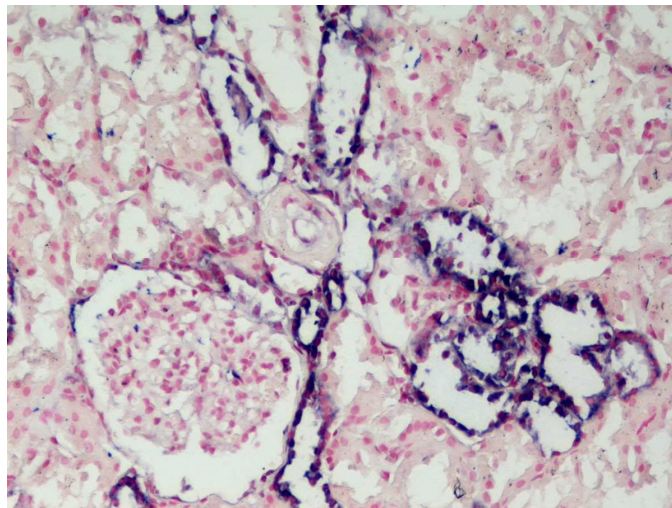


Luciana Maria Vaz Moreira

***ERITROPOIETINA:
PRODUÇÃO RENAL, ANEMIA E CANCRO***



Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina e Oncologia Molecular
pela Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, apresentada por

Luciana Maria Vaz Moreira

Com o tema:

ERITROPOIETINA: PRODUÇÃO RENAL, ANEMIA E CANCRO

Trabalho realizado no Centro de Estudos de Paramiloidose, Instituto Nacional de
Saúde Dr. Ricardo Jorge

ORIENTADOR

Professor Doutor Paulo Pinho e Costa

Centro de Estudos de Paramiloidose, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

CO-ORIENTADORA

Doutora Idalina Beirão

Hospital Geral de Santo António

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Centro de Estudos de Paramiloidose do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge por tornar possível a realização deste trabalho, quer pelo financiamento disponibilizado bem como pela utilização das suas instalações.

Ao Dr. Paulo Pinho e Costa agradeço, a oportunidade de trabalhar no Centro de Estudos de Paramiloidose após terminar a minha licenciatura. A sua orientação foi fundamental para a minha aprendizagem na área da Biologia Molecular. Agradeço acima de tudo a confiança depositada em mim e no meu trabalho, que proporcionou uma certa liberdade de escolha relativamente à execução das tarefas, tendo sido um ponto-chave para me tornar rapidamente autónoma no meu trabalho. Agradeço também a excelente oportunidade que me proporcionou com um estágio num laboratório internacional de referência para aprender a técnica de hibridização *in situ*, a qual foi fundamental para a realização deste trabalho. Sem o seu apoio e orientação, a realização desta tese não teria sido possível.

Agradeço à Dra. Idalina Beirão, a confiança, a dedicação e acima de tudo o apoio e estímulo constantes. Face às inúmeras contrariedades do trabalho, inerentes às próprias técnicas desenvolvidas, à falta de resultados, ou até mesmo aos resultados completamente inesperados, quando a opção mais fácil seria desistir, a Dra. Idalina foi o símbolo da perseverança e da força de vontade. Agradeço também o apoio que tornou possível a realização do estágio em Berlim e ainda o alento para continuar face às adversidades, bem como as discussões científicas tão úteis para o trabalho.

À técnica Teresa Barandela agradeço, não só as longas horas passadas ao micrótomo, ou as lições de histologia e imunohistoquímica, mas agradeço acima de tudo, a amizade, a dedicação, os conselhos, as “dicas” especiais e únicas da D. Teresa, os desabafos, os incentivos constantes e o carinho que sempre demonstrou por mim. A D. Teresa foi um elemento fundamental para que a conclusão desta tese fosse possível.

Ao técnico Paul Moreira agradeço o apoio, não só técnico como pessoal, a amizade, o companheirismo e também a paciência que demonstrou para me ensinar várias técnicas

de biologia molecular, desde o meu primeiro dia de trabalho no CEP. Quando uma simples reacção de PCR era ainda um “bicho-de-sete-cabeças” para mim, o Paul ensinou-me da forma mais simples possível que uma simples reacção de PCR é isso mesmo... simples.

I would like to thank Prof Bachmann for his warm welcoming in his laboratory at Institut für Vegetative Anatomie, Charité, in Berlin, for all the help and collaboration I received.

I thank Alex Paliege for all the time spent helping me with my work, sometimes even “forgetting” his own work. I’m so grateful for everything, thanks for your friendship.

I thank Petra Landmann for teaching me every small detail the *in situ* hybridization technique.

I also want to thank Alexandra Boehlick, Kerim Mutig, Franziska Theilig, Jörg, Adelina Stoessel, Christian Kastner, Pascale Schulte and to the other members for all the help, friendship, and making my stay in the laboratory and in Berlin so pleasant.

Agradeço à Professora Fátima Carneiro a disponibilidade e prontidão com que nos ajudou nas experiências de Microdissecção a Laser, ao colocar o microdissector ao nosso dispor sempre que foi necessário.

Agradeço à técnica Paula Silva a preciosa ajuda nas experiências de microdissecção a laser. A sua disponibilidade, prontidão e, acima de tudo, experiência e engenho na técnica tornaram possível a realização de uma parte importante deste trabalho. À Paula Silva agradeço ainda a simpatia e amizade que resultou desta colaboração.

Agradeço ao serviço de Anatomia Patológica do HGSA pela colaboração neste trabalho, facilitando o acesso às biópsias em estudo.

Agradeço à Professora Berta Martins do Laboratório de Imunogenética do ICBAS a colaboração, disponibilidade e ajuda sempre que necessária.

Agradeço à Professora Paula Ferreira do Laboratório de Imunologia do ICBAS pelo apoio constante e pela ajuda fundamental nas primeiras fases do trabalho, recebendo-me no seu laboratório sempre que foi necessário.

