS, Figura 19A); e a presença das proteínas HBA, HBG e HBB nessas mesmas condições (Figura 19B/C). A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada na maioria dos experimentos como controle positivo da expressão de hemoglobinas, pois é uma linhagem que apresenta abundância dos mRNAs e cujas proteínas, além de presentes, são funcionais.

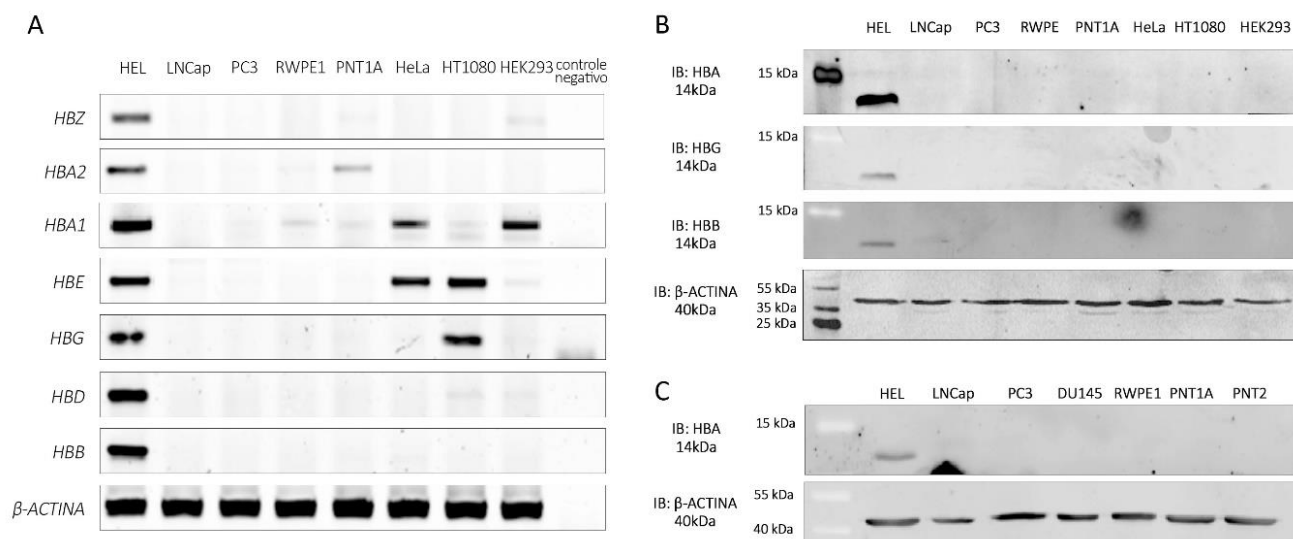


Figura 19: Abundância de diferentes hemoglobinas em linhagens celulares humanas cultivadas em meio de cultura 10% FBS. (A) PCR de linhagens celulares humanas, sendo a linhagem de eritroleucemia HEL utilizada como controle positivo da presença de hemoglobinas. Em todos os PCRs, uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras. **(B/C)** *Western blotting* de HBA (14 kDa), HBG (14kDa), HBB (14kDa) e β -actina (40kDa, controle da quantidade de proteínas) de diferentes linhagens celulares humanas. β -ACTINA foi usada como controle da quantidade de proteínas de cada linhagem.

As linhagens prostáticas apresentam menor expressão gênica de hemoglobinas quando comparadas a linhagens de outros tecidos. Além disso, é possível verificar que linhagens epiteliais normais de próstata RWPE1 e PNT1A expressam preferencialmente hemoglobinas do cluster α (*HBZ*, *HBA2* e *HB1*), enquanto linhagens epiteliais tumorais de próstata LNCap, PC3 e DU145 expressam quantidades comparativamente menores dessas hemoglobinas (Figura 19A).

Curiosamente, não foi possível detectar a presença de proteínas nas linhagens analisadas (Figura 19B/C). Não esperávamos que houvesse presença da proteína HBB nessas linhagens, pois nenhuma delas apresentou expressão gênica, porém esperávamos observar a presença das proteínas HBA e HBG nas linhagens que expressam os mRNAs correspondentes. Isso pode ser tanto um indicativo de que não há tradução do mRNA, quanto de que a quantidade de proteínas expressas é muito baixa.

Além de verificarmos a expressão gênica basal de hemoglobinas em condições normais de cultura, verificamos também se a expressão delas estaria condicionada à regulação androgênica ou ao aumento da proliferação. Para isso, utilizamos as linhagens que apresentam os receptores de andrógeno LNCap (Figura 20), PNT1A, PNT2 (Figura 21) e RWPE1 (Figura 22C).

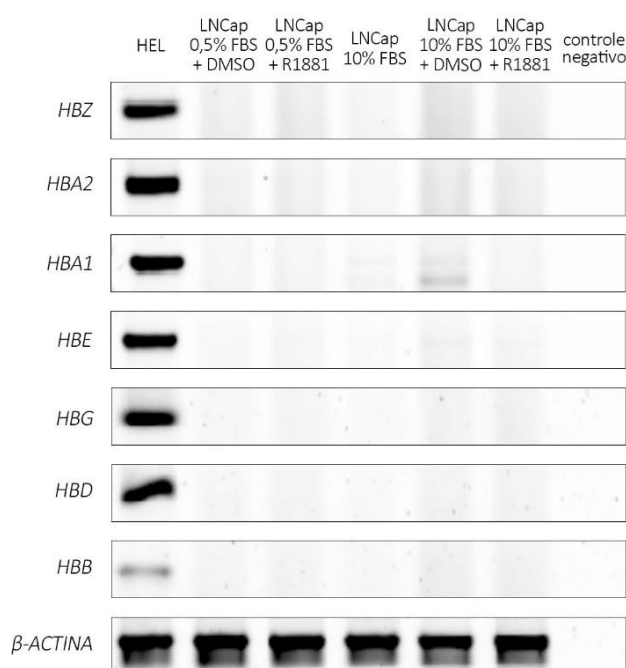


Figura 20: Abundância relativa de mRNAs de hemoglobinas na linhagem LNCap tratada ou não com o agonista de andrógeno sintético R1881. Uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras.

Cultivamos a linhagem LNCap em diferentes concentrações de soro fetal bovino combinadas ou não ao agonista de andrógeno sintético R1881 para verificar se a expressão dos genes hemoglobinas estaria relacionada à regulação androgênica ou à proliferação celular (Figura 20). Concluimos que a expressão gênica de hemoglobinas na linhagem LNCap é muito baixa, e não varia de acordo com a condição a que ela é submetida.

As linhagens PNT1A, PNT2 e RWPE1 também foram submetidas à cultura com andrógenos, nesse caso o DHT (Figura 21/Figura 22C). Essas linhagens novamente apresentaram mRNAs das hemoglobinas do cluster α , sem a detecção da proteína HBA. Além disso, o nível de expressão dos mRNAs não foi alterado pelo tratamento com DHT.

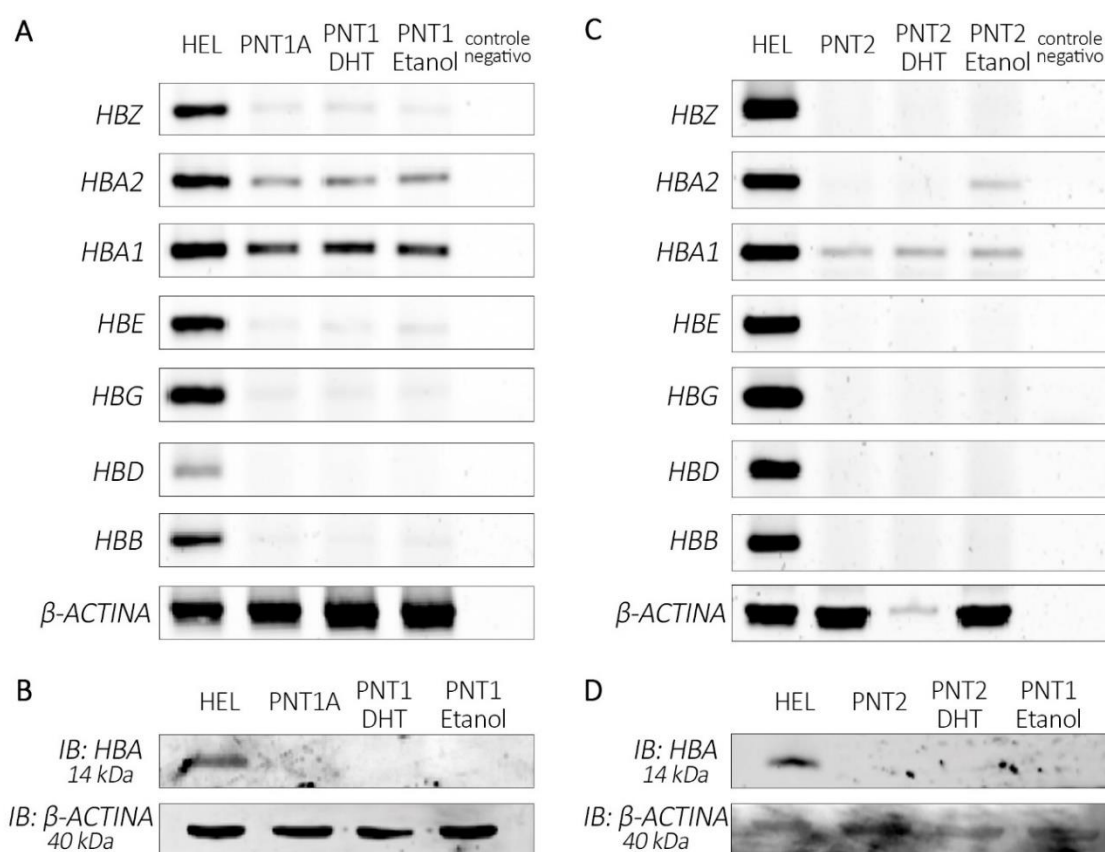


Figura 21: Expressão dos mRNAs de hemoglobinas nas linhagens PNT1A e PNT2 tratadas ou não com o andrógeno DHT. (A/C) Abundância relativa dos mRNAs de diferentes hemoglobinas. Uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de

mRNA das amostras. **(B/D)** Western blotting de HBA (14 kDa) e β -actina (40kDa, controle da quantidade de proteínas).

As linhagens LNCap, PNT1A e RWPE1 foram cultivadas tridimensionalmente em matriz rica em laminina. A expressão gênica de hemoglobinas não foi alterada nas linhagens LNCap e PNT1A (Figura 22A/B), mas curiosamente a expressão de *HBA2* e *HBA1* aumentou com o cultivo tridimensional na linhagem RWPE1 (Figura 22C).

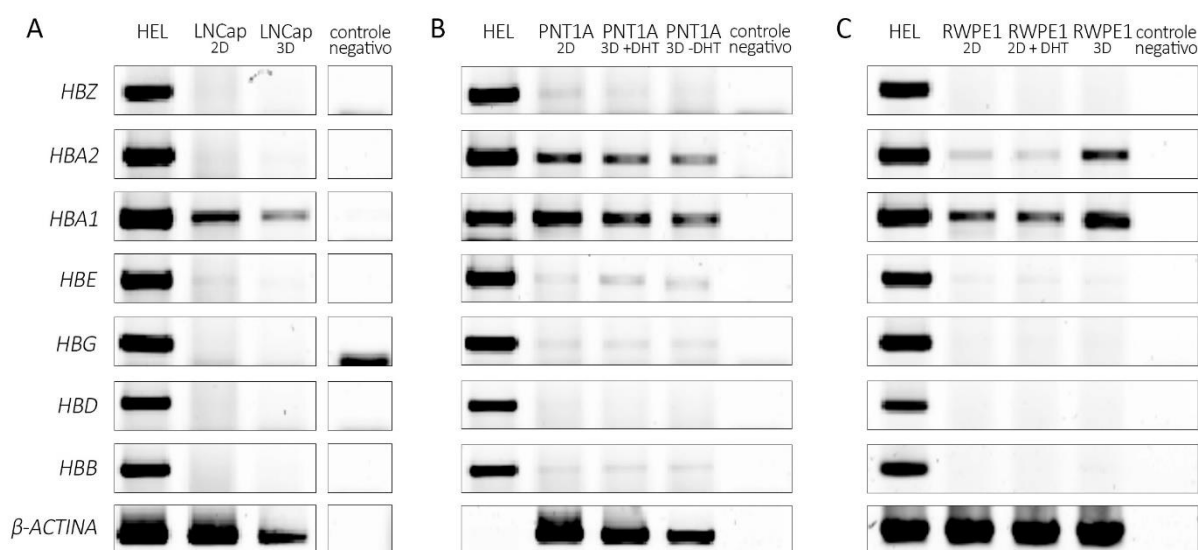


Figura 22: Abundância relativa de mRNAs de hemoglobinas em linhagens cultivadas tridimensionalmente em matriz rica em laminina. (A) LNCap, (B) PNT1A e (C) RWPE1. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como controle positivo da presença de hemoglobinas. Uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras

Decidimos então focar os estudos na linhagem RWPE1, cultivada em 2D ou 3D, um modelo interessante no qual é possível modular a expressão de algumas das hemoglobinas. O primeiro passo foi quantificar a variação de expressão relativa dos mRNAs, em comparação com a linhagem HEL, nosso controle positivo da expressão de hemoglobinas, através de PCR em tempo real (Figura 24A).

Com a sensibilidade do método pudemos notar que a linhagem RWPE1 apresenta a maioria das hemoglobinas, até mesmo as do cluster β , que não haviam

sido detectadas com o PCR comum – mesmo que em quantidades ínfimas quando comparadas à linhagem HEL. Além disso, pudemos confirmar que há um aumento significativo de quase 7 vezes na expressão do mRNA de *HBA1*, e uma tendência de aumento de 5 vezes na expressão do mRNA de *HBA2* quando as células são cultivadas tridimensionalmente em matriz rica em laminina, em comparação com o cultivo bidimensional (Figura 23). Mesmo com esse aumento ainda não foi possível identificar HBA por *Western blotting* (Figura 24).

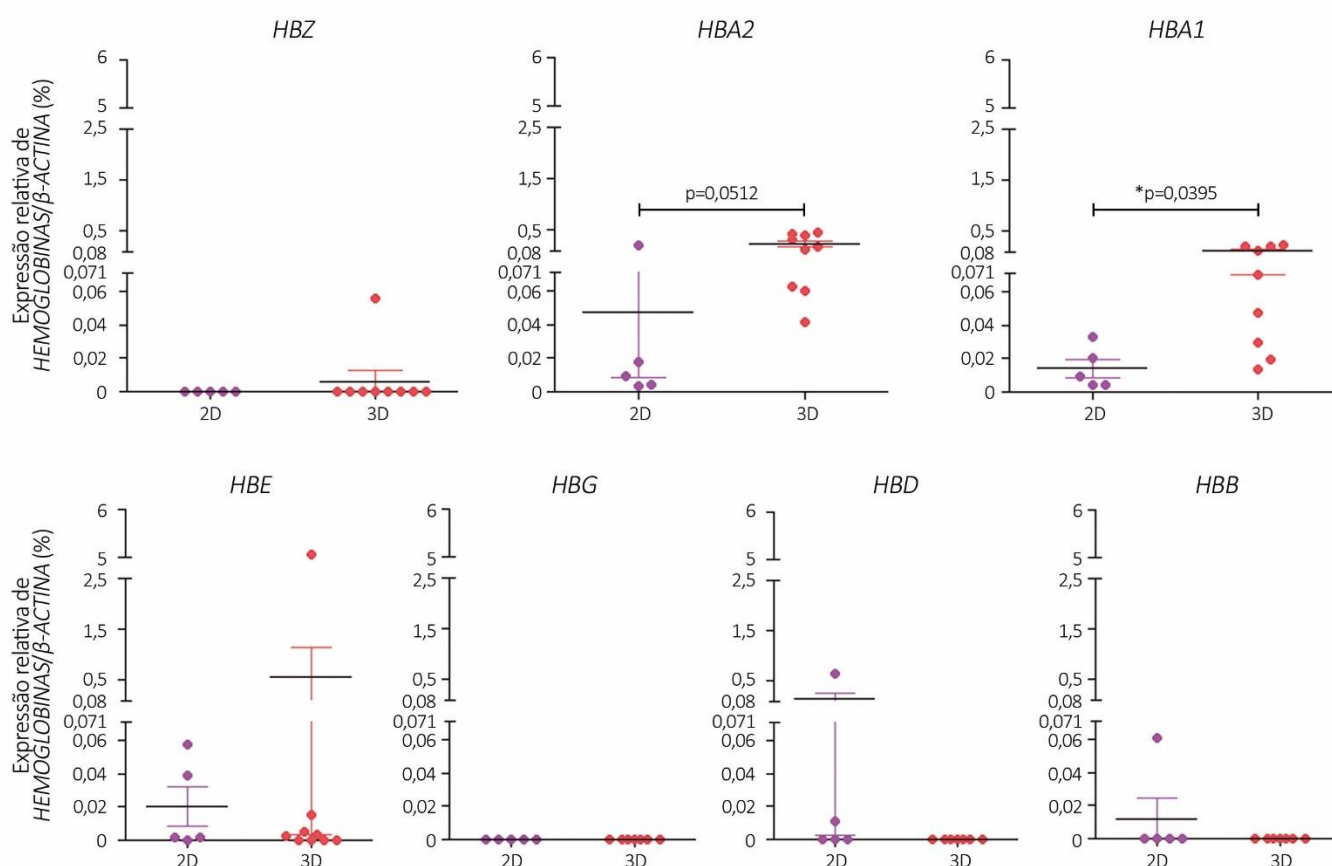


Figura 23: Abundância de hemoglobinas na linhagem RWPE1 cultivada bidimensionalmente ou tridimensionalmente em matriz rica em laminina. Expressão gênica relativa de hemoglobinas analisada por qRT-PCR. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como normalizador. RWPE1 2D n=5; RWPE1 3D n=9; *student t test*.

Decidimos fazer imunofluorescência das células cultivadas bi- e tridimensionalmente. Escolhemos as proteínas HBA (*cluster α*) e HBE (*cluster β*), um representante de cada *cluster* que apresentou maior quantidade de mRNA. Mesmo sendo expressas em diferentes estágios do desenvolvimento em células eritróides,

HBA e HBE teriam a capacidade de formar tetrâmeros funcionais. A intenção da imunofluorescência foi verificar se o mRNA é traduzido, além de verificar a localização subcelular das proteínas e uma possível colocalização (Figura 25).



Figura 24: Abundância de hemoglobinas na linhagem RWPE1 cultivada bidimensionalmente ou tridimensionalmente em matriz rica em laminina. Western blotting de HBA (14 kDa) e β-actina (40kDa, controle da quantidade de proteínas).

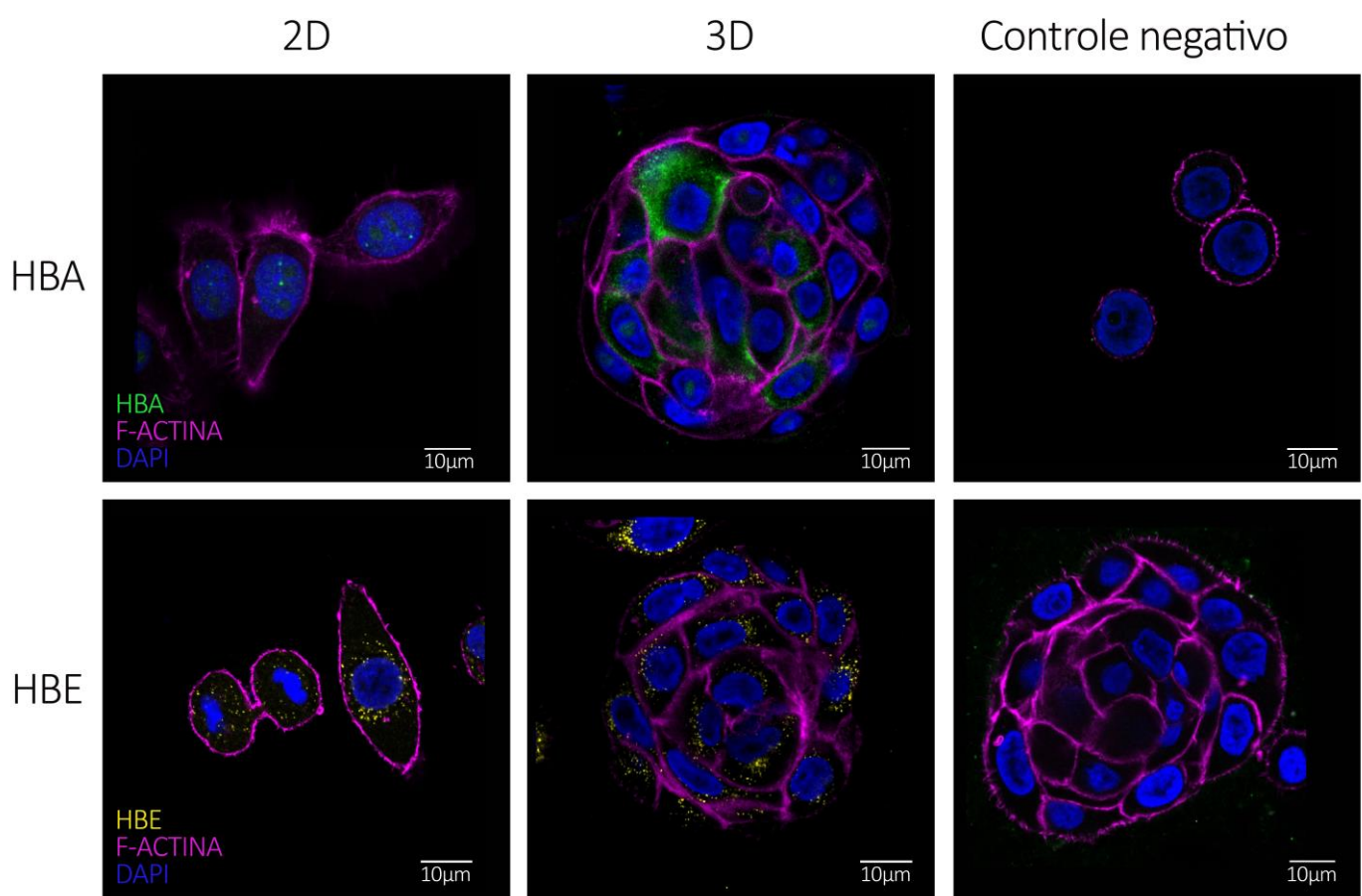


Figura 25: Localização subcelular de HBA e HBE. Imagens representativas de imunofluorescência de RWPE1 cultivada bidimensionalmente ou tridimensionalmente em

matriz rica em laminina com marcação para HBA (verde), HBE (amarelo), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).