Agradeço à Professora Luisa Lobato e à Dra. Isabel Tavares a confiança depositada no meu trabalho e a excelente oportunidade que proporcionaram ao integrar-me no seu projecto. Foi muito gratificante fazer parte de um projecto que se tem revelado muito promissor.

À técnica Zulmira Quintas agradeço especialmente a enorme amizade. A D. Zulmira foi um elemento muito importante nesta tese na medida em que me apoiou diariamente e ajudou em todos os momentos. Agradeço o carinho e o apreço que sempre demonstrou por mim, assim como as palavras de incentivo e as suas críticas nos momentos oportunos. Obrigada D. Zulmira pela sua verdadeira amizade.

Agradeço à Isabel Friães, Helena Pereira, Laurinda Teixeira e Lúcia Friães pela enorme amizade, pela ajuda, compreensão e apoio nos maus momentos. Agradeço todos os pequeninos mas muito especiais momentos de alegria, distração e boa disposição que me proporcionaram, principalmente quando “fugia” momentaneamente do laboratório para a secretaria para “desanuviar”. Isabel, Helena, Laurinda e D. Lúcia, obrigada pela ajuda administrativa, pelas conversas, pelo apoio moral e psicológico, e claro, obrigada também pelos chocolates!...

Ao Pedro Lacerda agradeço as longas conversas e discussões científicas, filosóficas ou mesmo pessoais, as dúvidas e incertezas acerca de tudo e mais alguma coisa, ou então os simples “pois” ou “huhum”.

Agradeço especialmente à Márcia Dinis e Gabriela Branquinho, a enorme, sincera e eterna amizade, bem como o apoio em todos os momentos da realização desta tese.

Atendendo a longa lista de nomes que aqui se seguiria, tendo em conta o limite de espaço, e não querendo levantar discussão quanto a ordem pela qual estes surgiriam, pois todos ocupam um lugar especial... Agradeço a todos, amigas e amigos, que estão sempre presentes, nos bons e maus momentos, mesmo quando longe da vista, estão perto do meu coração. Obrigada por estarem comigo e por me “aturarem”... o que desde logo faz de todos vocês pessoas muito especiais!

Agradeço à minha família o apoio incondicional que sempre me proporcionaram. Aos meus tios e primos, pelo carinho e amizade.

Por último guardei o mais especial dos agradecimentos. Um muito obrigada aos meus pais e avó. São poucas as palavras para vos agradecer, o amor, carinho, educação e a “base” de apoio que sempre me proporcionaram para que eu fosse sempre mais além... quero que saibam que, apesar de nem sempre demonstrar, vocês são mesmo as pessoas que eu mais amo.

Alguns dos resultados contidos nesta tese permitiram a elaboração de um artigo científico:

Moreira L., Beirão I., Barandela T., Lobato L., Silva P., Carneiro F., Porto G., Costa P.P. Identification of Distal and Cortical Collecting Tubular Epithelial Cells as the Erythropoietin-Expressing Cells in Adult Human Kidney. *Submitted to Kidney International*

Índice

Agradecimentos	4
Agradecimentos	5
RESUMO	13
ABSTRACT	17
I. INTRODUÇÃO.....	21
1. Descoberta da Eritropoietina	23
2. Fisiologia da Eritropoietina	25
2.1. Interação EPO/EPOR e vias de sinalização envolvidas.....	26
2.2. Regulação da Expressão da EPO: papel do HIF	28
2.3. Estrutura da EPO	31
2.4. Eritropoietina Recombinante Humana	33
3. Funções da Eritropoietina.....	35
3.1. Função Hematopoiética	35
3.2. Funções Extra-Hematopoiéticas	35
4. Fisiopatologia da Anemia.....	39
4.1. Anemias relacionadas com elevados níveis de EPO	40
4.2. Anemias relacionadas com baixos níveis de EPO.....	41
4.3. Aplicação da rHuEPO no tratamento da Anemia.....	42
5. Eritropoietina no Cancro	43
5.1 A anemia no cancro	45
5.2. Efeitos da administração de rHuEPO nos doentes oncológicos	45
6. Produção Renal de Eritropoietina:.....	48
6.1. Fisiologia do rim.....	48
6.2. Controvérsia na Identificação das Células Renais Produtoras de EPO	51
II. OBJECTIVO.....	53
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
1. Biópsias Renais Humanas	59
2. Detecção da expressão do gene da EPO no rim humano por Hibridização in situ. 61	
2.1. Isolamento do mRNA de rim.....	61
2.2. Síntese do cDNA e amplificação de fragmentos do gene da EPO	63

2.3. Sequenciação dos produtos de PCR obtidos	66
2.4. Clonagem dos produtos de PCR em vectores plasmídicos.....	66
2.5. Sequenciação dos clones obtidos.....	68
2.6. Síntese das sondas de RNA	69
2.7. Hibridização <i>in situ</i>	70
3. Microdissecção a Laser	72
3.1. Isolamento e amplificação do RNA	72
3.2. Avaliação da expressão génica da EPO por qRT-PCR	74
4. Imunohistoquímica	76
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
Obtenção dos clones EPO e GAPDH	79
Sequenciação dos clones obtidos.....	81
Síntese das sondas de RNA	85
Hibridização <i>in situ</i>	86
Expressão do gene da EPO no rim humano	86
Isolamento das células renais produtoras de EPO e quantificação dos níveis de expressão do gene da EPO nestas células.....	91
Identificação das células renais humanas produtoras de EPO.....	92
V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	99
VI. BIBLIOGRAFIA.....	103
ANEXO 1 – GENE DA EPO	117
ANEXO 2 – cDNA DA GAPDH	121
ATRIBUIÇÕES.....	125
LISTA DE ABREVIATURAS.....	127

RESUMO

Resumo

A eritropoietina (EPO) é uma hormona glicoproteica de 30,4 kDa, produzida essencialmente pelo fígado no estado fetal e pelo rim no adulto. A sua principal função é estimular a eritropoiese, no entanto, vários estudos têm mostrado que poderá também ter uma função protectora a nível neuronal, cardíaca, renal e vascular, o que faz da EPO um bom candidato na terapia de doenças do sistema nervoso, cardíaco e renal.

O rim regula a eritropoiese através da produção de EPO. O local exacto de produção da EPO renal tem sido um tópico de debate. Diversos estudos realizados em ratos anémicos sujeitos a hipóxia severa têm apresentado resultados não concordantes, no entanto os mais convincentes sugerem serem as células intersticiais peritubulares o local de produção da EPO.

Este trabalho teve como objectivo identificar as células renais produtoras de EPO em rim humano adulto normóxico. O estudo foi realizado num total de 55 biópsias renais de indivíduos com função renal normal e ausência de anemia. A detecção da expressão do gene da EPO foi efectuada por hibridização *in situ* com sondas específicas para o gene da EPO. Os resultados revelaram expressão da EPO em células epiteliais dos túbulos distais e colectores corticais e, em algumas biópsias, também em células glomerulares e intersticiais. Estes resultados sugerem que, no rim humano normóxico, a eritropoietina é produzida pelos túbulos distais e colectores corticais. Estando o controlo do volume corporal a cargo do sistema renina-angiotensina, e sendo a renina produzida pelas células justaglomerulares, que estão em contacto com as células da mácula densa e parte do túbulo distal contornado, a identificação das células tubulares distais como produtoras de EPO coloca a produção de EPO e o controlo do volume corporal no mesmo segmento renal do nefrónio. Este resultado abre novas perspectivas para o estudo da fisiologia e fisiopatologia do rim.

ABSTRACT

Abstract

Erythropoietin (EPO) is a 30,4 kDa glycoprotein hormone mainly produced by the fetal liver and the kidney in adults. EPO promotes the proliferation and differentiation of erythrocyte precursors, however several studies have shown also a possible protective role in neural, cardiac, renal and vascular functions, indicating erythropoietin as a good candidate in therapy of nervous, cardiac and renal diseases.

The kidney regulates the erythropoiesis through EPO production. The precise location of renal EPO production has been intensively debated. Studies performed on anemic mice submitted to severe hypoxia presented disparate results, but the most convincing suggest that peritubular interstitial and proximal tubular epithelial cells are the erythropoietin-producing sites.

The aim of this study was the identification of the EPO-producing cells in adult human kidney, not submitted to hypoxia. The study was performed on 55 human renal biopsies from individuals without anemia and with normal renal function. Erythropoietin gene expression was detected by *in situ* hybridization using specific probes for the human EPO gene. The results demonstrated that EPO was expressed by epithelial distal tubular cells and cortical collecting tubules, and in a few biopsies, was also expressed by glomerular and interstitial cells. These results suggest that, in the normoxic human kidney, erythropoietin is mainly produced by distal and cortical collecting tubules. Since control of the body volume is regulated by the renin-angiotensin system, and given that renin is produced by the juxtaglomerular cells, which are in contact with macula densa cells and part of the distal convoluted tubule, the identification of distal tubular cells as EPO-producing locates the erythropoietin production and volume control in the same nephron segment. This result opens new perspectives to the study of kidney physiology and pathophysiology.

I. INTRODUÇÃO

1. Descoberta da Eritropoietina

Em meados do século XIX, o médico francês Denis Jourdanet observou em doentes operados a grandes altitudes que o seu sangue era mais espesso, escuro e fluía mais lentamente [1]. Medindo o número de glóbulos vermelhos do sangue verificou que este era mais elevado do que o normal. Paul Bert, um fisiologista da mesma nacionalidade, pioneiro na medicina de aviação, e reconhecido pelos seus estudos publicados no livro “La Pression Barometrique”, estudou animais que viviam a grandes altitudes. Bert foi o primeiro a relacionar o aumento do número de glóbulos vermelhos com a redução da pressão barométrica e, consequentemente, com a diminuição da pressão de oxigénio (PO_2) [2]. Bert pensou que a elevada capacidade de transporte de O_2 do sangue seria determinada geneticamente.

Viault, outro francês, durante uma expedição de 3 semanas às montanhas do Perú, verificou que os indivíduos expostos a elevada altitude desenvolviam uma adaptação a curto prazo traduzida por um aumento do número de eritrócitos, e que os valores de Hemoglobina (Hb) no sangue de residentes a elevadas altitudes eram superiores aos dos residentes ao nível do mar.

Em 1906 Carnot e Deflandre sugeriram que a produção de glóbulos vermelhos era regulada por um mecanismo humoral relacionado com a oxigenação do sangue arterial através de um factor intermediário que estimula a eritropoiese, ao qual chamaram “hemopoietina” [3]. Ao injectarem o plasma de coelhos moderadamente anémicos em coelhos normais verificaram um aumento do número de glóbulos vermelhos no sangue periférico. Em 1948 Bonsdorff e Jalavisto verificaram que este factor humoral afectava apenas a linha eritróide, renomeando a “hemopoietina” de Carnot e Deflandre com o nome actual de “Eritropoietina” (EPO).

Em 1953 surgiu a primeira demonstração convincente do efeito directo do soro anémico na regulação da produção de glóbulos vermelhos [4]. Allan Erslev injectou o plasma de coelhos anémicos em coelhos normais e o seu hematócrito aumentou; pelo contrário, ele injectou plasma normal em coelhos normais e o hematócrito manteve-se.

Erslev sugeriu um mecanismo de feedback para o controlo da massa de eritrócitos circulantes de acordo com as necessidades fisiológicas dos tecidos para o oxigénio.