Ambas as proteínas foram verificadas na linhagem RWPE1 cultivada tanto em 2D quanto em 3D. Portanto o mRNA é capaz de ser traduzido, as proteínas apenas são expressas em quantidades muito baixas para serem detectadas por *Western blotting*.

Interessantemente, boa parte de HBA e HBE se localizam em diferentes compartimentos celulares no cultivo bidimensional. HBA está localizada majoritariamente no núcleo, principalmente em regiões não marcadas pelo DAPI. HBA também está presente pontualmente em regiões marcadas com DAPI (Figura 26), e em menor quantidade no citoplasma. Já HBE está presente somente no citoplasma das células (Figura 25).

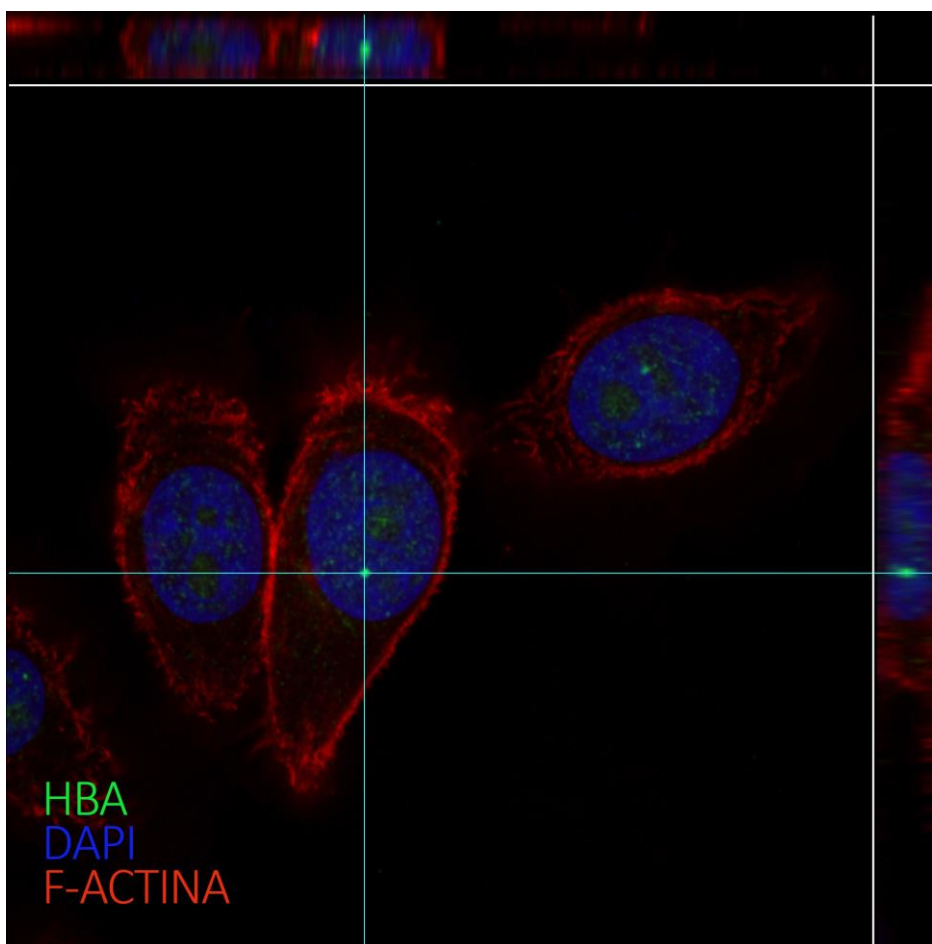


Figura 26: Corte ortogonal de uma célula com marcação para HBA (verde), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, vermelha).

Nos esferóides, HBE permanece presente no citoplasma de todas as células. Já HBA passa a estar presente no citoplasma de algumas delas, evento que não ocorre em todos os esferóides (Figura 25). É possível supor que o aumento na expressão dos mRNAs de HBA seja devido a essas células específicas. Curiosamente, células que estão em divisão apresentam HBE localizada nos polos onde ficam os centrossomos (Figura 27).

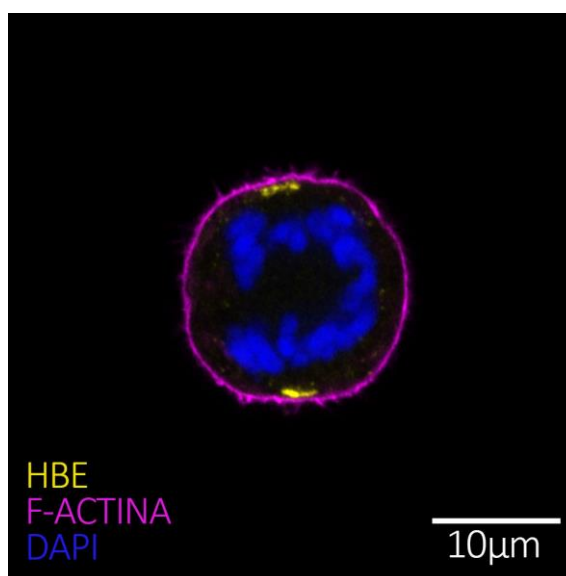


Figura 27: Localização subcelular de HBE em uma célula em divisão. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1 cultivada bidimensionalmente com marcação para HBE (amarelo), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).

Na tentativa de verificar colocalização entre HBA e HBE – o que poderia indicar uma possível formação de heterotetrâmeros – fizemos a reconstrução 3D dos esferóides (Figura 28), e também uma análise de colocalização tanto no cultivo bi-quanto no tridimensional. A Figura 29 mostra células duplamente marcadas para HBA e HBE, e mostra algumas das imagens nas quais as análises de colocalização foram feitas.

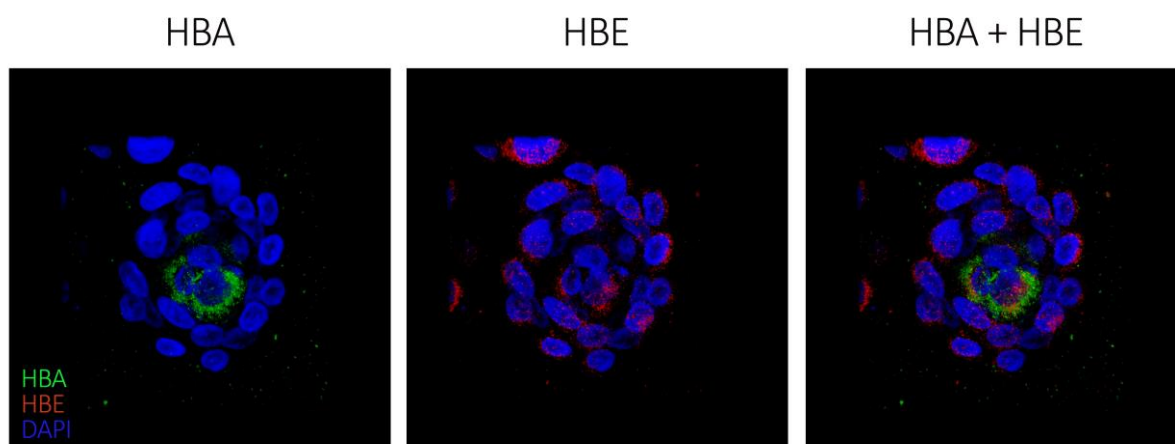


Figura 28: Reconstrução tridimensional de um esferóide. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1 cultivada tridimensionalmente em matriz rica em laminina com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho) e nuclear (DAPI, azul). Por ser uma reconstrução tridimensional as imagens não possuem barra de escala.

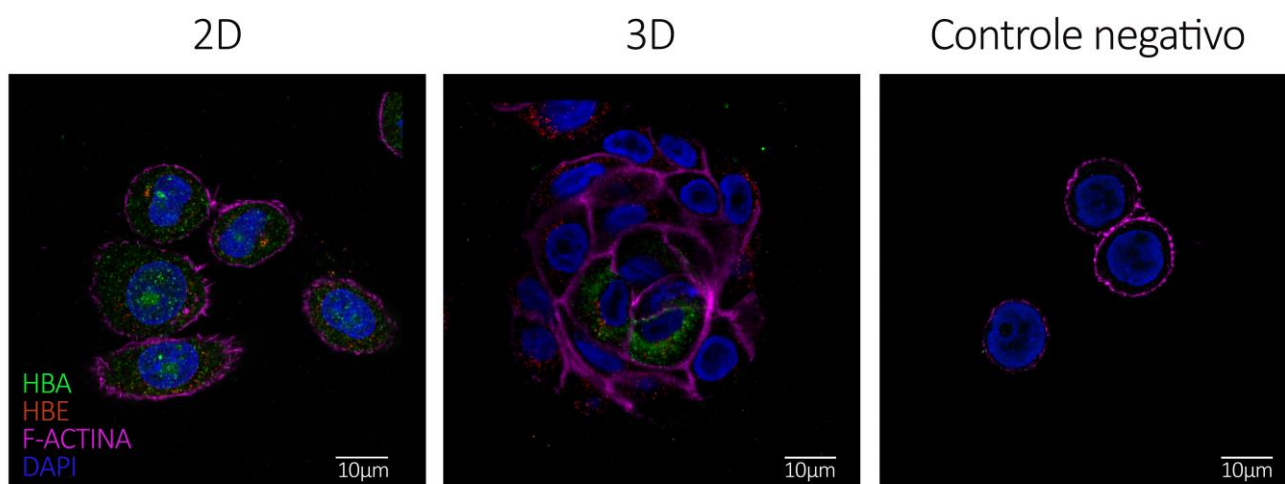


Figura 29: Localização subcelular de HBA e HBE. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1 cultivada bidimensionalmente ou tridimensionalmente em matriz rica em laminina com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).

No cultivo bidimensional, 3,3% do total de HBA colocaliza-se com HBE, enquanto 26,6% do total de HBE se colocaliza com HBA. Já no cultivo tridimensional, 2,7% do total de HBA colocaliza-se com HBE, enquanto 4,7% do total de HBE colocaliza-se com HBA, mesmo com a realocação de HBA para o

citoplasma de algumas células. Esses dados indicam que HBA e HBE não formam tetrâmeros nessa linhagem.

Como não foi possível fazer uma análise quantitativa do aumento da expressão protéica de HBA por *Western blotting*, decidimos fazer a quantificação da porcentagem de células que expressam HBA e HBE por citometria de imagem (Figura 30). Confirmando dados da imunofluorescência, HBE está presente na maioria das células cultivadas em 2D e 3D, com a mesma intensidade de fluorescência (Figura 30 A/C).

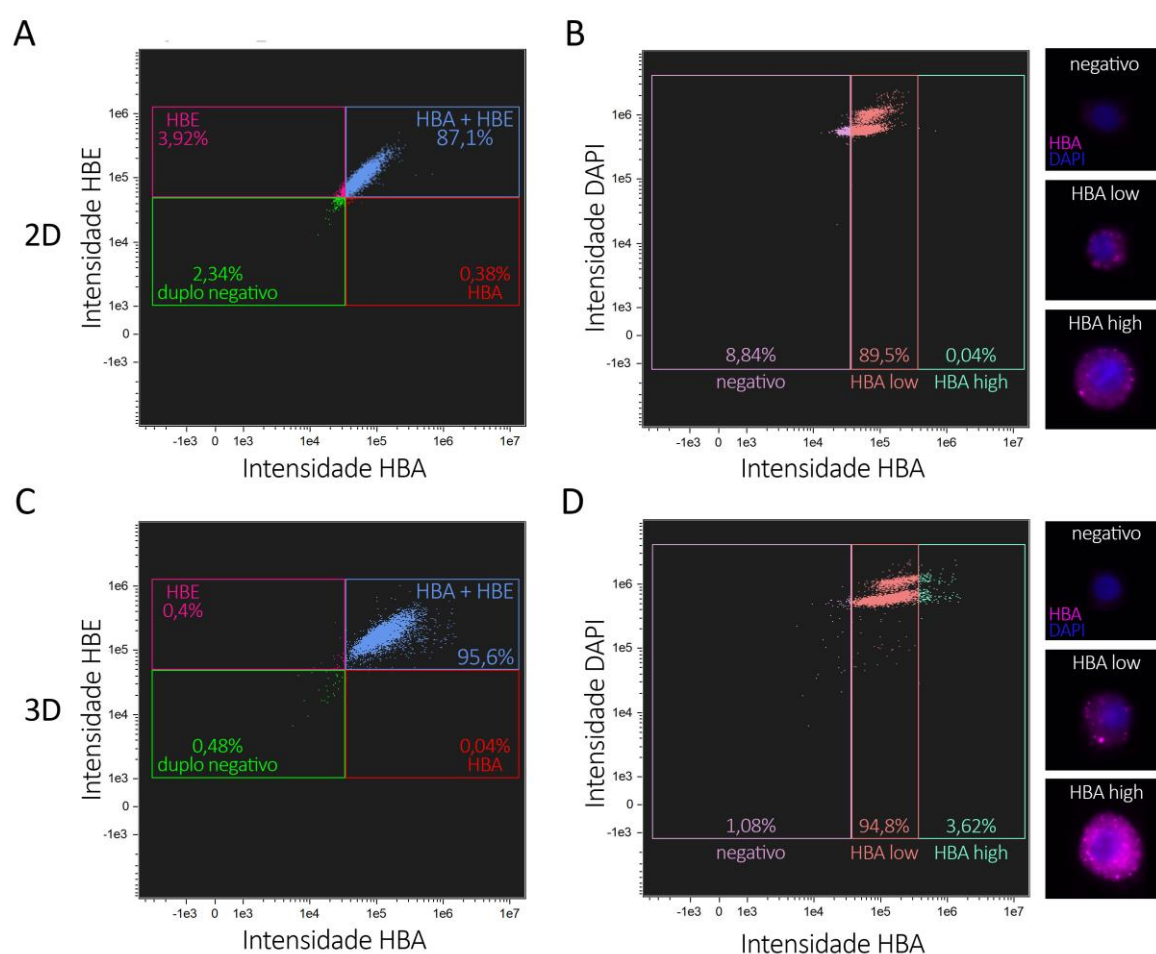


Figura 30: Porcentagem de células expressando HBA e/ou HBE. Citometria de imagem de células marcadas com HBA (magenta), HBE e DAPI (núcleo, azul). **(A/C)** Gráficos de intensidade de fluorescência HBE versus Intensidade de fluorescência HBA. **(B/D)** Gráficos de intensidade de fluorescência de DAPI versus Intensidade de fluorescência HBA, com imagens representativas dos três grupos analisados: HBA negativo, HBA low e HBA high.

HBA também está presente na maioria das células, porém é possível observar uma população de aproximadamente 3% das células cultivadas tridimensionalmente que apresenta uma intensidade de fluorescência maior, denominada de HBA high (Figura 30B/D). Essas células provavelmente são as mesmas encontradas na imunofluorescência, que apresentam aumento da quantidade de HBA, com realocação para o citoplasma.

Foi possível fazer uma análise de colocalização de HBA e HBE utilizando as imagens obtidas pelo citômetro (Figura 31). Dessa forma pudemos confirmar por outro método que não há colocalização entre as duas proteínas.

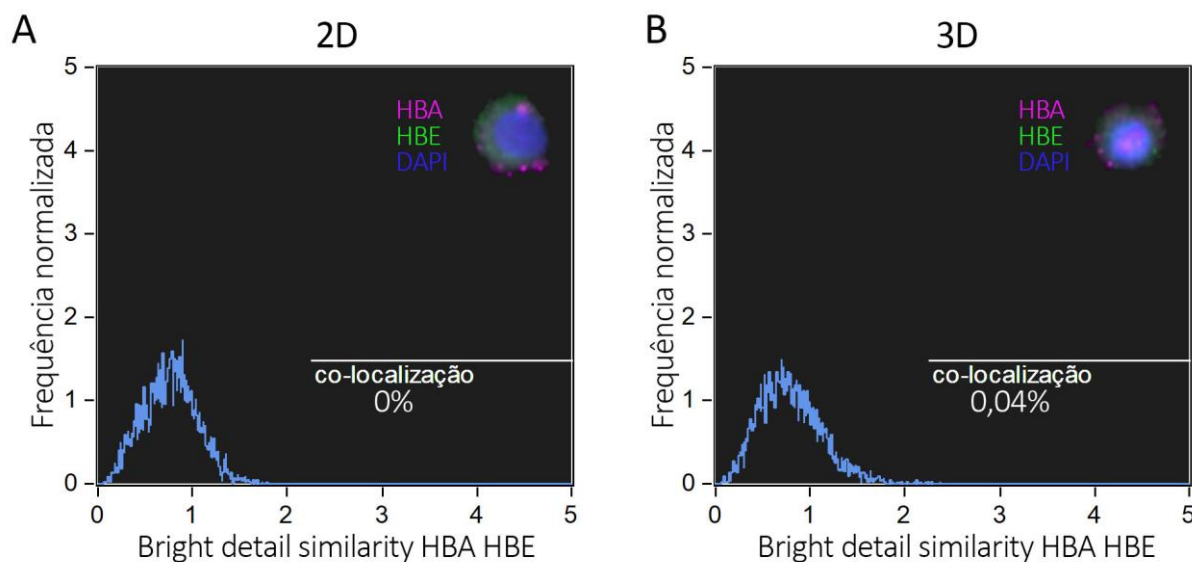


Figura 31: Análise de co-localização de HBA e HBE em células cultivadas (A) bidimensionalmente e (B) tridimensionalmente em matriz rica em laminina. Citometria de imagem de células marcadas com HBA (magenta), HBE (verde) e DAPI (núcleo, azul), com imagens representativas de cada um dos grupos analisados. A co-localização é calculada a partir de imagens de todas as células analisadas.

Regulação gênica de hemoglobinas em linhagem de próstata

Expressão gênica de fatores de transcrição

Na tentativa de identificar qual seria a possível regulação por trás da expressão basal de hemoglobinas na cultura 2D, e do aumento da quantidade de *HBA2* e *HBA1* na cultura 3D, realizamos PCR em tempo real de fatores de

transcrição que são importantes para a expressão desses genes em células eritróides. Como é possível verificar na Figura 32, em RWPE1 há expressão dos genes *GATA2* e *FOG-1*, mas não há aumento dessa expressão com o cultivo tridimensional. O papel de cada fator de transcrição e sua relação com a expressão de hemoglobinas será discutido em detalhe na sessão discussão. Por enquanto é suficiente dizer que a regulação de hemoglobinas na linhagem RWPE1 não parece ser similar à de células eritróides, pelo menos considerando a expressão de fatores de transcrição.

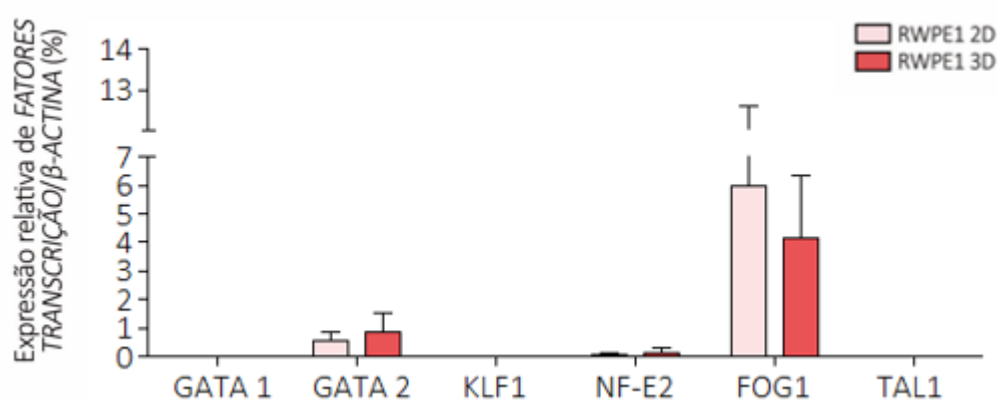


Figura 32: Abundância de fatores de transcrição eritróide específicos na linhagem RWPE1 cultivada em 2D ou 3D em matriz rica em laminina. Expressão gênica relativa analisada por qRT-PCR. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como normalizador e β -ACTINA foi utilizada como controle interno. RWPE1 2D n=3; RWPE1 3D n=6.