Em 1957, Jacobson e Goldwasser identificaram o rim como o principal local de produção da EPO; em 1961 Gallagher *et al.* identificaram uma deficiência de EPO em doentes com urémia; Eschbach e Scribner, em 1967, sugeriram a administração de EPO como tratamento da anemia urémica. Em 1976 Goldwasser e a sua equipa purificaram a hormona a partir da urina e em 1983 a EPO foi clonada e sequenciada, o que resultou na EPO recombinante usada ainda hoje. A EPO recombinante humana (rHuEPO) foi administrada a um doente pela primeira vez em Outubro de 1985 por Eschbach. Hoje, a EPO tem um papel relevante no tratamento de muitas formas de anemia, e outras aplicações se perspectivam, como as que decorrem da descoberta do seu potencial neuroprotector em situações de isquemia.

2. Fisiologia da Eritropoietina

A eritropoietina (EPO) é produzida essencialmente pelo fígado no estado fetal e pelo rim no adulto. O conhecimento sobre o mecanismo de regulação subjacente a esta troca no local de produção é ainda muito limitado. Estudos realizados em ovelhas demonstraram que se inicia ainda no útero, e completa-se após o nascimento; não é afectado por alterações hormonais durante os períodos pré e pós-natal, mas é profundamente afectado por alterações na hormona da tiróide e pelos níveis de oxigénio disponíveis [5-7].

A EPO é uma glicoproteína de 30,4 kDa que regula a produção diária de 2×10^{11} glóbulos vermelhos necessária para manter a capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue periférico sob condições fisiológicas [8]. Produzida no rim e libertada para a circulação, atinge a medula óssea na qual actua sobre receptores específicos (EPOR) promovendo a proliferação e diferenciação dos progenitores eritróides [9]. A sinalização EPO-EPOR está associada à activação da proteína citoplasmática tirosina cinase JAK2 (*Janus Kinase 2*) [10] e à molécula de sinalização STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), um factor de transcrição citoplasmático que desempenha um papel importante na regulação da eritropoiese *in vivo* [11].

A síntese da EPO é regulada ao nível do mRNA, por mecanismos sensíveis ao oxigénio. Em resposta à hipóxia (baixa tensão de oxigénio nos tecidos) a produção de EPO aumenta dentro de algumas horas [12]. Os níveis elevados de EPO em circulação actuam na medula óssea aumentando a produção de eritrócitos. A regulação do gene da EPO é o resultado directo da activação de um factor de transcrição induzido pela hipóxia (HIF - *hypoxia-inducible transcription factor*), que induz a expressão e a produção da eritropoietina [13].

2.1. Interação EPO/EPOR e vias de sinalização envolvidas

A EPO promove a viabilidade, proliferação e diferenciação dos progenitores eritróides através da sua ligação ao receptor de superfície específico, EPOR, por um mecanismo de feedback característico de uma hormona endócrina [14].

O receptor da EPO é uma proteína de 508 aminoácidos, membro da família de receptores de citocinas tipo I, de cadeia transmembranar simples. Estes receptores têm em comum motivos estruturais de 2 pares de cisteínas conservadas ligadas por pontes dissulfureto [15]. O EPOR existe como um homodímero na superfície celular dos eritrócitos [16], é constituído por um domínio extracelular e um domínio intracelular, e não possui actividade enzimática endógena de tirosina cinase [14]. Esta é-lhe conferida através da ligação ao domínio citoplasmático de cada polipéptido de uma JAK2. Estudos de difracção de raios-X do complexo EPO-EPOR indicam que a ligação de uma molécula de EPO ao receptor induz uma alteração conformacional no domínio extracelular do EPOR que diminui a distância transmembranar, e consequentemente a distância entre os domínios citoplasmáticos, permitindo a autofosforilação e activação da JAK2 iniciando assim a cascata de transdução de sinal [17]. A JAK2 activada induz, por sua vez, a fosforilação de tirosinas na região citoplasmática do EPOR que actuam como locais âncora para proteínas de sinalização intracelular com domínios SH2 (*Src homology 2*), como STAT5, MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI-3K (*phosphoinositide-3 kinase*) e Grb2 (*growth factor receptor-binding protein 2*) [14].

Vias de transdução de sinal induzidas pela EPO

A primeira das proteínas de sinalização a ser activada pela ligação da EPO ao seu receptor é a STAT5, que se dissocia do EPOR e é translocada para o núcleo onde activa os seus genes alvo como o bcl-xL e a ciclina D1 [14]. A activação da via JAK/STAT5 é aparentemente responsável pelos efeitos anti-apoptóticos da EPO sobre a síntese de hemoglobina.

A activação da via RAS-MAPK envolve diversos mecanismos. A proteína adaptadora Grb2 liga-se através da SHP2 (*Src homology 2-containing tyrosine phosphatase*) ou SHC ao EPOR activado, induzindo a translocação do SOS (*son-of-sevenless*) para a membrana plasmática, onde remove o GDP do RAS (inactivo) e

permite ao GTP ligar e activar o RAS. A actividade cinase do RAF-1, uma cinase específica de serina/treonina, é incrementada, o que leva à subsequente activação das MAPKs e indução dos genes *c-fos*, *c-myc*, *c-myb* e *c-jun*. As MAPKs activadas pela EPO são as ERKs (*extracellular signal-regulated kinase*), JNKs (*Jun N-terminal Kinases*) e p38-MAPKs. As ERKs estão associadas a respostas mitogénicas e de diferenciação enquanto que as JNKs e p38 regulam a apoptose [14]. A molécula Grb2 activa a RAS/MAP promovendo a proliferação celular [16].

A activação da via PI-3K resulta na fosforilação do AKT e na indução de diversas proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, Bcl-xL e proteína cinase B, prolongando assim a sobrevivência celular [16]. A activação do AKT inactiva a caspase9, o BAD e o GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*), contribuindo para a inibição da apoptose [14]. Além disso, o AKT fosforila factores de transcrição FOXO induzindo a sua retenção no citoplasma e prevenindo assim a transcrição de alguns genes pró-apoptóticos como o *bim*, *p27*, ligando *fas* e *trail*.

Juntamente com a activação do AKT a EPO promove a degradação do I κ B (*inhibitory κ B*) com a subsequente translocação do NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) para o núcleo e activação dos seus genes alvo. O NF- κ B induz a expressão de vários genes anti-apoptóticos (c-IAP1, c-IAP2, XIAP e gadd45b).