Apesar de RWPE1 ser nosso foco de estudo, também realizamos a análise de fatores de transcrição eritróides em outras linhagens de próstata, normais ou tumorais (Figura 33). Como era de se esperar, o fator de transcrição *GATA2*, importante no tecido prostático, está presente em todas as linhagens analisadas. De modo geral, todas as linhagens expressam alguns dos fatores de transcrição eritróides, sendo que a linhagem PNT1A é a que expressa todos eles, em maior ou menor grau. Como visto na Figura 19 e na Figura 21, PNT1A realmente é capaz de expressar hemoglobinas do cluster α , assim como RWPE1 e PNT2. Dessa forma, caso a expressão de hemoglobinas fosse regulada por esses fatores de transcrição, seria de se esperar que essas três linhagens apresentariam expressão gênica de

fatores em comum, e em maior quantidade que as linhagens LNCap e PC3, o que não é o caso.

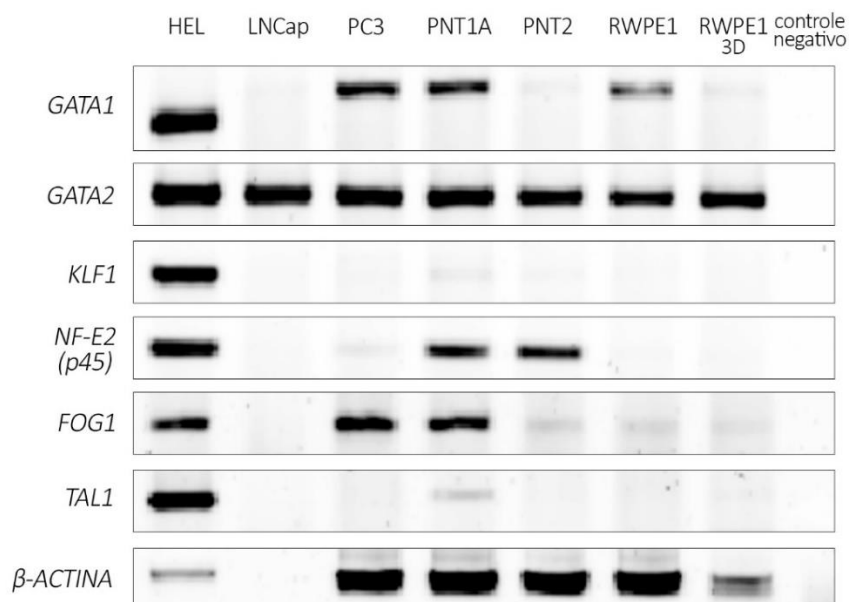


Figura 33: Abundância de mRNA de fatores de transcrição eritróide específicos. PCR dos fatores de transcrição *GATA1*, *GATA2*, *KLF1*, *NF-E2 (p45)*, *FOG1* e *TAL1*. Uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi utilizada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras.

Não sendo possível identificar reguladores eritróides que justificariam a presença e modulação da expressão de hemoglobinas na linhagem RWPE1, partimos para uma análise de elementos de regulação específicos de células prostáticas, ou de elementos relacionados às condições de cultivo da cultura tridimensional.

Testosterona e sinalização por receptor de andrógeno

O primeiro elemento de regulação de células prostáticas analisado foi a sinalização por receptor de andrógeno. Para isso, aprofundamos as análises feitas na linhagem RWPE1 tratada com DHT (diidrotestosterona), tanto no cultivo 2D quanto no 3D. O resultado da expressão relativa do mRNA de hemoglobinas nessas condições pode ser observado na Figura 34.

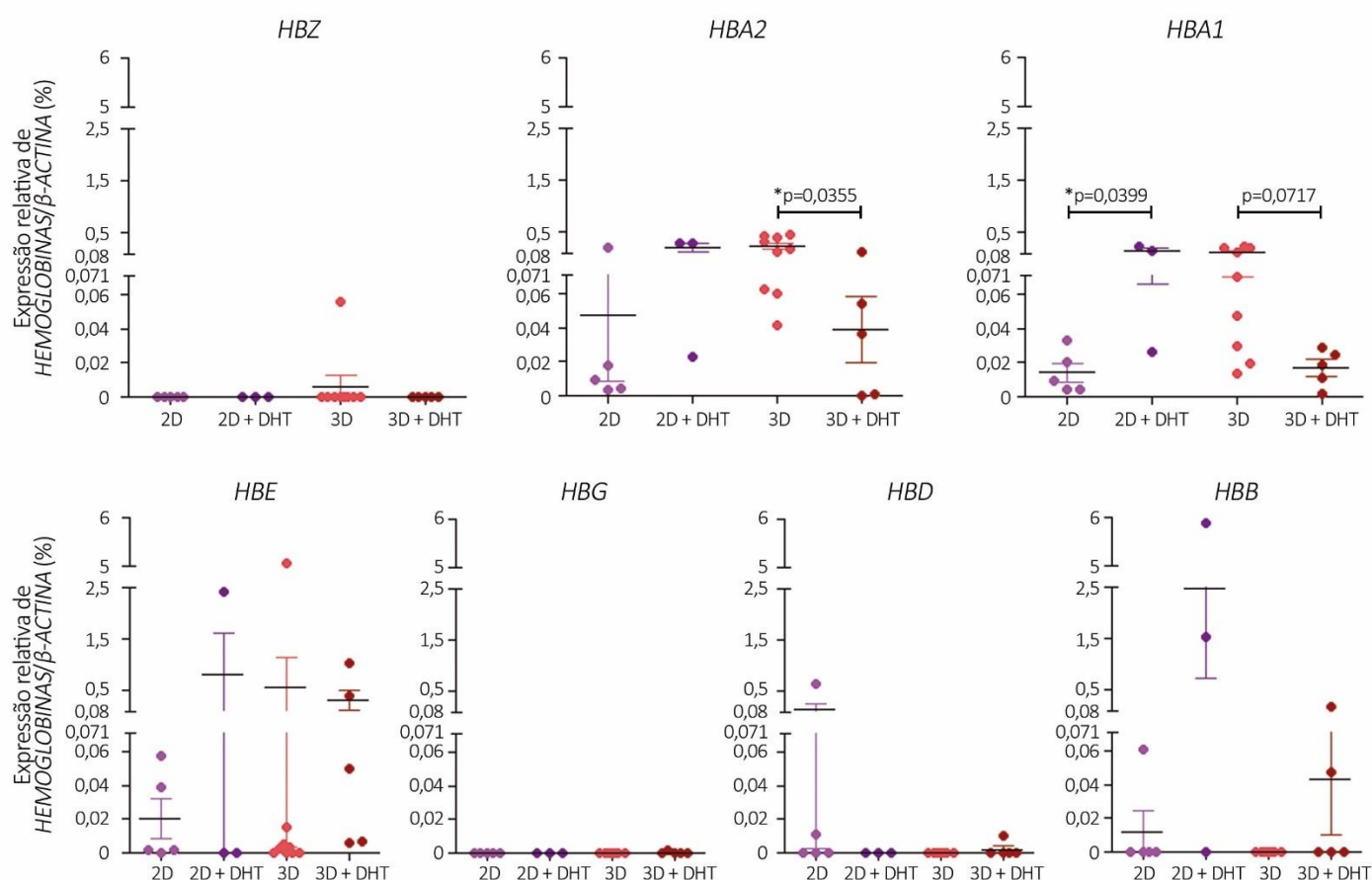


Figura 34: Abundância de hemoglobinas na linhagem RWPE1 cultivada em 2D ou 3D em matriz rica em laminina, na presença ou ausência de DHT. Expressão relativa do mRNA de hemoglobinas analisada por qRT-PCR. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como normalizador e β -ACTINA foi utilizada como controle interno. Os pontos sobrepostos às barras indicam os resultados individuais de cada experimento. RWPE1 2D $n=5$; RWPE1 2D + DHT $n=3$; RWPE1 3D $n=9$; RWPE1 3D + DHT $n=5$ Student's *t* test.

No geral, a expressão do mRNA das hemoglobinas não foi alterada com o tratamento com DHT. É interessante notar, porém, que há uma diminuição estatística de 80% de *HBA2* no cultivo 3D + DHT quando comparado com o cultivo 3D sem tratamento. A mesma tendência é observada para a expressão gênica de *HBA1*. Além disso, há um aumento estatístico de 8 vezes na expressão do mRNA de *HBA1* na cultura 2D tratada com DHT, em comparação à cultura não tratada. É muito interessante notar o efeito contrário que o tratamento com DHT produz na expressão gênica de *HBA* em células cultivadas bi- ou tridimensionalmente.

Depois dessa análise, foi necessário verificar se essas alterações na expressão dos mRNAs seriam acompanhadas por alterações na expressão protéica (Figura 35, Figura 36).

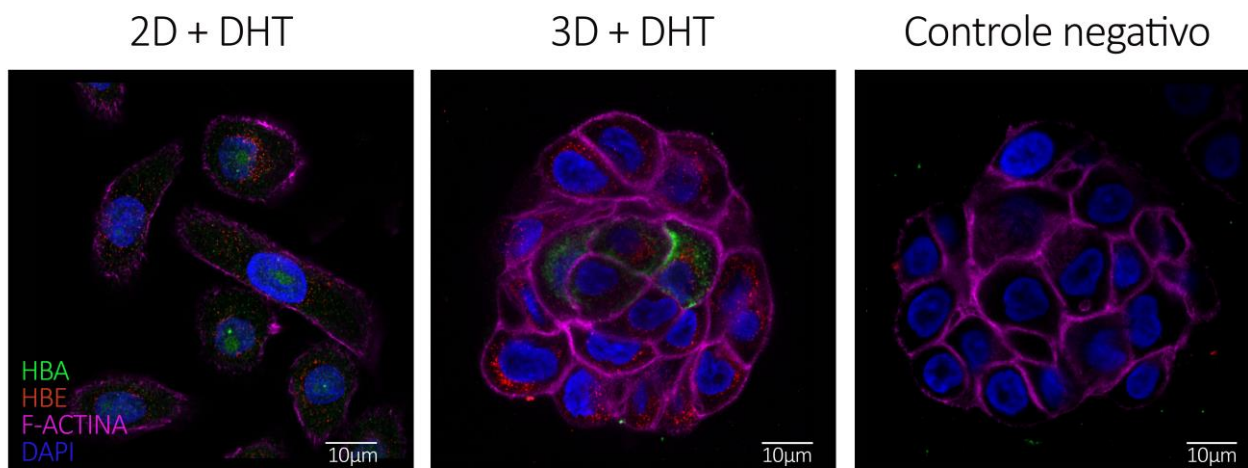


Figura 35: Localização subcelular de HBA e HBE em células tratadas com DHT. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1 cultivada em 2D ou 3D em matriz rica em laminina tratadas com DHT, com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).

Através das imagens obtidas na imunofluorescência, foi possível notar que a distribuição de HBA e HBE se mantém a mesma que nas células não tratadas com DHT. Na cultura bidimensional, HBA está concentrada no núcleo, e em menor quantidade no citoplasma; enquanto HBE está majoritariamente no citoplasma, preferencialmente na região perinuclear. Na cultura tridimensional, algumas células apresentam uma quantidade maior de HBA, localizada no citoplasma. É possível que as cinco horas de tratamento com DHT não tenham sido suficientes para eliminar as proteínas que já estavam prontas, e por isso o resultado tenha sido tão similar ao das células sem tratamento.

Novamente a análise de colocalização demonstrou que HBA e HBE não se colocalizam na linhagem RWPE1. No cultivo bidimensional, 4,8% do total de HBA colocaliza-se com HBE, enquanto 30,7% do total de HBE colocaliza-se com HBA. Já no cultivo tridimensional, 4,7% do total de HBA colocaliza-se com HBE, enquanto 3,2% do total de HBE colocaliza-se com HBA. É interessante notar que na cultura

bidimensional – tanto sem tratamento quanto com o tratamento com DHT – a porcentagem de HBE que se colocaliza com HBA é maior que no cultivo tridimensional.

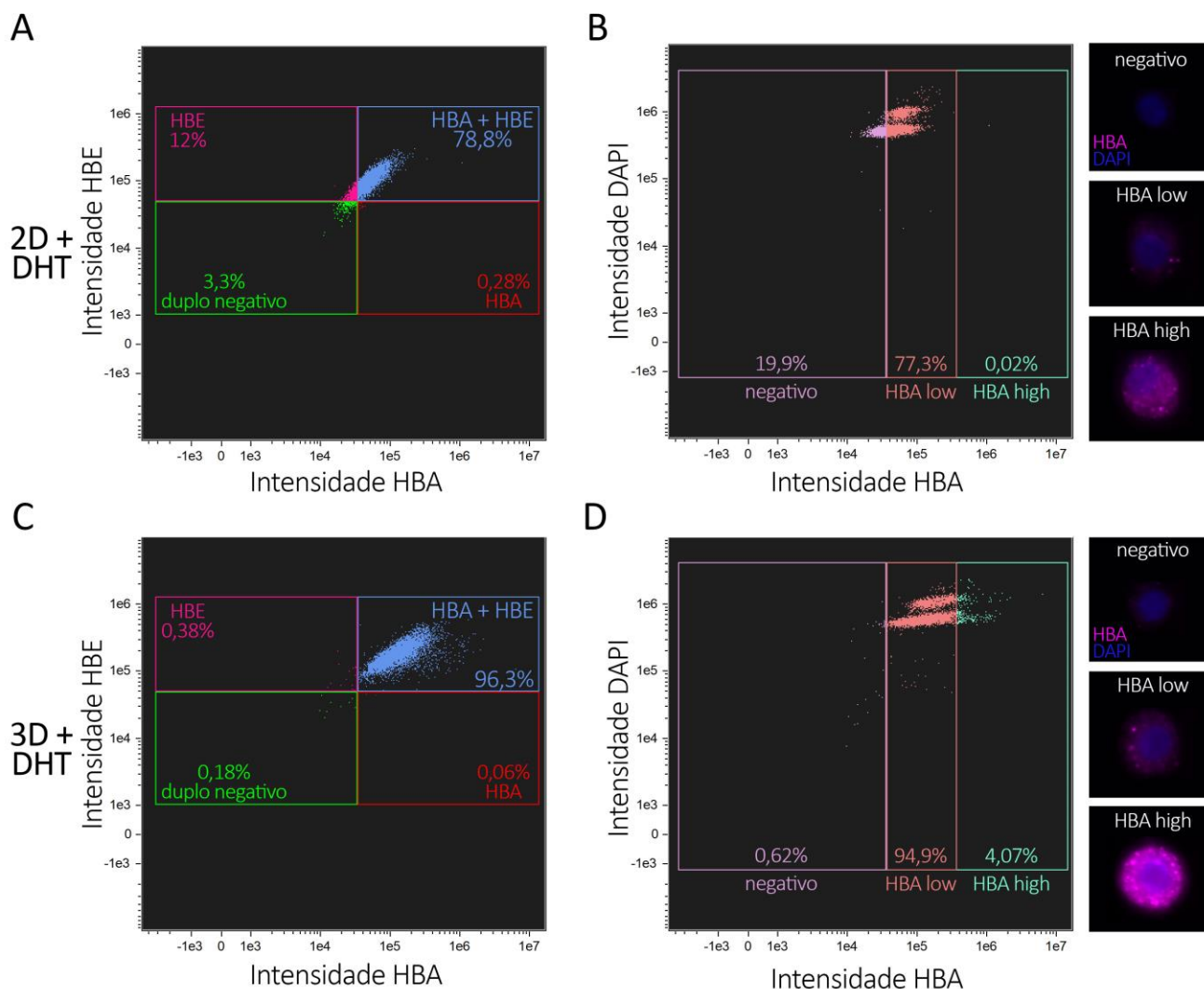


Figura 36: Porcentagem de células tratadas com DHT expressando HBA e/ou HBE. Citometria de imagem de células marcadas com HBA (magenta), HBE e DAPI (núcleo, azul). **(A/C)** Gráficos de intensidade de fluorescência HBE *versus* Intensidade de fluorescência HBA. **(B/D)** Gráficos de intensidade de fluorescência de DAPI *versus* Intensidade de fluorescência HBA, com imagens representativas dos três grupos analisados: HBA negativo, HBA low e HBA high.

Na citometria de imagem, de modo geral, os resultados também foram muito similares aos obtidos em células não tratadas. Apenas no caso da cultura

bidimensional foi interessante notar uma diminuição de aproximadamente 10% na porcentagem de células com dupla marcação, em relação a células não tratadas com DHT, que foi acompanhada de um aumento na quantidade de células positivas apenas para HBE (Figura 36A). Essa diminuição na quantidade de células marcadas com HBA é contrária ao aumento na quantidade de mRNA sugerido pelo PCR em tempo real.

Interessantemente, apesar de vermos uma redução significativa na expressão do mRNA de HBA nos esferóides tratados com DHT em comparação com os esferóides não tratados, a porcentagem de células HBA high se manteve praticamente a mesma (4%, Figura 36D), o que novamente pode ser atribuído ao tempo necessário para a eliminação das proteínas já prontas. Como era de se esperar, as proteínas HBA e HBE não se colocaram nas células tratadas com DHT (Figura 37).

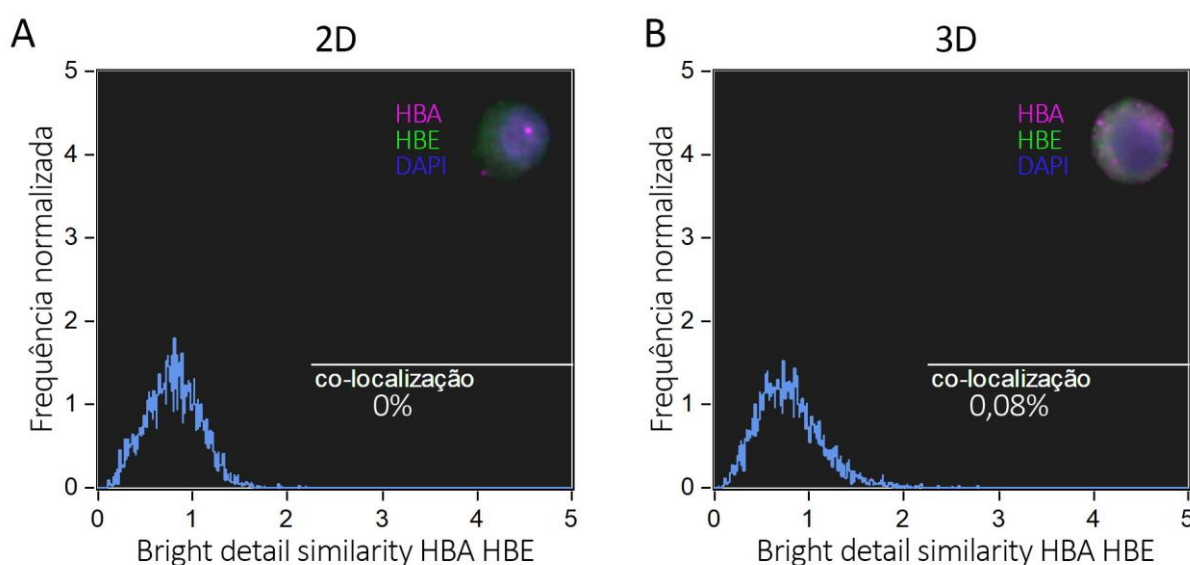


Figura 37: Análise de co-localização de HBA e HBE em células cultivadas (A) bidimensionalmente e (B) tridimensionalmente em matriz rica em laminina, ambas tratadas com DHT. Citometria de imagem de células marcadas com HBA (magenta), HBE (verde) e DAPI (núcleo, azul), com imagens representativas de cada um dos grupos analisados. A co-localização é calculada a partir de imagens de todas as células analisadas.

Nem todas as células da linhagem RWPE1 expressam receptor de andrógeno (RA). Decidimos então verificar se as células da cultura tridimensional cuja proteína HBA transloca-se para o citoplasma seriam as mesmas que apresentam RA e que poderiam responder ao DHT. Como é possível verificar na Figura 38, as células que expressam o RA – destacadas com as pontas de seta – não são necessariamente as células que apresentam HBA citoplasmático (Figura 38A/C). Na verdade, na Figura 38A é possível notar a única célula que apresenta AR e HBA citoplasmático. Como mencionado anteriormente, nem todos os esferóides apresentam as células com HBA citoplasmático (Figura 38B).

Durante as análises de imunofluorescência foi possível identificar dois esferóides tratados com DHT que apresentaram diferenças em relação a todos os outros encontrados (Figura 39). Essas diferenças provavelmente não tem relação com o tratamento com DHT, e são trazidas aqui somente a título de curiosidade.