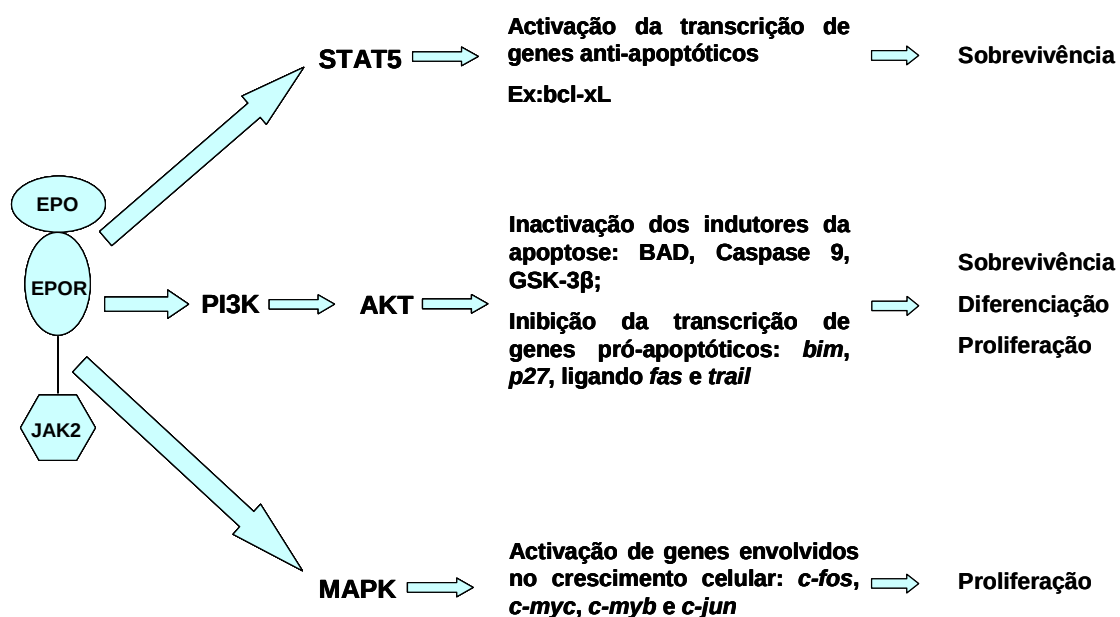


Figura 1 – Representação esquemática das vias de sinalização induzidas pela EPO.

Inactivação das vias de sinalização

A sinalização induzida pela EPO é altamente regulada de forma a prevenir a proliferação exagerada dos eritrócitos [16]. Aproximadamente 30 minutos após a ligação da EPO as vias de sinalização voltam aos valores basais por rápida desfosforilação e atenuação da JAK2. A fosfatase SHP1 é recrutada para o receptor e é capaz de desfosforilar tanto o EPOR como JAK2, ao ligar à Tyr 429 do EPOR por via do domínio SH2 [14]. Para além disso, STAT5 induz a transcrição de diversos factores: SOCS (*suppressors of cytokine signaling*), CIS (*cytokine-inducible SH2-domain-containing protein*) e SOC3 [16], que, por feedback negativo, suprimem a transdução de sinal induzida pela EPO [14]. Finalmente, a Lnk, uma proteína com um domínio SH2, implicada na sinalização de receptores de citocinas, regula negativamente a eritropoiese ao atenuar a activação da JAK2, sendo capaz de bloquear as 3 principais vias de sinalização (STAT5, PI-3K e MAPK).

2.2. Regulação da Expressão da EPO: papel do HIF

A síntese da EPO é controlada por mecanismos transcripcionais e pós-transcripcionais sensíveis ao oxigénio.

A oxigenação apropriada das células é um pré-requisito para o bom funcionamento dos tecidos e órgãos [18], pois influencia a fisiologia do crescimento e desenvolvimento, o metabolismo energético, a eritropoiese, a angiogénese, o pH das células, e as decisões de sobrevivência celular como a proliferação e apoptose. É importante na fisiopatologia da anemia, inflamação e cancro [19].

A hipóxia induz a expressão do gene da EPO através da activação transcripcional e estabilização do mRNA [20], como resultado directo da activação do HIF, um factor de transcrição que se liga ao elemento de resposta à hipóxia na extremidade 3' do gene da EPO [13] e induz a sua expressão.

A produção e activação do HIF é regulada a nível da sua cadeia α , por dois mecanismos dependentes do oxigénio (Fig. 2) [21]. No primeiro mecanismo, dois resíduos conservados de prolina localizados no domínio de degradação dependente do

oxigénio (ODDD - *oxygen-dependent degradation domain*) sofrem hidroxilação por acção de proteínas com domínio prolyl-hydroxylase (PHDs) e isto permite a interacção da cadeia α com a proteína von Hippel–Lindau (pVHL), um componente de uma ubiquitina ligase. A subsequente ubiquitinação leva à degradação do HIF- α pelo proteossoma. No segundo mecanismo, um resíduo de asparagina (Asn803) é hidroxilado pelo factor de inibição do HIF (FIH1), e a actividade do HIF é reprimida ao impedir a ligação do coactivador de transcrição p300/CBP. As PHDs e o FIH1 usam o oxigénio como co-substrato, por isso uma diminuição na tensão de oxigénio resulta na inibição das PHDs e do FIH1. A cadeia α dimeriza com a cadeia β , o complexo HIF é estabilizado e, após recrutamento do co-activador p300/CBP, liga-se ao elemento de resposta a hipóxia (HRE - *hypoxia response element*) dos genes alvo do HIF.

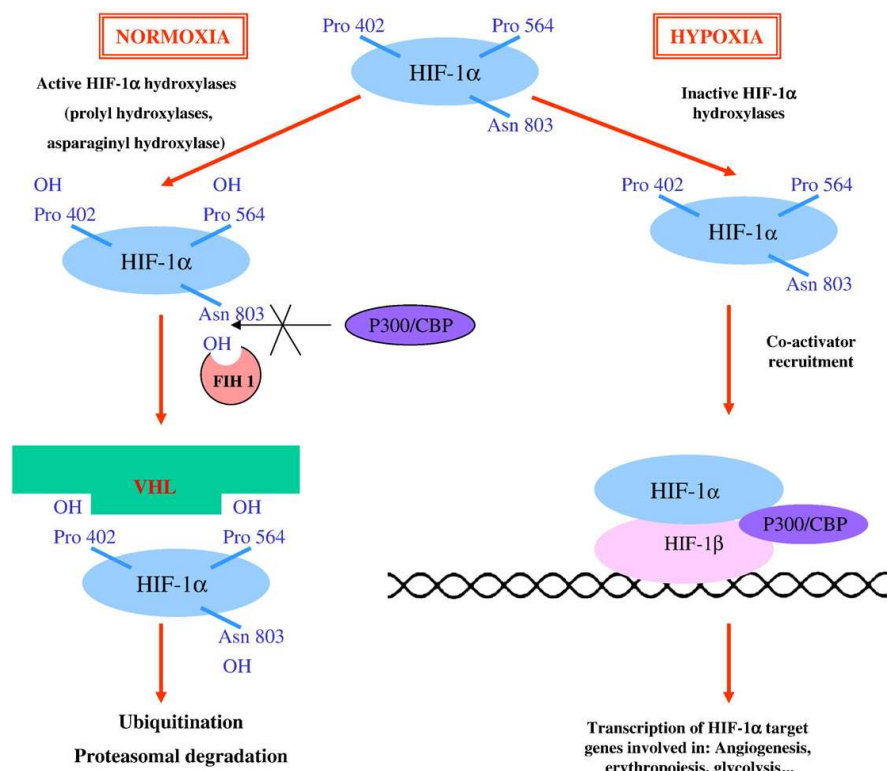


Figura 2 – Regulação do HIF dependente do oxigénio. Imagem retirada de Al-Sheikh *et al.* 2008, com copyright de Elsevier Limited.

O sistema HIF regula genes envolvidos em vários processos biológicos:

- Metabolismo energético – enzimas glicolíticas e transportadores da glucose (GLUT)
- Regulação vasomotora – sintetases de óxido nítrico (NO), heme oxygenase-1 (HO-1) e endotelinas
- Angiogénese – factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), angiopoietina e o seu receptor Tie-2, factor de crescimento dos fibroblastos (FGF) e *platelet-derived growth factor* (PDGF)
- Metabolismo da matriz extracelular – metaloproteinases e inibidores das metaloproteinases, colagénios e prolil-hidroxilases de colagénio
- Apoptose – NIP3, Nix, factores anti-apoptóticos (Bcl-2), e reguladores do ciclo celular (p21 e p27).
- Regulação da eritropoiese – regula a transferrina e o seu receptor, envolvidos no transporte e captação do ferro pelas células. Regula a produção de eritropoietina. Durante a hipóxia localizada regula a transcrição de factores como a endotelina-1, *inducible nitric-oxide synthase* (iNOS), *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) e HO-1 que melhoram o fluxo sanguíneo.
- Regulação de genes envolvidos em processos de infecção, trauma ou inflamação.

A identificação de múltiplas isoformas da cadeia α do HIF (HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α) levanta questões relacionadas com as suas funções. Até à data desconhece-se a função do HIF-3 α . Sabe-se que o HIF-1 α e HIF-2 α têm mecanismos de regulação concordantes, embora não idênticos. No entanto, vários estudos indicam uma diferença no padrão de expressão e na distribuição celular, o que pode ser indicativo de diferentes funções. Rosenberger *et al.* verificaram que, induzindo hipóxia em ratos, independentemente do tipo de estímulo, as populações celulares que expressavam o HIF-1 α e HIF-2 α no rim eram diferentes. O HIF-1 α era predominantemente expresso em células dos túbulos proximais e colectores, e o HIF-2 α era expresso predominantemente em células peritubulares intersticiais e algumas células glomerulares. Porque o HIF-2 α se acumula nas células peritubulares e por ter sido descrita a produção da EPO pelas células intersticiais peritubulares, sugeriu-se que este seria o regulador da EPO. No entanto, diversos estudos mostram que o HIF-1 α e o HIF-2 α contribuem igualmente para a regulação da EPO, embora de uma forma diferenciada

específica do tipo celular. Até ao momento a exceção encontra-se na produção endógena da EPO no cérebro, a qual é induzida apenas pelo HIF-2 α [22].

2.3. Estrutura da EPO

O gene da EPO está localizado no cromossoma 7 como uma cópia única [23]. Os 5 exões por que é composto codificam uma proteína de 193 aminoácidos (aa). Durante a produção e secreção da EPO ocorre uma clivagem de 27 aa no N-terminal e gera-se um produto secretado de 166 aa. Uma arginina carboxi-terminal na posição 166 é posteriormente removida, sendo a EPO em circulação composta por 165 aa. A remoção da arginina terminal ocorre tanto na proteína humana como na EPO recombinante (rHuEPO) [23].

A estrutura da EPO foi determinada em 1998 por Cheetham *et al.* (Fig. 3), e caracteriza-se por 4 hélices alfa com uma orientação “up-up-down-down”. Duas das hélices anti-paralelas estão ligadas por uma ponte dissulfureto entre a Cys7 e Cys161, enquanto as outras duas hélices estão ligadas por uma pequena ansa.

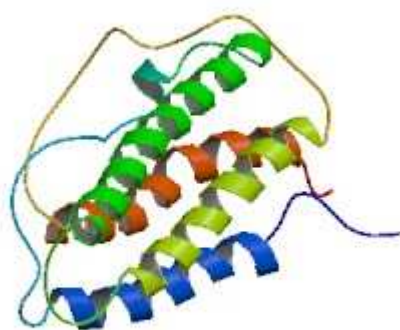


Figura 3 – Estrutura da Eritropoietina determinada por Ressonância Magnética Nuclear (NMR). Imagem retirada de Cheetham *et al.* (1998), com copyright do *Nature Publishing Group*.