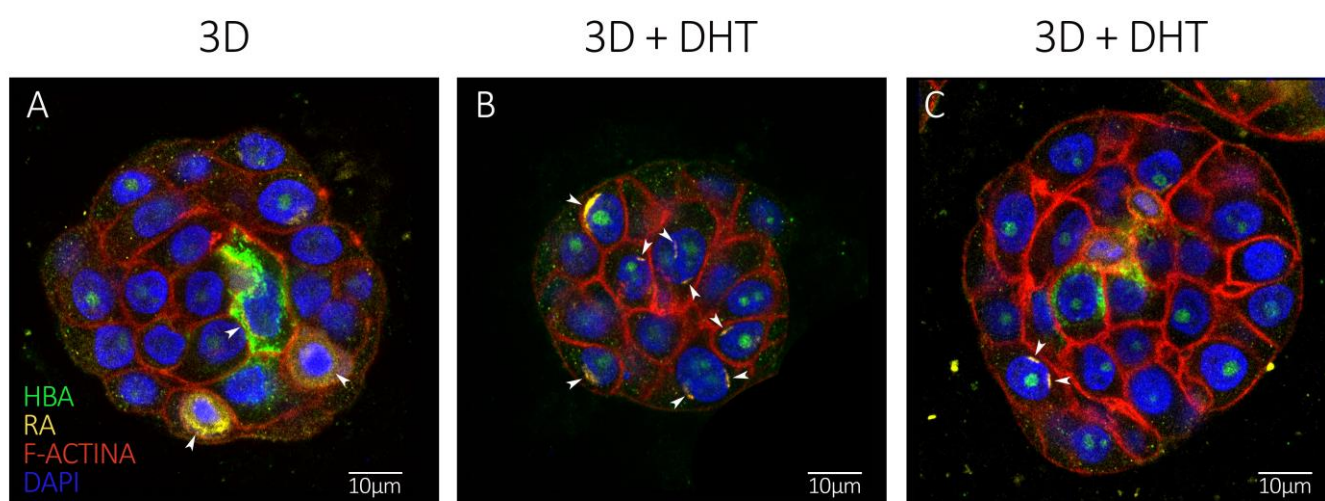


Figura 38: Localização subcelular de HBA e RA em esferóides cultivados com ou sem DHT. Imagem representativa de imunofluorescência com marcação para HBA (verde), RA (amarelo), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, vermelho). As pontas de seta apontam para a marcação de RA.

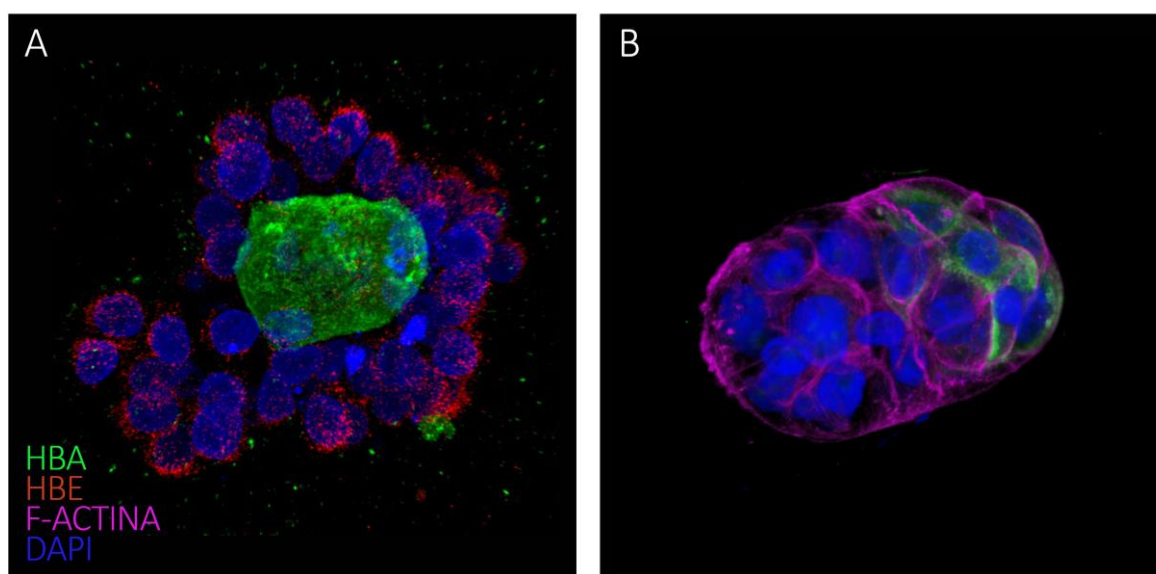


Figura 39: Reconstrução tridimensional de esferoides tratados com DHT. Imagens de imunofluorescências com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho), F-actina (magenta) e nuclear (DAPI, azul). **(A)** Reconstrução demonstrando a presença de uma célula gigante no centro do esferoide com altas quantidades de HBA no citoplasma; e **(B)** reconstrução demonstrando presença de HBA polarizada em um esferoide. Por ser uma reconstrução tridimensional, as imagens não tem barra de escala.

No primeiro caso (Figura 39A), toda a marcação em verde representa uma célula gigante que apresenta HBA citoplasmático, e cuja presença de HBE fica mascarada. Já no segundo caso (Figura 39B), o conjunto de células apresentando HBA citoplasmático encontra-se num dos polos do esferoide, diferentemente da maioria dos esferóides observados, cujas células que apresentam HBA citoplasmático tendem a ficar no centro.

Mapeamento da acessibilidade da cromatina

Na tentativa de mapear a acessibilidade da cromatina nos locus da α - e β -globina, incluindo os sítios de Hipersensibilidade à DNase I previamente descritos, verificando possíveis alterações entre os tratamentos (2D, 2D + DHT, 3D e 3D + DHT), realizamos o experimento de ATAC-seq (do inglês *Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing*).

Como descrito anteriormente em materiais e métodos, antes de realizar as análises propriamente ditas foi preciso verificar a qualidade do sequenciamento, através da análise de tamanho dos fragmentos e do enriquecimento do TSS (Figura 18). Com essa análise foi possível verificar que o sequenciamento das culturas em 2D estava adequado (Figura 40A-F), mas que, infelizmente, o sequenciamento das culturas em 3D não estava (Figura 40G-L).

A inadequação do sequenciamento das culturas em 3D também pôde ser observada na análise de distribuição dos picos, aqui representada por uma região, mas que é similar ao longo de todo o genoma. Enquanto na cultura bidimensional é possível ver picos claros, que correspondem a regiões abertas da cromatina, na cultura em 3D há muito ruído, sendo impossível identificar quais seriam os reais picos (Figura 41). Dessa forma, as análises subsequentes foram realizadas apenas com as culturas bidimensionais, tratadas ou não com DHT.

Inicialmente observamos o cromossomo 16, onde localizam-se os promotores distais (Figura 42) e proximais (Figura 43) do cluster α . Como é possível observar nas diferentes subpopulações eritróides, existem picos claros que correspondem aos sítios de hipersensibilidade HS48, HS40, HS33 e HS10, que são os considerados promotores distais do cluster α . Nessa região não foi possível identificar nenhum pico nas células RWPE1 cultivadas em 2D com ou sem tratamento com DHT (Figura 42).

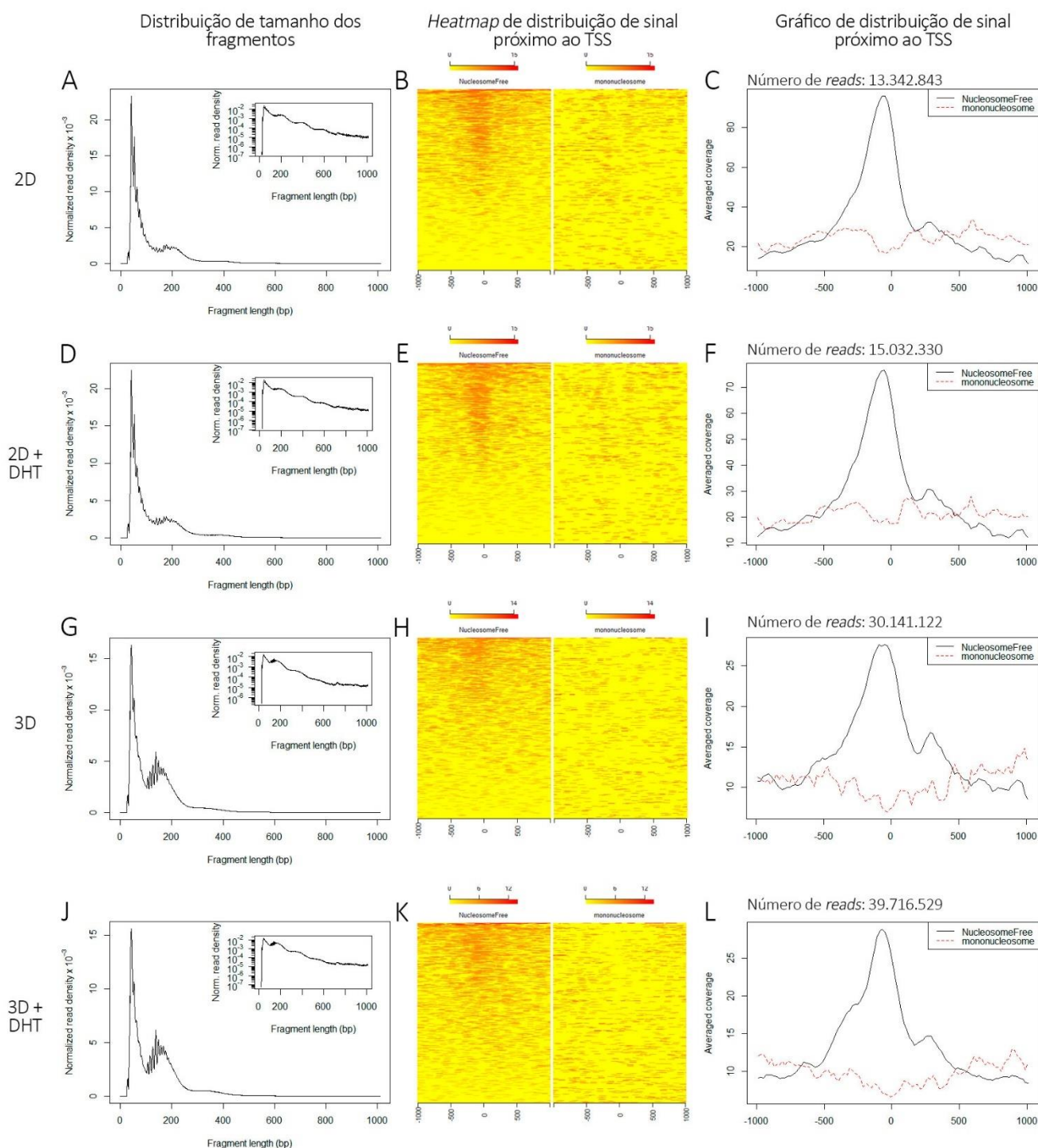


Figura 40: Métricas de qualidade do ATAC-seq. (A/D/G/J) Distribuição de tamanho dos fragmentos obtidos. O experimento ideal deve conter fragmentos menores de 100pb (regiões livres de nucleossomos) e fragmentos com periodicidade de 200pb (200pb, 400pb, 600pb - correspondendo a mono-, bi-, trinucleossomos e assim sucessivamente) [78, 79, 83]. **(B/E/H/K)** Heatmaps da distribuição de sinal próximo ao TSS, resultando de dados de fragmentos livres de nucleossomos e fragmentos ligados a nucleossomos. Idealmente, os fragmentos menores de 100pb devem estar imediatamente *upstream* aos TSSs [83]. **(C/F/I/L)** Histogramas demonstrando os dados dos heatmaps.

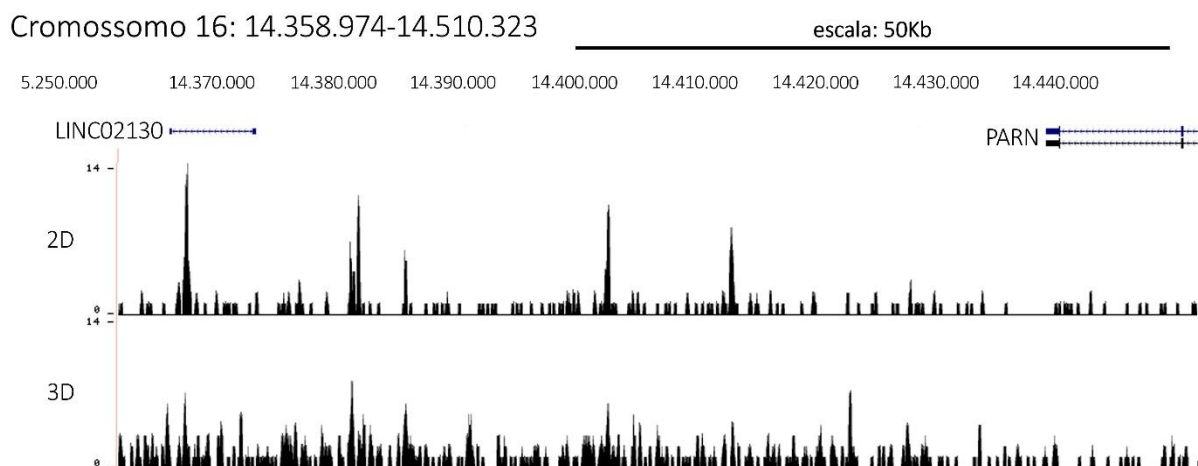


Figura 41: Picos resultantes do ATAC-seq de uma região representativa do genoma de células cultivadas em 2D e em 3D.

Corroborando com esse resultado, não encontramos também nenhum pico nos promotores proximais do cluster α , que deveriam estar logo antes do início de cada gene (*HBZ*, *HBA2* e *HBA1*) como ocorre nas subpopulações eritróides (Figura 43). Dessa forma, não encontramos nenhum indicativo de que a expressão de HBA esteja relacionada à abertura da cromatina.

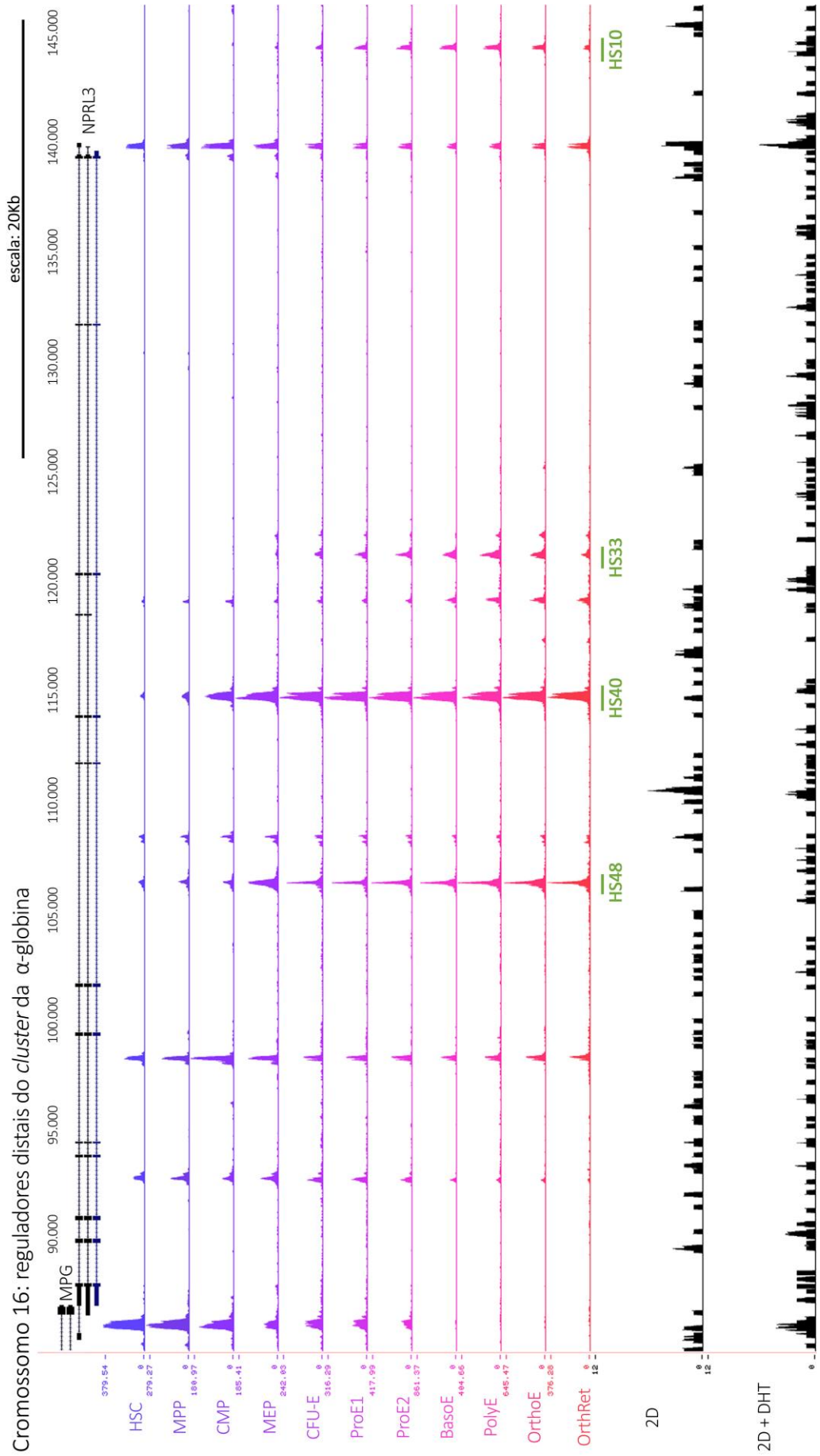


Figura 42: Abertura da cromatina nos promotores distais da α -globina de RWPE1 cultivada sem ou com tratamento com DHT, em comparação com subpopulações eritróides em diversos estágios de diferenciação. Resultados obtidos no ATAC-seq. Resultados das subpopulações eritróides foram reanalisados de publicações prévias [107, 108]. Os sítios de hipersensibilidade à DNaseI eritróides HS48, HS40, HS33 e HS10 estão anotados em verde.

Cromossomo 16: reguladores proximais do cluster da α -globina

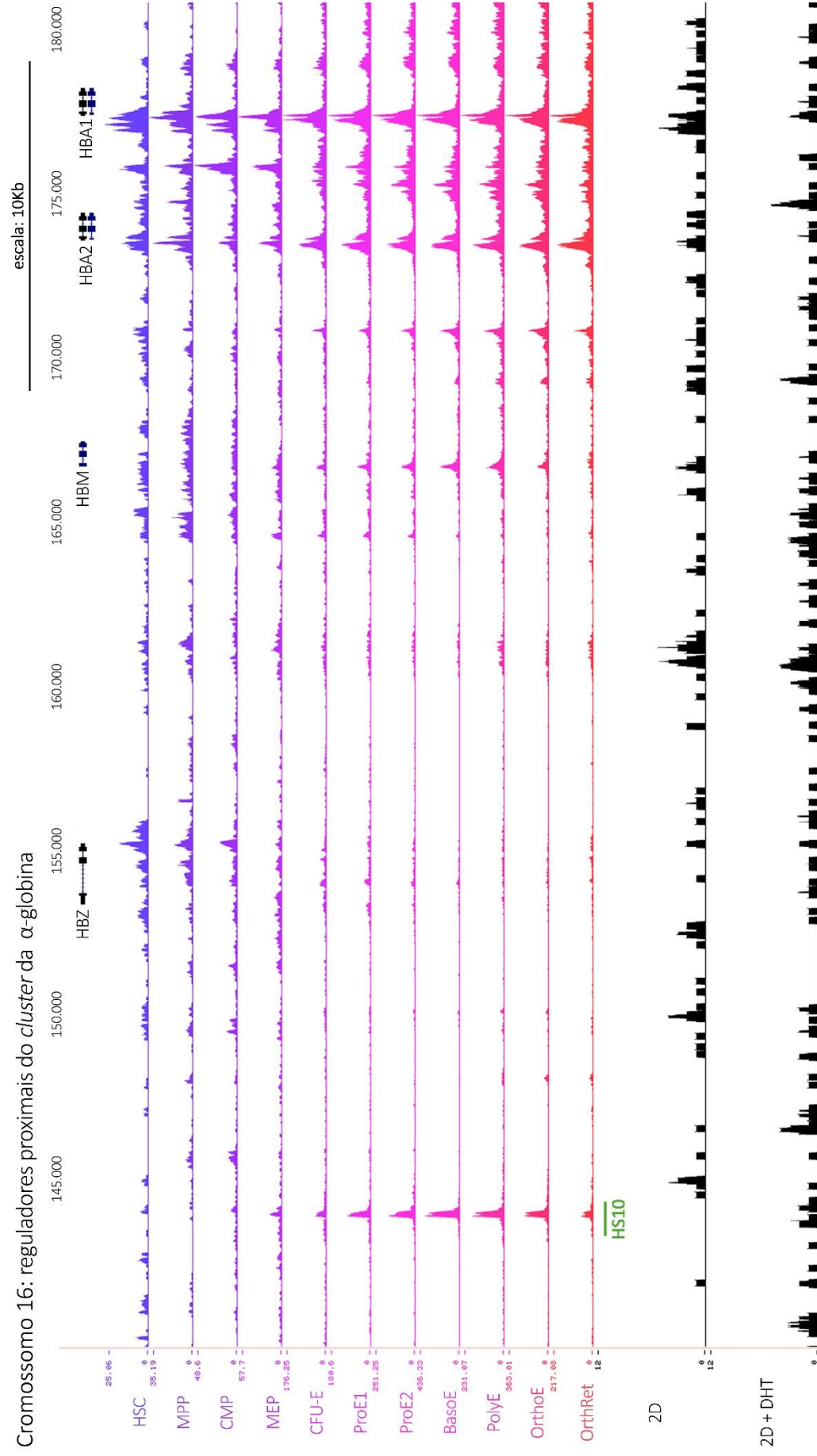


Figura 43: Abertura da cromatina nos promotores proximais da α -globina de RWPE1 cultivada sem ou com tratamento com DHT, em comparação com subpopulações eritróides em diversos estágios de diferenciação. Resultados obtidos no ATAC-seq. Resultados das subpopulações eritróides foram reanalisados de publicações prévias [107, 108]. O sítio de hipersensibilidade à DNaseI eritróide HS10 está anotados em verde.

Também analisamos o cromossomo 11, que apresenta os reguladores distais e proximais do cluster β (Figura 44). É importante ressaltar que o cluster β encontra-se na fita negativa e, portanto, tanto os promotores distais quanto os proximais estão representados à direita dos genes.