A EPO é uma glicoproteína com um peso molecular de 30.4 kDa, 40% do qual é atribuído ao seu conteúdo em carboidratos [23]. Esta glicoproteína contém 4 cadeias laterais glicosiladas, três N-linked e uma O-linked. Os locais de N-glicosilação são em resíduos de asparagina (Asp24, Asp38 e Asp83) e o local de O-glicosilação ocorre numa serina (Ser126). As cadeias N-glicosiladas contêm N-acetil-lactosamina, e a cadeia O-glicosilada contém ácido glicosamínico e ácido siálico.

Importância da Estrutura da EPO para a sua função

A glicosilação da EPO e a presença de duas pontes dissulfureto específicas conferem características estruturais importantes para o desempenho da sua função.

A redução das ligações dissulfureto entre os resíduos Cys7 e Cys160 e entre os resíduos Cys29 e Cys33 resulta na perda da actividade biológica da EPO, e a substituição do resíduo Cys33 por uma prolina reduz a sua função biológica. A alquilação dos grupos sulfidrílo resulta na perda irreversível da actividade biológica da proteína.

As cadeias glicosiladas da EPO são necessárias para a sua actividade biológica, conferindo estabilidade estrutural e térmica, protecção contra os radicais livres e, principalmente, atraso na eliminação da hormona do plasma [14]. Neste aspecto são particularmente importantes os resíduos de ácido siálico ligados a quatro das cadeias de carboidratos [25]. Os carboidratos são também importantes no controlo do metabolismo da EPO e na selectividade da sua função. Têm sido propostas diversas estratégias para separar os efeitos neuroprotectores da função hematopoiética, de forma a tornar selectivo o tratamento com a EPO e dirigido especificamente para as funções hematopoiéticas ou não hematopoiéticas.

EPO Carbamilada – a transformação de lisinas em homocitrulinas por carbamilação afecta a conformação e função da proteína e interfere com a ligação ao EPOR [15]. A administração de EPO carbamilada a ratos não aumentou o hematócrito, mas esta ligou-se às células neuronais e protegeu-as da apoptose [26]. A EPO carbamilada poderá fornecer neuro protecção sem estimular a eritropoiese.

EPO assialica – A quantidade de ácido siálico é importante para a actividade eritropoiética, relacionando-se positivamente com o tempo de semi-vida da EPO no soro e com a sua actividade, e negativamente com a sua afinidade para o EPOR. Isoformas da EPO com maior quantidade de ácido siálico têm sido desenhadas de forma a aumentar o tempo de semi-vida e a actividade eritropoiética. A assialo-EPO por sua

vez tem um tempo de semi-vida muito curto (minutos), sendo rapidamente removida do sangue, e, tal como a EPO carbamilada, tem actividade citoprotectora e não eritropoiética [15].

EPO com N-glicosilação de asparagina – a N-glicosilação de asparagina é um importante contributo para prolongar a sobrevivência da epo em circulação [17]. A adição de mais locais de N-glicosilação ao polipeptido da EPO resulta num produto com maior tempo de semi-vida.

2.4. Eritropoietina Recombinante Humana

Os agentes estimuladores da eritropoiese (ESAs) são produtos recombinantes usados no tratamento da anemia [27]. Actualmente existem três agentes eritropoiéticos disponíveis para aplicação terapêutica: epoetina alfa, epoetina beta, e darbepoietina alfa [28]. Estas três formas de rHuEPO diferem em termos de modificações farmacológicas, afinidade para o receptor, e tempo de semi-vida no soro, o que permite estratégias de dosagem diferentes.

Eritropoietina Recombinante Humana

A Epoetina- α e a Epoetina- β actuam sobre o receptor do mesmo modo que a EPO nativa, activando as vias de sinalização que estimulam a produção de eritrócitos e inibição da apoptose dos progenitores eritróides.

Tal como a hormona nativa, a epoetina alfa e beta consistem em 165 aa, mas diferem no seu conteúdo em carboidratos [29].

A Epoetina é mais eficaz a estimular a eritropoiese, embora estudos experimentais indiquem que também desempenha funções não eritropoiéticas, incluindo protecção dos tecidos do sistema nervoso, miocárdio, rim e intestino.

Darbepoetina alfa

A EPO tem sido modificada de forma a aumentar o seu tempo de semi-vida para reduzir a administração da proteína e minimizar o custo do tratamento [17]. A darbepoetina (DPO) tem 5 cadeias de N-glicosilação, em vez das 3 que existem na EPO

nativa e recombinante [29]. Os dois locais de N-glicosilação adicionais conferem-lhe um maior peso molecular, de aproximadamente 38 kDa. A darbepoetina tem ainda 22 resíduos de ácido siálico, em oposição aos 14 da rHuEPO [17]. Estas modificações conferem-lhe um aumento do tempo de semi-vida, o que é vantajoso uma vez que requer uma dosagem menos frequente. A darbepoietina alfa é administrada em doentes com doença renal crónica e em doentes com cancro submetidos a quimioterapia.

3. Funções da Eritropoietina

3.1. Função Hematopoiética

A EPO actua sobre os progenitores eritróides estimulando a sua proliferação e diferenciação durante a eritropoiese, levando à produção de eritrócitos, através de um mecanismo de inibição da apoptose. No entanto, o mecanismo detalhado pelo qual a EPO inibe a apoptose nas células eritróides continua a ser tema de debate. As vias possíveis são as JAK2/STAT5 e PI3K que induzem a activação do Bcl-xL [30]. Mori *et al.* demonstraram *in vitro* que a EPO activa as ERKs que por sua vez levam à expressão do Bcl-xL, um gene anti-apoptótico da família do Bcl-2, via inibição da actividade das caspases, resultando na protecção das células eritróides contra a apoptose [31].