É possível observar picos claros nas subpopulações eritróides, que correspondem ao LCR (HS1-HS3). As culturas de RWPE1 tratadas ou não com DHT apresentam picos iguais entre si, sendo que o pico central (B) corresponde ao HS2. Mesmo que os outros picos (A e C) pareçam estar próximos de HS1 e HS3, eles precisariam estar exatamente no mesmo local para corresponderem a esses sítios de hipersensibilidade (Figura 44). A presença desses picos demonstra que a cromatina do promotor distal do cluster β encontra-se aberta em regiões que seriam similares a de células eritróides, mas também em regiões não descritas como sendo reguladoras desse cluster.

Como os picos A e C não correspondem a nenhum pico de regulação eritróide, verificamos quais seriam as sequências correspondentes (Figura 45), e os fatores de transcrição que poderiam ligar-se a elas (Tabela 7), em comparação ao pico B, que corresponde ao HS2.

O pico B, que corresponde ao HS2, apresenta predição somente para os fatores de transcrição eritróide específicos GATA1, GATA2 e GATA3; enquanto os picos A e C apresentam predição somente para o fator eritróide específico GATA1. Apesar disso, a similaridade de fatores de transcrição preditos entre os três picos é muito alta (Tabela 7).

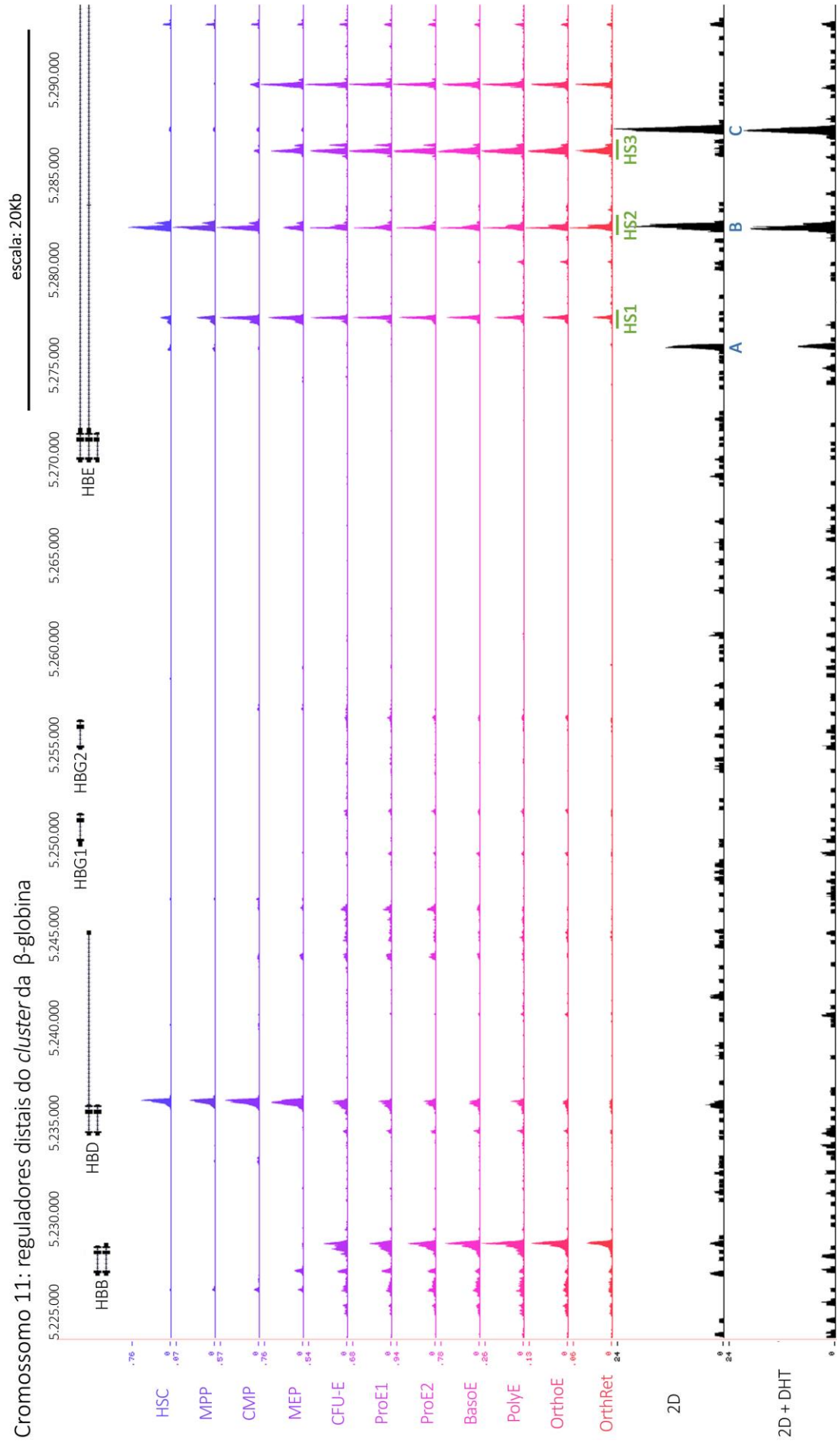


Figura 44: Abertura da cromatina nos promotores da β -globina de RWPE1 cultivada sem ou com tratamento com DHT, em comparação com subpopulações eritróides em diversos estágios de diferenciação. Resultados obtidos no ATAC-seq. Resultados das subpopulações eritróides foram reanalisados de publicações prévias [107, 108]. Os sítios de hipersensibilidade à DNaseI eritróide HS1, HS2 e HS3 estão anotados em verde.

Independentemente dos fatores de transcrição que possam se ligar aos promotores distais, não detectamos picos de abertura da cromatina em regiões proximais do cluster β (Figura 44). Dessa forma, é difícil acreditar que a abertura de HS2 – ou das sequências dos picos A e C – seja suficiente para promover a expressão desses genes, já que seus promotores proximais não estão abertos.

Pico A:

AGGAATGACTTGGATATCACAAGTCATAAATTCTGTGGCTGCCTGCAGGAAGCCTGTGGCTATTTCTAGTGTAATTGTAAAGAATG
AGAGAATAGACCATAACAAGTGTTCAAACCTGTTGCTTTCTGTTTTCACTTTTATTTTAAGTTCAGGGGTACATGTACAGGATGTGCA
GGTTTGTTACATAGATAAATGAATGTCAAGGGGGTTTGTGTATAGATGATCTCATCACTCAGGTATTACGCTTAGCATCCATTAGTG
ATTTTTCCTGATCCTCTCCTTCTCTCACCTCCACCCTCTGATAGGCCCCAGTATGCGTTGTTCCCTCTATGAGTCCATG

Pico B (HS2):

ATAACAACAAATATATATATATATATATATACGTATATGTGTATATATATATATATATTCAGGAAATAATATATTCTAGAATATGTCA
CATTCTGTCTCAGGCATCCATTTTCTTTATGATGCCGTTTGAGGTGGAGTTTTAGTCAGGTGGTCAGCTTCTCCTTTTTTGGCATCTG
CCCTGAAGCATCCTGCTGGGGACCCAGATAGGAGTCATCACTCTAGGCTGAGAACATCTGGGCACACACCCTAAGCCTCAGCATGA
CTCATCATGACTCAGCATTGCTGTGCTTGAGCCAGAAGGTTTGTCTAGAAGGTTACACAGAACCAGAAGGCGGGGGTGGGGCACTG
ACCCCGACAGGGGCCTGGCCAGAACTGCTCATGCTTGACTATGGGAGGTCACTAATGGAGACACAGAAATGTAACAGGAACTA
AGGAAAACTGAAGCTTATTTAATCAGAGATGAGGATGCTGGAAGGGATAGAGGGAGCTGAGCTTGAAAAAGTATAGTAATCATT
CAGCAAATGGTTTTGAAGC

Pico C:

TGAGGAGATTCCAGCAGGAAACACTTAAGAGAGGATCCCTGGAAGTTCGGGGCAGGAGGCTCCCTGTACATGAAGGAAACCTGCT
CAGCGTAGGCTCTAGGTTCTTCCCTACTCTTATCCAATGGGGCTTCTGATTTTAAGCCAGTCTTCACAAAGCCCCAGATTTTCTACATGC
TGGAGCCCTGAATGGGCAGGAAGCATTGCGGTTTCCATTTCACTCAGAGCTTTTCATACCTGCTTCCCATAGTTTGTCTCAACATT
TCTGTTGATAATCTGATTCATGCAACCAAGAATTATGAGAGAGCCTTCAGTCATGCCTAGGCCTGCATTTATTGTTGTGCATATGATG
GGGTAGCAGACAAGAAAACGTTAACAGCATAGACTTCTCAGAGCTATATGAGTTTGGGAATTAATCAAGACCAGCCTTTTGCTCAG
GGTAGAAATCCCTATAGGGATTTATT

Figura 45: Sequência genômica dos picos identificados na região promotora distal do cluster da β -globina. Os picos podem ser visualizados na Figura 44.

Tabela 7: Lista dos fatores de transcrição preditos para se ligarem às sequências dos picos A, B e C do cluster da β -globina. Os fatores de transcrição cor de rosa são similares entre os picos A e B, e os fatores de transcrição sublinhados são similares entre os picos B e C.

Pico A	Pico B (HS2)	Pico C
AP-1	<u>AP-1</u>	<u>AP-1</u>
AP-2alphaA	<u>AP-2alphaA</u>	<u>AP-2alphaA</u>
C/EBPalpha	<u>ATF3</u>	<u>ATF3</u>
C/EBPbeta	<u>C/EBPalpha</u>	<u>C/EBPalpha</u>
c-Ets-1	<u>C/EBPbeta</u>	<u>C/EBPbeta</u>
c-Ets-2	<u>c-Ets-1</u>	<u>c-Ets-1</u>
c-Jun	<u>c-Ets-2</u>	<u>c-Ets-2</u>
c-Myb	c-Fos	<u>c-Jun</u>
EBF	<u>c-Jun</u>	<u>c-Myb</u>
Elk-1	<u>c-Myb</u>	<u>E2F-1</u>
ENKTF-1	COUP-TF1	<u>EBF</u>
FOXP3	<u>E2F-1</u>	<u>Elk-1</u>
GATA-1	<u>EBF</u>	<u>ENKTF-1</u>
GR	<u>Elk-1</u>	<u>FOXP3</u>
GR-alpha	<u>ENKTF-1</u>	<u>GATA-1</u>
GR-beta	ER-alpha	<u>GR</u>
HNF-1B	ETF	<u>GR-alpha</u>
HNF-1C	<u>FOXP3</u>	<u>GR-beta</u>
HNF-3alpha	<u>GATA-1</u>	<u>HNF-1A</u>
HOXD10	GATA-2	<u>HNF-1C</u>
HOXD9	GATA-3	<u>HNF-3alpha</u>
IRF-1	<u>GR</u>	<u>IRF-1</u>
MAZ	<u>GR-alpha</u>	<u>LEF-1</u>
MEF-2A	<u>GR-beta</u>	<u>NF-1</u>
NF-AT1	<u>HNF-1B</u>	<u>NF-AT1</u>
NF-AT2	<u>HNF-1C</u>	<u>NF-AT2</u>
NFI/CTF	<u>HNF-3alpha</u>	<u>NFI/CTF</u>
p53	HNF-4alpha	NF-kappaB
Pax-5	HOXD10	<u>NF-Y</u>
PEA3	HOXD9	<u>p53</u>
PPAR-alpha:RXR-alpha	<u>IRF-1</u>	<u>Pax-5</u>
PR A	<u>MEF-2A</u>	POU2F2 (Oct-2.1)
PR B	<u>NF-1</u>	<u>PPAR-alpha:RXR-alpha</u>
PXR-1:RXR-alpha	<u>NF-AT1</u>	<u>PR A</u>
RAR-beta	<u>NF-AT2</u>	<u>PR B</u>
RXR-alpha	<u>NFI/CTF</u>	<u>RXR-alpha</u>
STAT1beta	<u>p53</u>	<u>SRY</u>
STAT4	<u>Pax-5</u>	<u>STAT1beta</u>
T3R-beta1	<u>PEA3</u>	<u>STAT4</u>
TFIID	<u>PPAR-alpha:RXR-alpha</u>	<u>TCF-4E</u>
TFII-I	<u>PR A</u>	<u>TFIID</u>
VDR	<u>PR B</u>	<u>TFII-I</u>
XBP-1	<u>RXR-alpha</u>	<u>XBP-1</u>

YY1	STAT1beta	YY1
	STAT4	
	TFIID	
	TFII-I	
	USF2	
	WT1	
	XBP-1	
	YY1	

Sinalização da matriz extracelular

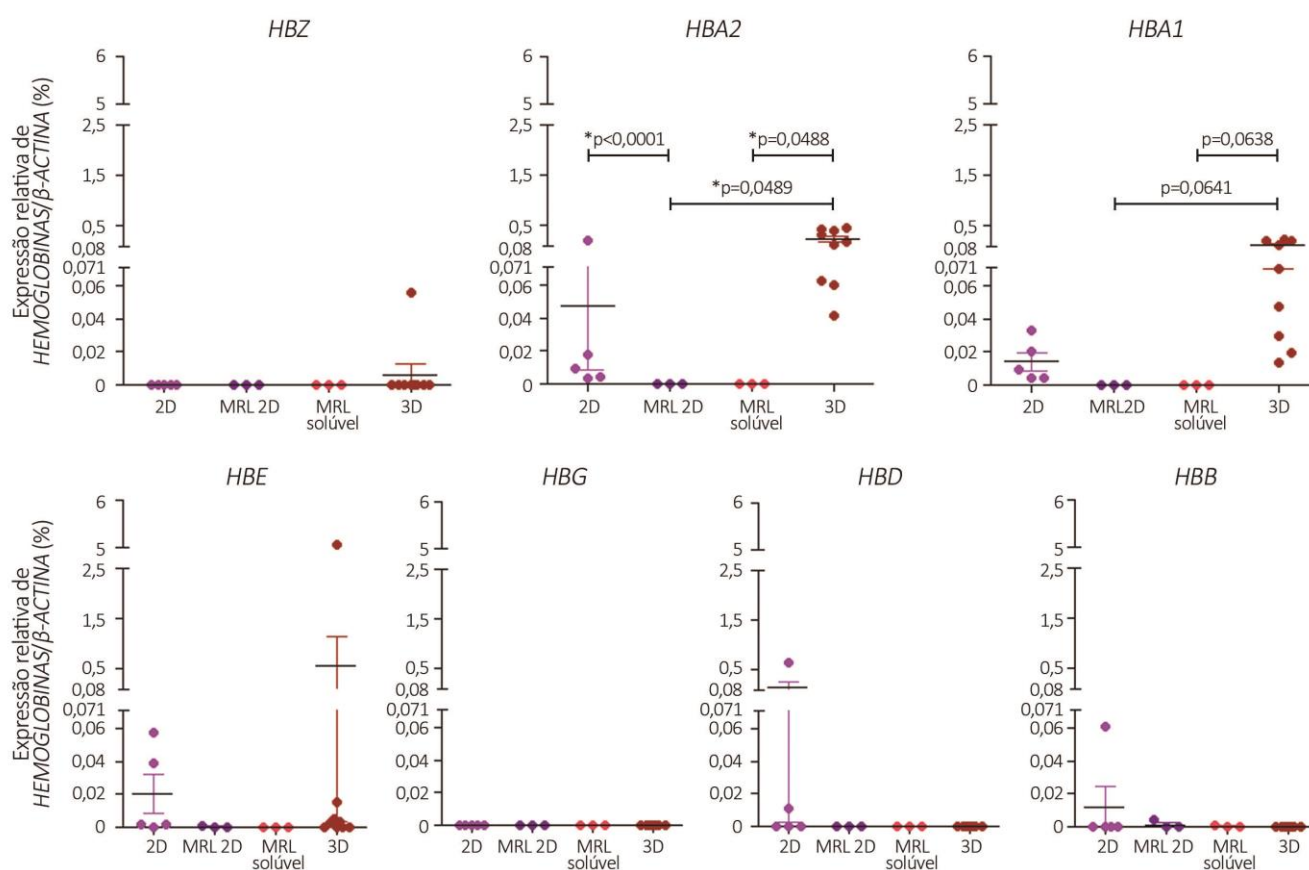


Figura 46: Abundância de hemoglobinas na linhagem RWPE1 cultivada em 2D ou em 3D na presença de matriz rica em laminina (MRL). Expressão relativa dos genes das hemoglobinas analisada por qRT-PCR. A linhagem de eritroleucemia HEL foi utilizada como normalizador e β -ACTINA foi utilizada como controle interno. RWPE1 2D n=5; RWPE1 matriz rica em laminina 2D n=3; RWPE1 matriz rica em laminina solúvel n=3; RWPE1 3D n=9; *Student's t test*.

Ainda sem a identificação de qual seria o responsável pelo aumento da expressão dos mRNAs de *HBA1* e *HBA2* nos esferóides, bem como pela localização citoplasmática da proteína em algumas células, decidimos verificar se haveria alguma relação com a sinalização de elementos da matriz extracelular, já que para a formação dos esferóides as células foram cultivadas em geltrex. Para isso, cultivamos as células por 24h em mais duas condições, descritas em detalhe em materiais e métodos: cultivo bidimensional sobre o matriz rica em laminina, e cultivo bidimensional com matriz rica em laminina solubilizado no meio de cultura.

O primeiro passo foi verificar a expressão dos mRNAs das hemoglobinas, em comparação com as culturas em 2D e em 3D (Figura 46). É possível notar que a expressão gênica de *HBA2* é estatisticamente menor nos cultivos em matriz rica em laminina 2D e matriz rica em laminina solúvel, em comparação tanto com o cultivo bidimensional quanto com o cultivo tridimensional. A expressão do mRNA de *HBA1* também demonstra uma tendência de ser menor nos cultivos em matriz rica em laminina 2D e matriz rica em laminina solúvel quando comparada ao cultivo 3D. As outras hemoglobinas não apresentam alteração de expressão.

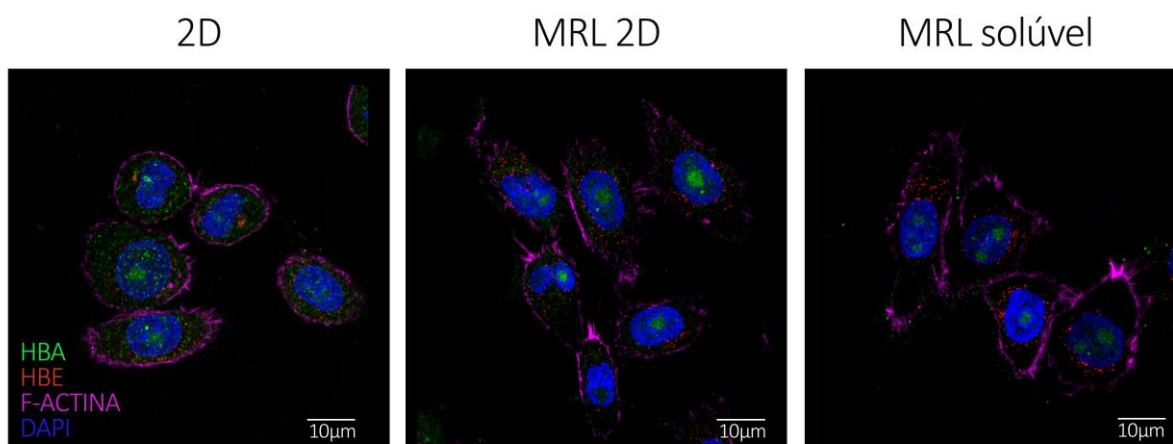


Figura 47: Localização subcelular de HBA e HBE em células cultivadas em 2D sobre matriz rica em Laminina (MRL) ou com matriz rica em laminina solúvel. Imagem representativa de imunofluorescência de RWPE1, com marcação para HBA (verde), HBE (vermelho), nuclear (DAPI, azul) e F-actina (faloidina, magenta).

Esse é um dado muito interessante, pois indica que não há influência da matriz extracelular na transcrição de *HBA2* e *HBA1*, e que provavelmente algum

fator relacionado à conformação tridimensional dos esferoides seria responsável pelo aumento dessa expressão e alteração na localização subcelular de HBA. Outro indicativo disso é que a distribuição protéica de HBA e HBE manteve-se a mesma da cultura em 2D (Figura 47).

Hipóxia e sinalização por HIF-1 α

Como a maioria das células que apresentou HBA citoplasmático estava presente no centro dos esferóides, decidimos confirmar se as camadas de células adjacentes seriam suficientes para submetê-las à hipóxia e, assim, aumentar a expressão de hemoglobinas. Para isso realizamos uma imunofluorescência de HBA e HIF-1 α nos esferoides (Figura 48).

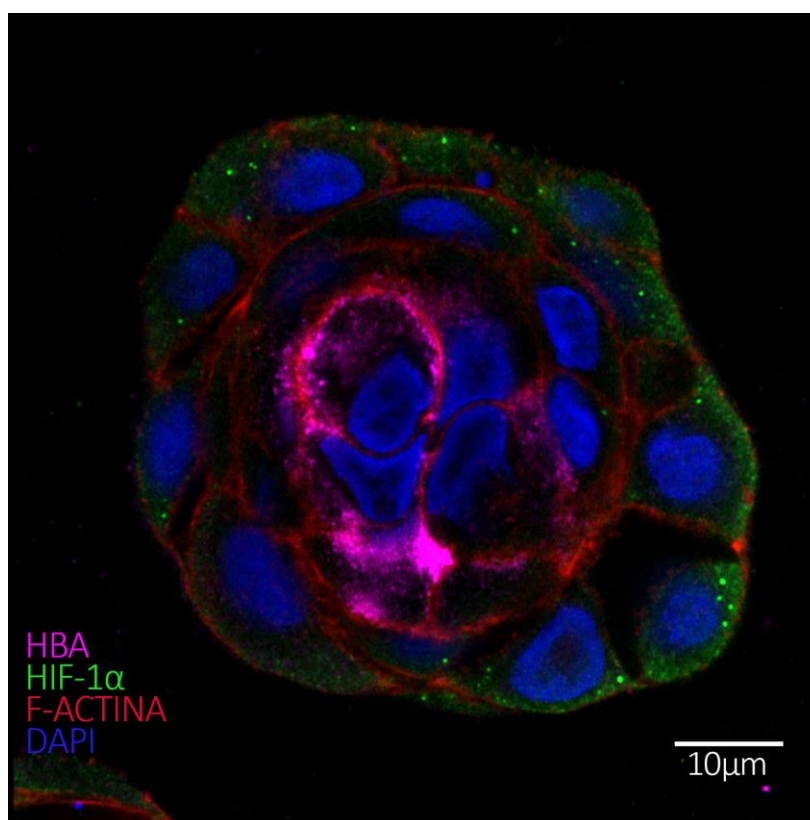


Figura 48: Localização subcelular de HBA e HIF-1 α em esferoide de RWPE1. Imunofluorescência com marcação para HBA (magenta), HIF-1 α (verde), F-actina (faloidina, vermelho) e nuclear (DAPI, azul).

Pudemos notar que as células que apresentam HBA não são as mesmas que apresentam HIF-1 α . Como já descrito, as que apresentam HBA estão concentradas no centro dos esferóides, enquanto as que apresentam HIF-1 α encontram-se na periferia. Além disso, HIF-1 α está localizado no citoplasma, indicando que mesmo as células que apresentam essa proteína não estão sob efeito de hipóxia (Figura 48). Dessa forma, podemos concluir que nenhuma das células dos esferóides está sob o efeito de hipóxia, e que, portanto, esse não é o fator indutor do aumento da expressão gênica de *HBA* e da localização citoplasmática da proteína em algumas células.

Atividade do promotor de HBG

A literatura indica que há atividade do promotor da HBG na próstata de camundongos, mais especificamente nas células basais p63⁺. Dessa forma, decidimos verificar se as células que apresentam HBA citoplasmática seriam as células basais p63⁺, apesar de HBA e HBG serem de clusters diferentes, e apresentarem promotores distintos.

Como era de se esperar, as células marcadas com p63 Δ N estão predominantemente na periferia dos esferóides, e não são necessariamente as que apresentam HBA citoplasmático (Figura 49). É possível notar no detalhe ampliado do esferoide representado na figura que apenas uma das células apresenta ambas as proteínas.

Além das células p63⁺ da próstata de camundongos, dados da literatura indicaram também que a linhagem DU145 apresenta alta atividade do promotor da HBG em contraste com a linhagem LNCaP. Esse promotor teve sua sequência delimitada a uma pequena quantidade de nucleotídeos, que apresenta sítios de ligação para os fatores de transcrição da família GATA, POU2F1, KLF1 e c-Myb (Figura 10).

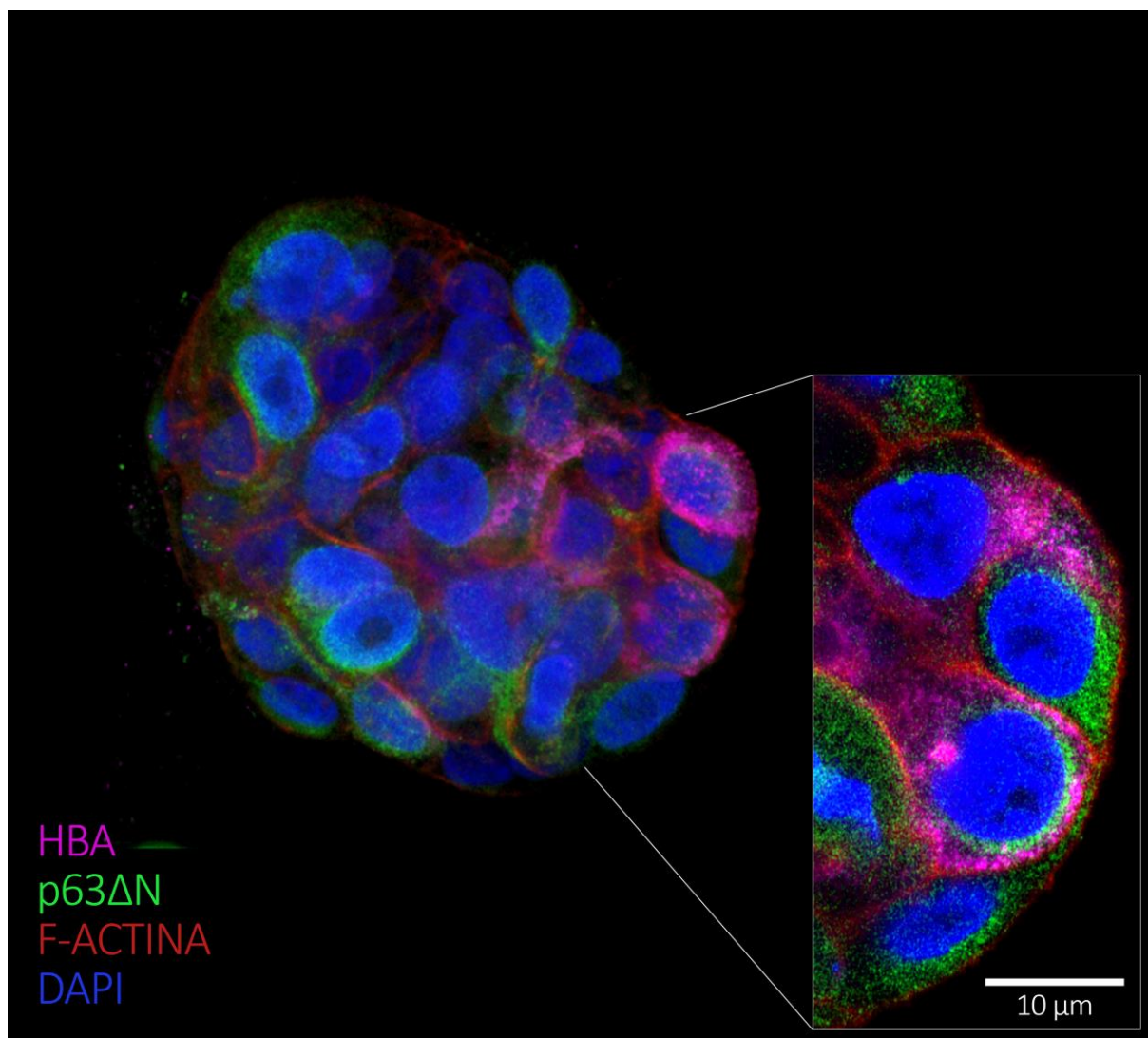


Figura 49: Localização subcelular de HBA e p63ΔN em esferoide de RWPE1. Reconstrução tridimensional de imunofluorescência com marcação para HBA (magenta), p63ΔN (verde), F-actina (faloidina, vermelho) e nuclear (DAPI, azul). No corte do detalhe é possível observar uma célula que apresenta marcação para HBA e p63ΔN.

Apesar de não ser nosso objeto de estudo, decidimos verificar a expressão gênica de hemoglobinas e desses fatores de transcrição na linhagem DU145, em comparação com a linhagem LNCaP. A linhagem DU145 não apresenta expressão do mRNA de nenhuma das hemoglobinas, nem mesmo de *HBG* (Figura 50A), o que indica que a atividade dessa pequena porção do promotor, quando inserida no contexto do cromossomo, não é suficiente para desencadear a transcrição.

Interessantemente, a linhagem LNCaP, que apresenta menor atividade desse promotor quando comparada com DU145, apresenta expressão dos mRNAs dos fatores *GATA2*, *OCT1* e *c-MYB*, enquanto DU145 apresenta somente expressão de *GATA2*. Dessa forma, não é possível dizer que os fatores de transcrição estudados seriam os responsáveis pela atividade do promotor de HBG reportada pela literatura.

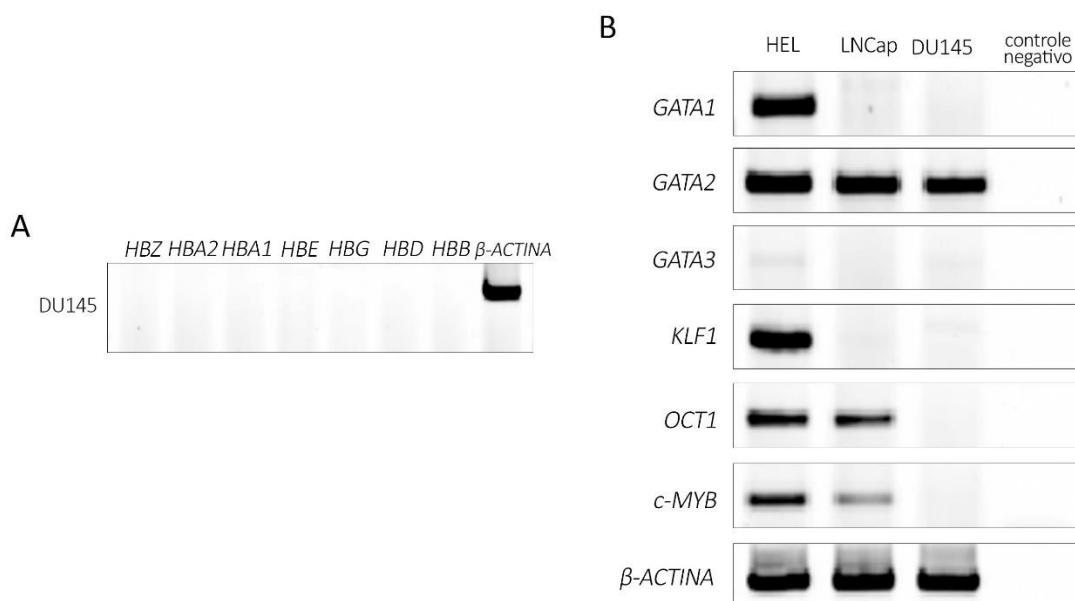


Figura 50: Abundância de diferentes (A) hemoglobinas e (B) fatores de transcrição em DU145. PCR de DU145 e LNCaP, sendo a linhagem de eritroleucemia HEL utilizada como controle positivo da presença de hemoglobinas e fatores de transcrição. Em todos os PCRs, uma reação sem DNA foi utilizada como controle negativo, e uma reação com o primer da β -ACTINA foi usada como controle positivo e de quantidade de mRNA das amostras.

Presença de hemoglobinas na próstata de camundongos

Além das análises feitas em linhagens celulares humanas, decidimos analisar também a expressão do mRNA de hemoglobinas em condições fisiológicas da próstata murina, ou quando há alterações na sinalização androgênica. Para isso, os animais foram separados nos seguintes grupos: fígado fetal (controle positivo da expressão de hemoglobinas), cérebro G2 (cérebro adulto, como controle negativo da expressão de hemoglobinas), G2 (próstata de animal adulto controle), G3 1, 2, 3 ou 7 dias (próstata de animais submetidos à castração, eutanasiados após a

quantidade de dias correspondente), G4 (próstata de animais submetidos à castração com reposição hormonal fisiológica após 3 dias, com duração de 4 dias) e G5 (animais idosos).

Todas as hemoglobinas presentes em ambos os clusters foram analisadas, porém somente as que apresentam expressão do mRNA na próstata foram demonstradas (Figura 51). A linha pontilhada dos gráficos representa o limiar de expressão gênica das hemoglobinas, delimitado pela expressão no controle negativo (cérebro G2). Dessa forma, a expressão do mRNA só é considerada aumentada quando seu valor se encontra acima dessa linha.

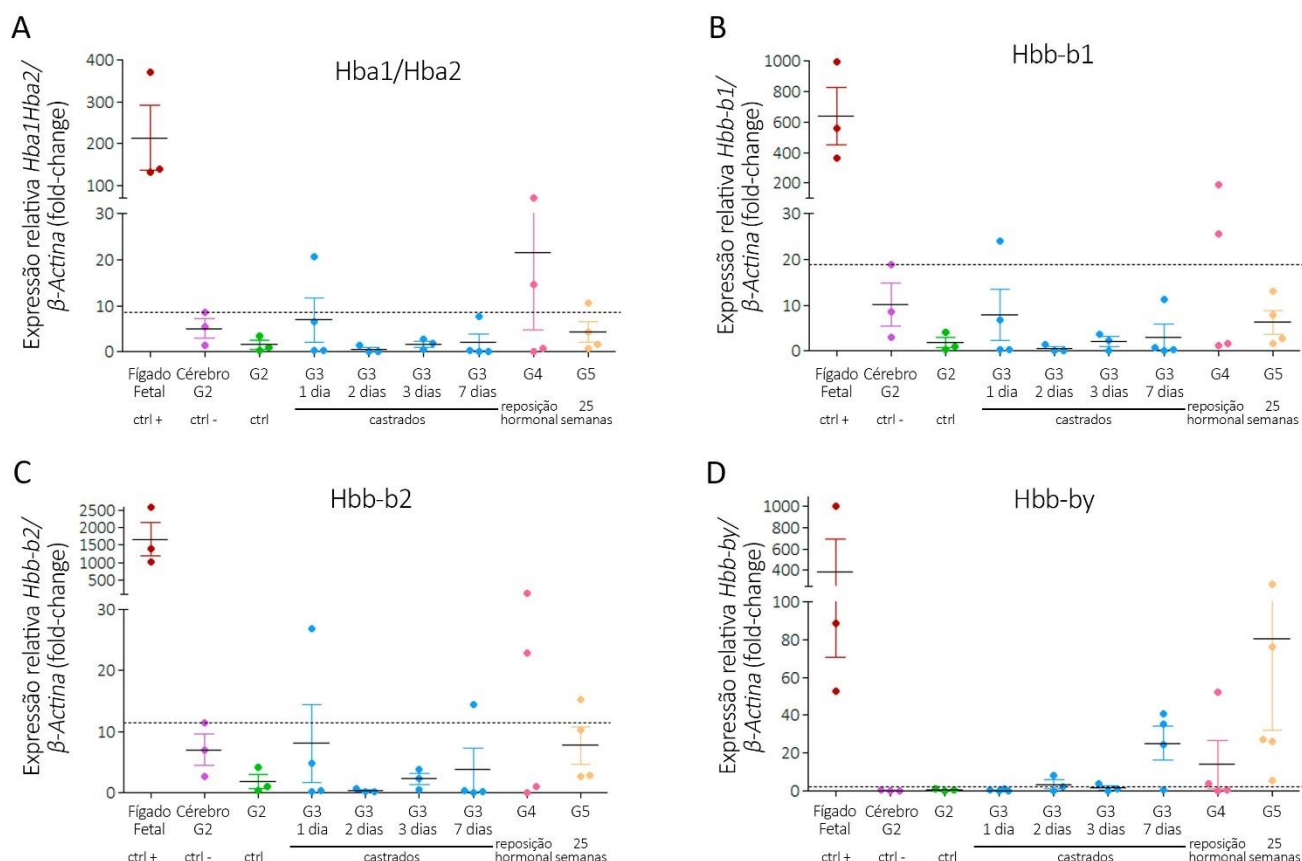


Figura 51: Abundância relativa de mRNAs das hemoglobinas murinas *Hba*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* e *Hbb-by* em grupos selecionados de camundongos. A abundância relativa dos mRNAs foi verificada através de qRT-PCR, sendo a β -Actina utilizada como controle interno. Cada ponto representa um animal distinto. O fígado fetal foi utilizado como controle positivo da expressão gênica de hemoglobinas, enquanto o cérebro foi utilizado como controle

negativo. Fígado fetal n=3; Cérebro G2 n=3; G2 n=3; G3 1 dia n=4; G3 2 dias n=3; G3 3 dias n=3; G3 7 dias n=4; G4 n=4; G5 n=5. A abundância de todas as hemoglobinas foi analisada; as hemoglobinas cuja expressão são equivalentes a zero não estão representadas por gráficos.

De acordo com esse critério, apenas os camundongos dos grupos G3 7 dias e G5 apresentaram expressão gênica acima do limiar da hemoglobina *Hbb-by* (Figura 51D). No caso do grupo G5, alguns camundongos apresentam expressão maior ou igual ao valor encontrado no controle positivo. Mesmo que todos os animais desse grupo estejam acima do limiar, o aumento da expressão do mRNA de *Hbb-by* não é estatisticamente significativo ($p=0.1444$, *One-way ANOVA*). Apesar disso, esse é um dado intrigante, pois demonstra uma tendência de expressão gênica da hemoglobina embriônica do cluster β murino, que seria correspondente à *HBE* humana.

DISCUSSÃO

Esse estudo caracteriza pela primeira vez a expressão de hemoglobinas em células da próstata, e tenta identificar possíveis mecanismos de regulação gênica responsáveis por essa expressão, sejam esses mecanismos similares aos encontrados em células eritróides ou relacionados à sinalização das células da próstata.

De forma a caracterizar a expressão de hemoglobinas na próstata, verificamos a expressão do mRNA e das proteínas em todas as linhagens de próstata existentes em nosso laboratório, em comparação com a linhagem de eritroleucemia HEL (controle positivo da expressão de hemoglobinas) e com linhagens de outros tecidos (HeLa, HT1080 e HEK293). Interessantemente, encontramos maior expressão do mRNA de hemoglobinas nessas linhagens que não eram de próstata.

A respeito das linhagens de próstata, as linhagens tumorais LNCap, PC3 e DU145 apresentaram expressão gênica basal menor dos transcritos de hemoglobinas quando comparadas às linhagens normais RWPE1, PNT1A e PNT2. Dados da literatura haviam demonstrado maior expressão de hemoglobinas em células tumorais, como células de glioblastoma [38] e de câncer cervical [39], portanto esse resultado foi surpreendente para nós. Aparentemente, no que diz respeito à próstata, a expressão de hemoglobinas é uma característica de células normais, que pode ser alterada com a transformação tumoral. Não podemos deixar de ressaltar que essas conclusões foram obtidas de células de linhagem e que mesmo as células ditas “normais” são células transformadas.

A presença das proteínas HBA, HBG e HBB não pôde ser verificada por *Western blotting*, muito provavelmente devido à sua baixa expressão. De fato, outro grupo já havia demonstrado que a expressão tanto de HBA1 quanto de HBB é muito menor em células de câncer cervical quando comparada a de células do sangue [39].

O próximo passo foi verificar se alguma das linhagens de próstata teria a expressão gênica de hemoglobinas alterada quando submetida a diferentes

tratamentos, como a cultura com andrógenos (R1881 ou DHT) ou a cultura tridimensional. LNCaP, PNT1A e PNT2 não demonstraram expressão alterada nos transcritos de hemoglobinas quando submetidas a tais tratamentos. Interessantemente, foi a partir desses experimentos que verificamos que há aumento da expressão dos mRNAs de *HBA2* e *HBA1* quando as células RWPE1 são cultivadas em 3D (Figura 22C). Sendo assim, boa parte de nossos esforços foi para melhor caracterizar a expressão de hemoglobinas e sua regulação gênica na linhagem RWPE1 cultivada em 3D, em comparação com a cultura bidimensional.

A primeira etapa foi quantificar a expressão dos mRNAs de hemoglobinas nessas condições. A linhagem RWPE1 apresenta expressão gênica basal das hemoglobinas *HBA2*, *HBA1* (*cluster* α) e *HBE* (*cluster* β). Por si só esse já é um resultado interessante, pois, apesar de ambos os *clusters* estarem representados, as hemoglobinas do *cluster* α expressas são hemoglobinas normalmente expressas em eritrócitos de adultos, enquanto a *HBE* é uma hemoglobina do *cluster* β normalmente expressa em eritrócitos de embriões. A grande maioria dos trabalhos que descrevem a expressão ectópica de hemoglobinas demonstra a expressão das hemoglobinas adultas HBA e HBB [35, 36, 39, 42]. Apenas a linhagem de glioblastoma cultivada em normóxia apresenta predominância da hemoglobina embriônica *HBE* [38].

Além disso, outro resultado muito interessante foi relacionado à cultura tridimensional de RWPE1. A expressão gênica de *HBA1* é 7 vezes maior na cultura tridimensional quando comparada à cultura bidimensional, e há uma tendência de maior expressão do mRNA de *HBA2* (aproximadamente 5x). A expressão gênica das outras hemoglobinas não foi alterada com o cultivo tridimensional. Mesmo com esse aumento, a expressão das proteínas não pôde ser identificada através de *Western blotting*. Assim, decidimos verificar se há presença das proteínas nessa linhagem através de imunofluorescência. Para isso escolhemos uma representante de cada *cluster*, HBA e HBE, sendo essas as que apresentaram expressão basal.

Interessantemente, boa parte de HBA e HBE se localizam em diferentes compartimentos subcelulares no cultivo bidimensional. HBA está localizada majoritariamente no núcleo, principalmente em regiões não marcadas pelo DAPI, apesar de estar presente também pontualmente em regiões marcadas com DAPI, e em menor quantidade no citoplasma. Já HBE está presente somente no citoplasma

das células. Com a cultura tridimensional, HBE permanece presente no citoplasma, enquanto HBA passa a se acumular no citoplasma de algumas células, evento que não ocorre em todos os esferóides.

As hemoglobinas encontram-se no citoplasma de células eritróides. Em alguns dos estudos em linhagens não eritróides, tanto HBA quanto HBB localizaram-se no citoplasma dessas células [35, 39]. Dessa forma, é um tanto surpreendente que HBA se localize majoritariamente no núcleo de células cultivadas em 2D ou em 3D. Mais interessante ainda é o fato de HBA localizar-se no citoplasma de algumas células dos esferóides, em quantidades maiores do que quando encontrada no núcleo. Análises de citometria indicam que aproximadamente 3,5% das células dos esferóides apresentam HBA citoplasmática com maior intensidade (HBA high). É possível supor que o aumento geral na expressão dos transcritos de *HBA* seja devido a essas células específicas, e não a todas as células.

É um fato curioso que células em divisão apresentem HBE localizada nos polos onde ficam os centrossomos. Infelizmente não foi possível darmos continuidade a essa parte do estudo.

Apesar de HBA e HBE em sua maioria se localizarem em compartimentos subcelulares distintos, fizemos análises de colocalização utilizando dois métodos: o plugin JACoP, do ImageJ, nas imagens de imunofluorescência; e o software IDEAS 6.2, nas imagens adquiridas pelo citômetro de imagem. Como era de se esperar, não observamos colocalização dessas proteínas em nenhuma das análises, nem mesmo nas células que apresentam maior quantidade de HBA citoplasmático.

A própria literatura demonstra resultados contrastantes dependendo do tipo celular analisado. Neurônios dopaminérgicos superexpressando HBA e HBB demonstraram formação de tetrâmeros $\alpha 2\beta 2$ [35], e o mesmo foi suposto em culturas primárias de neurônios de roedores, onde a enzima ALAS (importante para a síntese de heme) foi encontrada aumentada [37].

Já no soro de pacientes com esteatohepatite não alcoólica, foram encontradas tanto HBA quanto HBB livres [35], e poucos heterodímeros HBA1/HBB foram encontrados em células de linhagem de câncer cervical [39]. Ainda mais

interessante, a superexpressão de apenas HBA1 nessa linhagem acarretou nos mesmos resultados funcionais que a superexpressão de HBA1 e HBB em conjunto – o aumento da viabilidade quando as células são tratadas com H_2O_2 , e a ligação das hemoglobinas ao grupamento heme – de modo que o grupo sugere que HBA1 seja funcional atuando como monômero ou homodímero [39].

Nossos resultados indicam que, na linhagem RWPE1, HBA e HBE não formam tetrâmeros. No entanto, os experimentos realizados são insuficientes para dizer se essas proteínas são funcionais, se são capazes de se ligar ao grupamento heme ou se estariam formando homodímeros ou atuando em monômeros.

Após caracterização da expressão dos mRNAs e proteínas de hemoglobinas em linhagens de próstata, com aprofundamento nas análises na linhagem RWPE1 cultivada em 2D ou 3D, decidimos verificar a expressão gênica de fatores de transcrição eritróide específicos nessas duas condições por PCR em tempo real. Como base de comparação, também analisamos a expressão dos transcritos desses fatores em todas as linhagens de próstata por PCR.

Em todas as linhagens estudadas o fator de transcrição *GATA2* é abundante, o que era de se esperar, já que ele tem função importante na próstata, como por exemplo na modulação da expressão do gene *KLK3* (PSA) [67]. Como as linhagens estudadas apresentam níveis variados de expressão dos transcritos de diferentes hemoglobinas, é difícil dizer que *GATA2* seja o fator de transcrição responsável por isso.

De modo geral, todas as linhagens analisadas expressam alguns dos fatores de transcrição eritróides, sendo que a linhagem PNT1A expressa todos eles, em maior ou menor grau. PNT1A realmente é capaz de expressar hemoglobinas do cluster α , assim como RWPE1 e PNT2. Dessa forma, caso a expressão de hemoglobinas fosse regulada por esses fatores de transcrição, seria de se esperar que essas três linhagens apresentariam expressão gênica de fatores em comum, e em maior quantidade que as linhagens LNCaP e PC3, o que não é o caso.

Do mesmo modo, seria de se esperar que houvesse um aumento na expressão dos mRNAs desses fatores na cultura tridimensional de RWPE1, em

comparação com o cultivo bidimensional, acompanhando o aumento de *HBA2* e *HBA1*. Surpreendentemente isso não aconteceu. Mais do que isso, nenhum dos fatores de transcrição eritróide específicos que realmente são expressos por essa linhagem seriam suficientes para causar a expressão de hemoglobinas. A questão do GATA2 já foi explicada anteriormente; e FOG1 é um fator que não é capaz de se ligar diretamente ao DNA [22], ele precisa interagir com GATA1 – que não está presente nessa linhagem – para exercer sua função [21].

A expressão da subunidade p45 de NF-E2 é praticamente restrita a células hematopoiéticas, enquanto a subunidade p18 é expressa na maioria dos tecidos [29]. Por isso, o racional do estudo foi verificar a expressão da subunidade p45 nas linhagens de próstata. Porém, foi observado também que os níveis de expressão dessa subunidade não se alteram ao longo da diferenciação eritróide, sendo que ambas as subunidades precisam colocalizar-se em regiões de heterocromatina para serem funcionais e poderem ativar os genes [30]. Dessa forma, talvez tivesse sido mais interessante verificar a localização nuclear de ambas as unidades para poder concluir se esse fator de transcrição está ativo.

Na verdade as únicas células descritas na literatura que apresentam expressão de hemoglobinas devido à expressão de fatores de transcrição eritróide específicos, além dos eritrócitos, são as células epiteliais alveolares submetidas a hipóxia. Essas células demonstram aumento de GATA1, GATA2, NF-E2 e KLF1 [36]. Hepatócitos de pacientes com esteopatia não alcoólica, células de câncer cervical e células epiteliais vaginais não apresentam aumento de nenhum dos fatores de transcrição eritróide específicos analisados [35, 39, 40]. Inclusive, foi descrito que a expressão de hemoglobinas nas células epiteliais vaginais está relacionada ao aumento de expressão do fator de transcrição NFE2L2 [40], que induz genes de resistência ao estresse oxidativo [41].

Com os experimentos realizados aqui, é possível dizer que os fatores de transcrição eritróide específicos não estão relacionados à expressão de hemoglobinas em linhagens de próstata, demonstrando que nossa hipótese inicial de trabalho – a de que os genes das hemoglobinas na próstata teriam a mesma regulação que as de eritrócitos – parece não estar correta. Além disso, não é possível dizer se as células que tem aumento de HBA podem estar sofrendo algum

tipo de estresse oxidativo.

Como não foi possível identificar elementos eritróide específicos que estariam associados à expressão de hemoglobinas, partimos então para o estudo de elementos que estão relacionados ao funcionamento de células da próstata. O primeiro deles foi a sinalização por andrógenos. Apesar de não termos encontrado alterações nas linhagens LNCaP, PNT1 e PNT2 tratadas com andrógenos – e nem na própria RWPE1 – nos experimentos iniciais de PCR, julgamos ser importante aprofundarmos essa análise, além de fazer uma combinação com a cultura tridimensional.

É importante lembrar como foi feito o tratamento com andrógenos na RWPE1: 0,01nM de DHT foram adicionados nos pontos 0h, 2h e 4h, sendo que as células foram coletadas para os diferentes experimentos subsequentes após 5h do início do tratamento. Dessa forma nós asseguramos que haveria tempo suficiente para alterações na regulação gênica (5h do início do tratamento), bem como seríamos capazes de observar alterações mais rápidas, como a movimentação protéica (1h após a adição da última dose de DHT).

Interessantemente, o tratamento com DHT ocasionou em algumas alterações na expressão do mRNA de *HBA2* e *HBA1*, e em mais nenhuma hemoglobina analisada. Enquanto a expressão gênica de *HBA1* aumentou significativamente na cultura bidimensional tratada com DHT (aproximadamente 8x), a expressão gênica de *HBA2* diminuiu significativamente na cultura tridimensional tratada com DHT em aproximadamente 80%, sendo que houve uma tendência de diminuição de *HBA1*. Uma das suposições possíveis é de que essas alterações não sejam especificamente relacionadas à atuação do DHT nos *loci* das hemoglobinas em si, mas sim ao fato de que há uma alteração global na cromatina com a adição dele, que poderia causar flutuações na expressão desses genes.

Apesar dessas alterações na quantidade de mRNA, tanto a localização subcelular das proteínas HBA e HBE quanto a porcentagem de células HBA *high* na cultura tridimensional mantiveram-se as mesmas. Curiosamente, a porcentagem de células cultivadas bidimensionalmente marcadas para HBA diminuiu 10% após tratamento com DHT, indo no sentido contrário ao que ocorreu com os transcritos. É

importante lembrar que, apesar de o tempo de tratamento ser suficiente para a produção de proteínas, ele pode não ter sido suficiente para a degradação de proteínas que já estavam prontas.

A linhagem RWPE1 não é homogênea, ela possui duas subpopulações, sendo que uma delas apresenta expressão do Receptor de Andrógeno (AR) e, assim, tem possibilidade de responder à DHT [70]. Devido a uma possível atuação do DHT na regulação das hemoglobinas, decidimos verificar se as células dos esferóides que apresentam HBA citoplasmática fariam parte da mesma subpopulação que expressa AR. O ensaio de imunofluorescência demonstrou que esse não é o caso. HBA e AR são independentes, sendo que é possível observar células que apresentam as duas proteínas, ou células que apresentam apenas uma delas, independentemente de serem tratadas ou não com DHT. Além disso, esse experimento confirma o funcionamento do tratamento com DHT: em esferóides não tratados o AR encontra-se no citoplasma, enquanto em esferóides tratados o AR encontra-se nuclear.

Outro experimento que demonstra a falta de influência do estímulo androgênico para a expressão de hemoglobinas na próstata foi a de castração de camundongos. A análise de expressão dos transcritos de todas as hemoglobinas dos dois *loci* foi realizada na próstata de camundongos castrados após 1 dia, 2 dias, 3 dias e 7 dias; castrados com reposição hormonal, e também em animais controle. A próstata de nenhum desses camundongos demonstrou alteração na expressão gênica de hemoglobinas.

Sem conseguirmos definir qual exatamente é a regulação gênica por trás da expressão de hemoglobinas na linhagem RWPE1, decidimos verificar a abertura da cromatina nas regiões regulatórias distais e proximais desses genes, através do ensaio de ATAC-seq. Originalmente a intenção era comparar os seguintes grupos: 2D, 2D + DHT, 3D, 3D + DHT; mas infelizmente o ensaio das culturas tridimensionais resultou em muito ruído, que não pôde ser removido nem com ajuda de análises de bioinformática. Dessa forma, pudemos analisar somente os resultados da cultura bidimensional, que já são suficientes para verificar a abertura da cromatina na condição basal, e quando há um aumento na quantidade de transcritos de *HBA1* (tratamento com DHT).

Apesar das flutuações na expressão de hemoglobinas do *cluster* α , a cromatina desse *cluster* parece estar fechada, tanto nos promotores proximais (*upstream* ao início de cada gene) quanto nos distais (HS48, HS40, HS33 e HS10). Esses mesmos promotores estão abertos nas subpopulações eritróides analisadas, servindo como comparação aos resultados obtidos na próstata. Esse é um resultado inusitado, pois conseguimos medir variações nas flutuações dos transcritos de HBA, além de confirmarmos que há tradução desses mRNAs. De qualquer forma, esse resultado condiz com a falta de expressão dos transcritos de fatores de transcrição eritróide específicos, que se ligariam justamente nesses promotores.

No caso do *cluster* β , conseguimos ver picos nos promotores distais, sendo que um deles corresponde ao HS2. Porém, mesmo que a cromatina esteja aberta nesse sítio de hipersensibilidade específico, isso não é suficiente para que haja expressão dos genes, pois os promotores proximais não estão disponíveis. Assim, podemos supor que não há formação de loops ligando os promotores distais aos proximais como acontece em células eritróides, tão importantes para que haja expressão gênica [5].

Analisando os fatores de transcrição que poderiam se ligar às sequências dos picos A e C, a maioria deles é similar aos fatores preditos para o pico B, que corresponde ao HS2. Porém o único fator de transcrição eritróide específico que poderia se ligar nas sequências dos picos A e C é o GATA1, sendo que os fatores GATA1, GATA2 e GATA3 podem se ligar ao HS2.

Em células eritróides, o *cluster* α está em uma região de cromatina mais aberta, com segmentos livres de nucleossomos e próximos a genes constitutivamente expressos [3-5]; enquanto o *cluster* β é flanqueado por genes inativos e, por isso, está em uma região de cromatina mais fechada [13]. É curioso que ocorra o contrário no caso da linhagem RWPE1: é possível ver picos somente nos promotores do *cluster* β , mostrando que essa região está aberta, apesar de isso não ser suficiente para explicar a expressão de HBE.

Achamos que seria interessante verificar qual seria o papel da matriz celular utilizada para a formação dos esferóides, e se ela teria um papel importante na sinalização das células cultivadas em 2D. Assim, adicionamos o grupo de células

cultivadas em 2D sobre matriz rica em laminina e o de células cultivadas em matriz rica em laminina solubilizada no meio de cultura.

Os resultados de expressão gênica demonstram que o cultivo bidimensional sobre matriz rica em laminina ou o cultivo em matriz rica em laminina solúvel não alteraram a expressão gênica de hemoglobinas, quando comparados ao cultivo 2D. Além disso, a localização subcelular de HBA e HBE permanece a mesma encontrada no cultivo bidimensional. Juntos, esses resultados indicam que a expressão de hemoglobinas do *cluster* α e a alteração na sua localização subcelular dependem da estrutura tridimensional do esferoide, e não da sinalização por componentes presentes na matriz extracelular.

A questão de a expressão aumentada de HBA na cultura tridimensional ser regulada através da hipóxia e, conseqüentemente, de HIF-1 α , surgiu por alguns motivos. Primeiramente, a maioria das células que apresentaram HBA citoplasmática estava no centro dos esferóides e, portanto, o aporte de oxigênio para elas poderia ser menor. Apenas na Figura 39B encontramos células na periferia do esferoide. Além disso, a hipóxia e a sinalização por HIF-1 α foram os responsáveis pelo aumento da expressão de hemoglobinas em células de alguns órgãos não eritróides.

No caso das células epiteliais alveolares, a hipóxia levou ao aumento não só de HIF-1 α , mas também de HIF-2 α , acarretando no aumento da expressão dos fatores de transcrição eritróide específicos GATA1, GATA2, NF-E2 e KLF1 e, por fim, de HBA e HBB [36]. No caso do cérebro, HBE foi a hemoglobina predominantemente encontrada em células de glioblastoma em normóxia. Quando submetidas à hipóxia, essas células apresentaram aumento da expressão de EPO e aumento da expressão de hemoglobinas, com predominância alterada de HBE para HBA e HBG [38]. Em neurônios de roedores, a hipóxia também levou ao aumento da expressão de EPO e, conseqüentemente, de maior expressão das proteínas HBA e HBB [37].

É curioso notar que, nos casos descritos acima, a produção de EPO ocorre nos mesmos órgãos em que ela atua, diferentemente do que acontece com a sinalização de hipóxia para a produção de eritrócitos, na qual a EPO é produzida pelo fígado e pelo rim e atua nos progenitores eritróides. Além disso, a produção de

EPO leva à eritropoese, e é somente devido à diferenciação eritróide que há expressão de hemoglobinas [33, 34]. Dessa forma, a ligação entre o aumento da expressão de EPO e de hemoglobinas no cérebro parece ser um tanto vaga, mesmo que encontrada por diferentes grupos.

De qualquer forma, pareceu-nos importante verificar se a hipóxia seria a responsável pelo aumento da expressão de hemoglobinas nos esferóides através da sinalização por HIF-1 α . Em nossos resultados, HIF-1 α está presente somente nas células da periferia dos esferóides, células que não apresentam HBA citoplasmático. Além disso, HIF-1 α encontra-se no citoplasma dessas células, indicando que elas não estariam em hipóxia e que, provavelmente, essa proteína logo seria degradada por proteassomos [22]. Em concordância com esse resultado, dados da literatura demonstram que as células centrais dos esferóides têm acesso a moléculas de até 40kb [112]. Sendo assim, a difusão de oxigênio até elas não seria difícil.

Já foi descrito na literatura que células transformadas através da infecção por HSV têm o aumento de transcritos de *HBA2* e *HBA1*, que é dependente das proteínas virais ICP0 e ICP4 [43]. A linhagem RWPE1, por sua vez, foi transformada pela transfecção por HPV18. Sendo assim, ela expressa a proteína viral E7 [69], que não tem influência sobre a expressão de hemoglobinas.

É curioso notar que, apesar de descrições da literatura demonstrarem que a linhagem RWPE1 é capaz de formar ácinos com lúmen quando cultivadas em matriz extracelular [71, 113], isso não foi observado em nossos experimentos. Tyson e colaboradores [113] demonstraram que o meio de cultura sem adição de BPE é ideal para a formação de ácinos sem lúmen pela linhagem RWPE1, mesmo que BPE seja um composto essencial para a manutenção dessa linhagem em cultivos bidimensionais. Em nossos experimentos utilizamos meio de cultura com adição de BPE, e seria necessário repeti-los sem adição desse composto para verificar se realmente conseguiríamos formar ácinos sem lúmen.

Ainda mais interessante, esse trabalho não cita a adição de DHT para a formação dos ácinos, passo muito importante para a correta formação dos esferóides no protocolo desenvolvido pelo nosso laboratório. Quando não há adição de DHT ao meio de cultura, os esferóides não desenvolvem morfologia circular, e

ficam similares a agrupamentos celulares amorfos (dados não demonstrados).

Foi justamente a formação de ácinos sem lúmen que permitiu a observação do aumento da expressão de HBA na cultura tridimensional, já que a grande maioria das células que apresentaram esse fenótipo estavam presentes no centro dos esferoides.

Em células de mama e de próstata cultivadas tridimensionalmente, a formação de lúmen depende da morte por apoptose ou por autofagia das células que não tem contato com a matriz extracelular [112-114]. Seria interessante verificar se há marcadores de apoptose ou autofagia nas células centrais de nossos esferoides, e se eles apresentam alguma relação com o aumento da expressão de HBA e sua localização citoplasmática, apesar de não vermos a fragmentação do núcleo – um dos *hallmarks* da apoptose – em nenhuma dessas células. O aumento da viabilidade de células de câncer cervical humanas hiperexpressando HBA1 e HBB (ou somente HBA1) tratadas com H₂O₂ já foi verificado [39], o que aumenta a curiosidade em torno desse tópico. Apesar disso, é bom lembrar que não são todos os esferoides que apresentam localização subcelular alterada de HBA.

Como mencionado anteriormente, a expressão gênica de hemoglobinas na próstata não foi alterada com a castração dos animais, e nem com a castração seguida de reposição hormonal. No entanto, um resultado interessante foi a tendência de aumento da expressão do mRNA de *Hbb-by* na próstata de animais idosos. Apesar de não ser uma diferença estatística, todos os animais desse grupo tiveram valor de expressão maior que o limiar definido pelo controle negativo (cérebro), sendo que alguns deles tiveram valor similar ao controle positivo (fígado fetal). O grupo de animais cujas próstatas foram coletadas após 7 dias de castração também demonstrou tendência de aumento de expressão de *Hbb-by*, porém um pouco menor que o grupo de animais idosos.

A *Hbb-by* é uma hemoglobina embriônica do *cluster* β que corresponde à HBE humana [115]. Mesmo que em organismos diferentes, e em condições diferentes, é interessante notar que a única hemoglobina do *cluster* β encontrada expressa na próstata ao longo desse trabalho seja a embriônica.

A literatura indica que há atividade do promotor da HBG na próstata de camundongos, mais especificamente nas células basais p63⁺ [48]. Dessa forma, decidimos verificar se as células que apresentam HBA citoplasmática seriam as células basais p63⁺, apesar de HBA e HBG serem de clusters diferentes, e apresentarem promotores distintos. Como era de se esperar, as células marcadas com p63 Δ N estão predominantemente na periferia dos esferoides, e não são necessariamente as que apresentam HBA citoplasmático.

Por fim, apesar de o foco do trabalho ser a linhagem RWPE1, é importante fazer algumas considerações a respeito da linhagem tumoral DU145. Era esperado que essa linhagem apresentasse pelo menos a expressão do transcrito de *HBG*, devido a estudos anteriores que demonstraram que o promotor proximal dessa hemoglobina estaria ativo nessa linhagem [46]. Curiosamente essa linhagem não apresentou expressão gênica de nenhuma hemoglobina, demonstrando que a regulação gênica das hemoglobinas, em especial a *HBG*, não depende somente de uma pequena sequência promotora presente *upstream* à região codificadora, mas que outros elementos também são importantes para que esses genes sejam ativados ou reprimidos.

Esse promotor teve sua sequência delimitada a uma pequena quantidade de nucleotídeos, que apresenta sítios de ligação aos fatores de transcrição da família GATA, POU2F1 (OCT1), KLF1 [49, 50] e c-Myb. Seria interessante verificar se há a expressão de alguns desses fatores, mesmo que não haja a expressão de *HBG* – ou de nenhuma outra hemoglobina – em DU145, para verificar se algum deles seria responsável pela atividade do promotor descrita na literatura [46]. Surpreendentemente, a linhagem DU145 apresenta somente expressão do fator de transcrição *GATA2*, que tem um papel importante na próstata [67]. A linhagem LNCaP, que não apresenta atividade desse promotor, apresenta expressão de *POU2F1* (OCT1) e *c-Myb*, que são fatores inibitórios da atividade do promotor de *HBG* [52-54], além de *GATA2*. Apesar de não ser possível dizer qual seria o mecanismo responsável pela atividade do promotor da *HBG* na linhagem DU145 descrita na literatura, podemos supor que essa atividade seja devida à falta de fatores inibitórios nessa linhagem.

Como não foi possível identificar um mecanismo específico de regulação

gênica das hemoglobinas na próstata, não é possível descartar que a expressão desses genes seja um ruído, e não algo regulado. É importante lembrar que quanto mais mecanismos de regulação determinado gene tem, mais ruidosa tende a ser sua expressão, e que genes co-regulados tendem a mostrar flutuações de expressão correlacionadas [55]. Esses poderiam ser justamente os casos das hemoglobinas, que possuem muitos mecanismos de regulação, sendo que hemoglobinas de diferentes *clusters* são co-reguladas. Seguindo essa linha de raciocínio não é surpreendente que genes dos dois clusters (*HBA* e *HBE*) sejam expressos na próstata, mesmo que as proteínas apresentem localizações subcelulares diferentes.

A questão do ruído torna-se ainda mais interessante quando pensamos que GATA2 é um fator de transcrição importante tanto para o desenvolvimento da próstata [67] quanto para a expressão de hemoglobinas [21, 23], e que ele está expresso em todas as células e condições analisadas. É tentador especular que flutuações nesse fator de transcrição poderiam ser responsáveis pelas alterações observadas na expressão de hemoglobinas, apesar de não podermos concluir isso com os experimentos realizados.

Por fim, fica o questionamento a respeito da função que as hemoglobinas teriam nas células da próstata. A literatura supõe diferentes funções para as hemoglobinas encontradas em diferentes tecidos: proteção ao estresse oxidativo (células epiteliais alveolares) [36], proteção ao excesso de ferro e heme (endométrio) [42] e supressão da produção de H_2O_2 , ânion superóxido e ROS endógenas, sendo que a superexpressão de hemoglobinas leva a um aumento da viabilidade de células tratadas com H_2O_2 (linhagem de câncer cervical) [39]. Nenhuma dessas funções parece se encaixar nos resultados obtidos nesse trabalho.

Além disso, não foi possível identificarmos o mecanismo responsável pela expressão de hemoglobinas na próstata, portanto é difícil supor qual seria sua função nesse tecido. Ainda mais interessante é o fato de que as hemoglobinas de diferentes *clusters*, que normalmente formam tetrâmeros, encontram-se em diferentes compartimentos celulares. E mesmo quando ambas estão presentes no citoplasma, elas não se colocalizam. Dessa forma, caso elas consigam atuar em monômeros ou homodímeros, acredito que a função de cada uma dessas hemoglobinas na próstata seja distinta.

CONCLUSÕES

Esse trabalho teve dois objetivos principais: caracterizar amplamente a expressão de hemoglobinas em várias linhagens de próstata humana submetidas a diversas condições, e tentar verificar os mecanismos de regulação gênica das hemoglobinas nesse tecido. Além disso, a expressão gênica de hemoglobinas na próstata de camundongos foi abordada brevemente.

De modo geral, podemos concluir que as células normais da próstata apresentam maior expressão dos genes de hemoglobinas do que as células tumorais; e que a sinalização de DHT não altera a expressão de hemoglobinas *in vitro* ou *in vivo*.

A linhagem RWPE1 apresenta expressão basal dos transcritos de *HBA2*, *HBA1* (*cluster* α) e *HBE* (*cluster* β), sendo que a expressão de hemoglobinas do *cluster* α aumenta significativamente com o cultivo tridimensional em matriz rica em laminina. A localização subcelular de HBA é alterada em algumas células dos esferóides: na cultura bidimensional essa proteína se encontra majoritariamente no núcleo, mas em algumas células de alguns esferóides sua expressão aumenta e ela se torna citoplasmática.

De modo contrário à nossa hipótese inicial, a expressão de hemoglobinas na próstata não é regulada de maneira similar à de eritrócitos. As flutuações de expressão encontradas na linhagem RWPE1 também não são explicadas por mecanismos intrínsecos do tecido prostático (sinalização por DHT ou tipo celular basal p63⁺) nem por outros mecanismos (sinalização da matriz extracelular ou hipóxia).

A linhagem DU145 não expressa nenhuma hemoglobina, nem mesmo *HBG*. Além disso, ela não apresenta expressão dos transcritos de fatores de transcrição que se ligariam à pequena sequência promotora que já havia sido descrita como ativa nessa linhagem, somente de *GATA2*.

As hemoglobinas embriônicas são as únicas expressas do *cluster* β , tanto *in vivo* (*Hbb-by* na próstata de camundongos idosos) como *in vitro* (mRNA e proteína HBE em RWPE1).

REFERÊNCIAS

1. Adamson, J.W. and C.A. Finch, *Hemoglobin function, oxygen affinity, and erythropoietin*. Annu Rev Physiol, 1975. **37**: p. 351-69.
2. Higgs, D.R., et al., *A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster*. Blood, 1989. **73**(5): p. 1081-104.
3. Vyas, P., et al., *Cis-acting sequences regulating expression of the human alpha-globin cluster lie within constitutively open chromatin*. Cell, 1992. **69**(5): p. 781-93.
4. Hardison, R., *Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression*. J Exp Biol, 1998. **201**(Pt 8): p. 1099-117.
5. Cao, A. and P. Moi, *Regulation of the globin genes*. Pediatr Res, 2002. **51**(4): p. 415-21.
6. Fu, X.H., et al., *A conserved, extended chromatin opening within alpha-globin locus during development*. Exp Cell Res, 2005. **309**(1): p. 174-84.
7. Craddock, C.F., et al., *Contrasting effects of alpha and beta globin regulatory elements on chromatin structure may be related to their different chromosomal environments*. EMBO J, 1995. **14**(8): p. 1718-26.
8. Flint, J., et al., *Comparative genome analysis delimits a chromosomal domain and identifies key regulatory elements in the alpha globin cluster*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(4): p. 371-82.
9. Anguita, E., et al., *Deletion of the mouse alpha-globin regulatory element (HS -26) has an unexpectedly mild phenotype*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3450-6.
10. Zhao, Q.Z., et al., *Cloning and characterization of the mouse alpha globin cluster and a new hypervariable marker*. Mamm Genome, 1996. **7**(10): p. 749-53.
11. Zhou, G.L., et al., *Active chromatin hub of the mouse alpha-globin locus forms in a transcription factory of clustered housekeeping genes*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(13): p. 5096-105.
12. Bouhassira, E.E., et al., *Properties of the mouse alpha-globin HS-26: relationship to HS-40, the major enhancer of human alpha-globin gene expression*. Am J Hematol, 1997. **54**(1): p. 30-9.
13. Bulger, M., et al., *Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci: the beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5129-34.
14. Higgs, D.R., *Do LCRs open chromatin domains?* Cell, 1998. **95**(3): p. 299-302.
15. Stamatoyannopoulos, G., *Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation*. Exp Hematol, 2005. **33**(3): p. 259-71.
16. Sawado, T., et al., *The beta -globin locus control region (LCR) functions primarily by enhancing the transition from transcription initiation to elongation*. Genes Dev, 2003. **17**(8): p. 1009-18.
17. Epner, E., et al., *The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus*. Mol Cell, 1998. **2**(4): p. 447-55.
18. Bulger, M., et al., *ChIPs of the beta-globin locus: unraveling gene regulation within an active domain*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(2): p. 170-7.
19. Schubeler, D., M. Groudine, and M.A. Bender, *The murine beta-globin locus control region regulates the rate of transcription but not the hyperacetylation of histones at the active genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11432-7.
20. Forsberg, E.C., et al., *Developmentally dynamic histone acetylation pattern of a tissue-specific chromatin domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14494-9.
21. Ferreira, R., et al., *GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(4): p. 1215-27.
22. Tsiftoglou, A.S., I.S. Vizirianakis, and J. Strouboulis, *Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs*. IUBMB Life, 2009. **61**(8): p. 800-30.
23. Ikonomi, P., et al., *Levels of GATA-1/GATA-2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins*. Gene, 2000. **261**(2): p. 277-87.

24. Dore, L.C. and J.D. Crispino, *Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development*. Blood, 2011. **118**(2): p. 231-9.
25. Bresnick, E.H., et al., *Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(13): p. 5819-31.
26. Li, J., et al., *Multiple regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the human epsilon-globin gene*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10202-9.
27. Shyu, Y.C., et al., *Chromatin-binding in vivo of the erythroid kruppel-like factor, EKLF, in the murine globin loci*. Cell Res, 2006. **16**(4): p. 347-55.
28. Schoenfelder, S., et al., *Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells*. Nat Genet, 2010. **42**(1): p. 53-61.
29. Andrews, N.C., *The NF-E2 transcription factor*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(4): p. 429-32.
30. Francastel, C., W. Magis, and M. Groudine, *Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12120-5.
31. Pang, B. and M.P. Snyder, *Systematic identification of silencers in human cells*. Nat Genet, 2020. **52**(3): p. 254-263.
32. Watt, P., P. Lamb, and N.J. Proudfoot, *Distinct negative regulation of the human embryonic globin genes zeta and epsilon*. Gene Expr, 1993. **3**(1): p. 61-75.
33. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4304-8.
34. Haase, V.H., *Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors*. Blood Rev, 2013. **27**(1): p. 41-53.
35. Saha, D., et al., *Hemoglobin expression in nonerythroid cells: novel or ubiquitous?* Int J Inflam, 2014. **2014**: p. 803237.
36. Grek, C.L., et al., *Hypoxia up-regulates expression of hemoglobin in alveolar epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **44**(4): p. 439-47.
37. Schelshorn, D.W., et al., *Expression of hemoglobin in rodent neurons*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(3): p. 585-95.
38. Emara, M., A.R. Turner, and J. Allalunis-Turner, *Hypoxia differentially upregulates the expression of embryonic, fetal and adult hemoglobin in human glioblastoma cells*. Int J Oncol, 2014. **44**(3): p. 950-8.
39. Li, X., et al., *Characterization of adult alpha- and beta-globin elevated by hydrogen peroxide in cervical cancer cells that play a cytoprotective role against oxidative insults*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54342.
40. Saha, D., S. Koli, and K.V.R. Reddy, *Transcriptional regulation of Hb-alpha and Hb-beta through nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) activation in human vaginal cells: A novel mechanism of cellular adaptability to oxidative stress*. Am J Reprod Immunol, 2017. **77**(6).
41. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 401-26.
42. Dassen, H., et al., *Haemoglobin expression in human endometrium*. Hum Reprod, 2008. **23**(3): p. 635-41.
43. Cheung, P., B. Panning, and J.R. Smiley, *Herpes simplex virus immediate-early proteins ICP0 and ICP4 activate the endogenous human alpha-globin gene in nonerythroid cells*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 1784-93.
44. Abbott, D.E., et al., *Expressed sequence tag profiling identifies developmental and anatomic partitioning of gene expression in the mouse prostate*. Genome Biol, 2003. **4**(12): p. R79.
45. Perez-Stable, C., *Distinct negative regulatory mechanisms involved in the repression of human embryonic epsilon- and fetal G gamma-globin genes in transgenic mice*. J Biol Chem, 1994. **269**(52): p. 33109-15.
46. Perez-Stable, C., et al., *Prostate, adrenocortical, and brown adipose tumors in fetal globin/T antigen transgenic mice*. Lab Invest, 1996. **74**(2): p. 363-73.

47. Perez-Stable, C., et al., *Prostate cancer progression, metastasis, and gene expression in transgenic mice*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 900-6.
48. Reiner, T., et al., *Progression of prostate cancer from a subset of p63-positive basal epithelial cells in FG/Tag transgenic mice*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(11): p. 1171-9.
49. Perez-Stable, C. and F. Costantini, *Roles of fetal G gamma-globin promoter elements and the adult beta-globin 3' enhancer in the stage-specific expression of globin genes*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(3): p. 1116-25.
50. Gumucio, D.L., et al., *Nuclear proteins that bind the human gamma-globin gene promoter: alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(12): p. 5310-22.
51. Vazquez-Arreguin, K. and D. Tantin, *The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(6): p. 792-804.
52. Liu, L.R., et al., *T to C substitution at -175 or -173 of the gamma-globin promoter affects GATA-1 and Oct-1 binding in vitro differently but can independently reproduce the hereditary persistence of fetal hemoglobin phenotype in transgenic mice*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7452-9.
53. Sandberg, M.L., et al., *c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation*. Dev Cell, 2005. **8**(2): p. 153-66.
54. Sankaran, V.G. and S.H. Orkin, *The switch from fetal to adult hemoglobin*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(1): p. a011643.
55. Urchueguía, A.G., L.; Bellement, L.; Julou, T.; van Nimwegen, E., *Noise propagation shapes expression noise*. bioRxiv preprint 2019.
56. Junker, J.P. and A. van Oudenaarden, *When noisy neighbors are a blessing: analysis of gene expression noise identifies coregulated genes*. Mol Cell, 2012. **45**(4): p. 437-8.
57. Carey, L.B., et al., *Promoter sequence determines the relationship between expression level and noise*. PLoS Biol, 2013. **11**(4): p. e1001528.
58. Jones, D.L., R.C. Brewster, and R. Phillips, *Promoter architecture dictates cell-to-cell variability in gene expression*. Science, 2014. **346**(6216): p. 1533-6.
59. Blake, W.J., et al., *Noise in eukaryotic gene expression*. Nature, 2003. **422**(6932): p. 633-7.
60. Verze, P., T. Cai, and S. Lorenzetti, *The role of the prostate in male fertility, health and disease*. Nat Rev Urol, 2016. **13**(7): p. 379-86.
61. Signoretti, S., et al., *p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development*. Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 1769-75.
62. Lonergan, P.E. and D.J. Tindall, *Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression*. J Carcinog, 2011. **10**: p. 20.
63. Kyprianou, N. and J.T. Isaacs, *Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration*. Endocrinology, 1988. **122**(2): p. 552-62.
64. Garcia-Florez, M., C.A. Oliveira, and H.F. Carvalho, *Early effects of estrogen on the rat ventral prostate*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(4): p. 487-97.
65. Rosa-Ribeiro, R., et al., *Desquamation is a novel phenomenon for collective prostate epithelial cell deletion after castration*. Histochem Cell Biol, 2014. **141**(2): p. 213-20.
66. Zhou, Y., E.C. Bolton, and J.O. Jones, *Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis*. J Mol Endocrinol, 2015. **54**(1): p. R15-29.
67. Perez-Stable, C.M., A. Pozas, and B.A. Roos, *A role for GATA transcription factors in the androgen regulation of the prostate-specific antigen gene enhancer*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **167**(1-2): p. 43-53.
68. Rosa-Ribeiro, R., et al., *Transcription factors involved in prostate gland adaptation to androgen deprivation*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e97080.
69. Bello, D., et al., *Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18*. Carcinogenesis, 1997. **18**(6): p. 1215-23.

70. Tokar, E.J., et al., *Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer*. *Differentiation*, 2005. **73**(9-10): p. 463-73.
71. Bello-DeOcampo, D., et al., *Laminin-1 and alpha6beta1 integrin regulate acinar morphogenesis of normal and malignant human prostate epithelial cells*. *Prostate*, 2001. **46**(2): p. 142-53.
72. Justulin, L.A., Jr., et al., *Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement*. *Cell Biol Int*, 2006. **30**(4): p. 354-64.
73. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
74. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
75. Rueden, C.T., et al., *ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data*. *BMC Bioinformatics*, 2017. **18**(1): p. 529.
76. Bolte, S. and F.P. Cordelieres, *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. *J Microsc*, 2006. **224**(Pt 3): p. 213-32.
77. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. **300**(4): p. C723-42.
78. Buenrostro, J.D., et al., *Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position*. *Nat Methods*, 2013. **10**(12): p. 1213-8.
79. Buenrostro, J.D., et al., *ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015. **109**: p. 21 29 1-21 29 9.
80. Tsompana, M. and M.J. Buck, *Chromatin accessibility: a window into the genome*. *Epigenetics Chromatin*, 2014. **7**(1): p. 33.
81. Yan, F., et al., *From reads to insight: a hitchhiker's guide to ATAC-seq data analysis*. *Genome Biol*, 2020. **21**(1): p. 22.
82. Afgan, E., et al., *The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update*. *Nucleic Acids Res*, 2018. **46**(W1): p. W537-W544.
83. Ou, J., et al., *ATACseqQC: a Bioconductor package for post-alignment quality assessment of ATAC-seq data*. *BMC Genomics*, 2018. **19**(1): p. 169.
84. Yiwei, N. *ATAC-seq data analysis: from FASTQ to peaks*. 2019; Available from: <https://yiweiniu.github.io/blog/2019/03/ATAC-seq-data-analysis-from-FASTQ-to-peaks/>.
85. *Harvard Informatics: ATAC-seq*. Available from: <https://github.com/harvardinformatics/ATAC-seq>.
86. Gordon, A. *FASTQ/A short-reads pre-processing tools*. 2010; Available from: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/.
87. Andrews, S. *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*.; Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
88. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. *Nat Methods*, 2012. **9**(4): p. 357-9.
89. Langmead, B., et al., *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. *Genome Biol*, 2009. **10**(3): p. R25.
90. Cock, P.J.A. *Galaxy wrapper for the samtools idxstats command*. 2013; Available from: https://github.com/peterjc/pico_galaxy/tree/master/tools/samtools_idxstats.
91. *Definition of SAM/BAM format*.; Available from: <https://samtools.github.io/hts-specs/>.
92. Li, H., *Improving SNP discovery by base alignment quality*. *Bioinformatics*, 2011. **27**(8): p. 1157-8.
93. Li, H., *A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data*. *Bioinformatics*, 2011. **27**(21): p. 2987-93.

94. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. Bioinformatics, 2009. **25**(16): p. 2078-9.
95. Danecek, P., S. Schiffels, and R. Durbin. *Multiallelic calling model in bcftools (-m)*. Available from: <http://samtools.github.io/bcftools/call-m.pdf>.
96. Durbin, R., *Segregation based metric for variant call QC*.
97. *SAMTools GitHub page*.; Available from: <https://github.com/samtools/samtools>.
98. Li, H. *Mathematical Notes on SAMtools Algorithms*.; Available from: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>.
99. Amemiya, H.M., A. Kundaje, and A.P. Boyle, *The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 9354.
100. Quinlan, A.R. and I.M. Hall, *BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features*. Bioinformatics, 2010. **26**(6): p. 841-2.
101. Gruening, B.A. *Galaxy Wrapper*. 2014; Available from: <https://github.com/bgruening/galaxytools>.
102. *Broad Institute. Picard*. . Available from: <http://broadinstitute.github.io/picard/>.
103. Ramirez, F., et al., *deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(W1): p. W160-5.
104. Feng, J., et al., *Identifying ChIP-seq enrichment using MACS*. Nat Protoc, 2012. **7**(9): p. 1728-40.
105. Zhang, Y., et al., *Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS)*. Genome Biol, 2008. **9**(9): p. R137.
106. *ENCODE: ATAC-seq Data Standards and Prototype Processing Pipeline*. 2017; Available from: <https://www.encodeproject.org/atac-seq/>.
107. Corces, M.R., et al., *Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution*. Nat Genet, 2016. **48**(10): p. 1193-203.
108. Ludwig, L.S., et al., *Transcriptional States and Chromatin Accessibility Underlying Human Erythropoiesis*. Cell Rep, 2019. **27**(11): p. 3228-3240 e7.
109. Telenius, J. and J.R. Hughes, *NGseqBasic - a single-command UNIX tool for ATAC-seq, DNaseI-seq, Cut-and-Run, and ChIP-seq data mapping, high-resolution visualisation, and quality control*. bioRxiv, 2018: p. 393413.
110. Messegue, X., et al., *PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches*. Bioinformatics, 2002. **18**(2): p. 333-4.
111. Farre, D., et al., *Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3651-3.
112. Debnath, J., et al., *The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini*. Cell, 2002. **111**(1): p. 29-40.
113. Tyson, D.R., et al., *Culture requirements of prostatic epithelial cell lines for acinar morphogenesis and lumen formation in vitro: role of extracellular calcium*. Prostate, 2007. **67**(15): p. 1601-13.
114. Mills, K.R., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3438-43.
115. Hardison, R.C., *Evolution of hemoglobin and its genes*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(12): p. a011627.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer comitê de ética para uso de animais



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **CARACTERIZAÇÃO DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GLOBINAS NA PRÓSTATA**, registrada com o nº **4223-1**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho e Isabella Barbutti Gonçalves**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **06 de junho de 2016**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/07/2016-01/07/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/07/2016-01/07/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongos Heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	80
Peso / Idade:	80 dias / 13g
Sexo:	65 machos / 35 fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 06 de junho de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

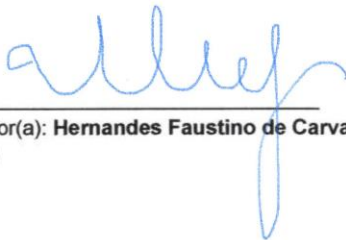
ANEXO II – Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **PADRÃO DE EXPRESSÃO E MECANISMOS DE REGULAÇÃO DOS GENES DAS HEMOGLOBINAS NA PRÓSTATA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de Outubro de 2020

Assinatura : Isabella Barbutti Gonçalves
Nome do(a) autor(a): **Isabella Barbutti Gonçalves**
RG n.º 37.555.621-7

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Hermendes Faustino de Carvalho**
RG n.º 32.190.095-9