3.2. Funções Extra-Hematopoiéticas

A eritropoiese foi considerada originalmente como a única função da EPO. No entanto, a expressão de EPOR em células não-hematopoiéticas como células endoteliais vasculares [32], células do músculo liso [33], mioblastos esqueléticos [34], miócitos cardíacos [35], neurónios [36], fotoreceptores da retina [37], células estromais do fígado [38], placenta [39], rim [40] e macrófagos [41] e o facto de vários estudos demonstrarem que a EPO para além de ser produzida pelo rim é também produzida pelo fígado, tecido neuronal [41], trato genital feminino [42], placenta [43], testículo [44] e retina sugerem que a EPO seja responsável por diversas actividades biológicas para além da eritropoiese [23].

O EPOR está presente em linhas sanguíneas não eritróides e em múltiplas células não hematopoiéticas como por exemplo em bainhas de mielina de nervos radiculares nos nervos periféricos humanos, sugerindo um papel citoprotector.

A EPO é assim uma hormona endócrina e parácrina-autócrina, com capacidade de protecção dos tecidos. Esta capacidade de protecção advém do facto da EPO inibir a

apoptose dos tecidos, impedindo a sua destruição excessiva [45]. A EPO actua sobre as citocinas pró-inflamatórias antagonizando a sua actividade, e promove a cicatrização ao estimular a angiogénese e crescimento de capilares.

Acção neuroprotectora

No cérebro os principais locais de produção são o hipocampo, cápsula interna, córtex, células endoteliais cerebrais e astrócitos [23]. No Sistema Nervoso Central (SNC) os neurónios expressam o EPOR e os astrócitos produzem EPO [46].

Sakanaka *et al.* demonstraram *in vivo* que a EPO protege os neurónios contra a morte celular induzida por isquemia e verificaram ainda que a EPO pode exercer os seus efeitos neuroprotectores ao reduzir a formação de radicais livres induzida pelo óxido nítrico (NO) ou antagonizando a sua toxicidade. Ratos deficientes em NO sintetase neuronal são tolerantes à isquemia cerebral. A EPO endógena no cérebro é crucial para a sobrevivência neuronal, pois previne a apoptose nos neurónios motores em situação de isquemia experimental da medula espinal [46, 47].

O mecanismo exacto do efeito neuroprotector da EPO não é totalmente conhecido mas pensa-se que poderá envolver a promoção das cascatas de sinalização de sobrevivência celular, acção antioxidante e anti-inflamatória [47]. Maiese *et. al.* afirmam que a EPO oferece protecção neuronal e vascular não só através da manutenção da integridade celular mas também através da prevenção da inflamação celular. Estas capacidades resultam da activação da JAK2 e da proteína cinase B AKT [48].

Desenvolvimento do SNC

EPO e EPOR são expressos no SNC durante o desenvolvimento fetal humano [49]. Em modelos animais exercem funções no desenvolvimento do SNC nomeadamente no fecho completo do tubo neural, neurogénese e aumento da sensibilidade dos neurónios ao stress por hipóxia.

Barreira hemato-encefálica

O peso molecular da EPO é superior ao limite permitido pela barreira hemato-encefálica. No entanto, em situações de isquemia cerebral a EPO consegue transpor a barreira através das regiões que ficam comprometidas e pensa-se que é capaz de reparar a barreira [50-52], mantendo a permeabilidade e as junções celulares [15]. Estudos de administração intravenosa de EPO marcada radioactivamente demonstraram que a EPO atravessa a barreira hemato-encefálica intacta a um ritmo muito lento e não saturável, o que sugere um sistema de transporte mediado por receptor [15]. A rHuEPO em modelos de isquemia cerebral focal em ratos atravessa a barreira hemato-encefálica e reduz a severidade dos danos em 50-75% [53]. A administração intravenosa de elevadas doses de EPO a indivíduos normais e esquizofrénicos resultou na detecção de EPO radioactiva no cérebro durante 2 dias com um pico às 4h [15]. Estes resultados indicam que pequenas quantidades de EPO são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica.

Estimulação das Células Endoteliais e Promoção da Angiogénese

Anagnostou *et al.* observaram um efeito mitogénico e quimiostático da EPO em culturas de células endoteliais [32], com acção dose-dependente. Esta resposta à EPO pode contribuir para os benefícios do tratamento com EPO em modelos animais de enfarte isquémico [15]. A EPO induz a produção da metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) nas células endoteliais, logo pode promover a proliferação e migração das células endoteliais e promover a angiogénese. Kertesz *et al.* demonstraram o papel da EPO na regulação da angiogénese *in vivo*. EPO e EPOR são expressos no sistema vascular durante a embriogénese e a eliminação da EPO ou EPOR leva a defeitos na angiogénese. A EPO regula a expressão do gene da angiopoietina 1 (Ang-1), um factor pró-angiogénico que desempenha um papel crucial na manutenção do sistema vascular. A angiogénese no cérebro confere também uma protecção indirecta ao melhorar o fluxo sanguíneo e o fornecimento dos nutrientes às células isquémicas [23].

Protecção vascular e Cardíaca

Cavillo *et al.* verificaram que a rHuEPO protege o miocárdio dos efeitos da isquemia-reperfusão. Culturas de cardiomiócitos de ratos adultos e modelos animais de enfarte do miocárdio mostraram que a EPO previne a apoptose dos cardiomiócitos sujeitos a hipóxia (*in vitro*) e no modelo animal de isquemia coronária reduz a perda de cardiomiócitos em 50%, o suficiente para normalizar a função hemodinâmica. As

observações sugerem o potencial terapêutico da rHuEPO no tratamento da isquemia de miocárdio e enfarte ao prevenir a apoptose e atenuar a deterioração.

Protecção Renal

Spandou *et. al.* usando ratos sujeitos a isquemia renal demonstraram que a EPO atenua o dano renal de isquemia/reperfusão. A administração de EPO tem efeito citoprotector associado ao efeito anti-apoptótico, provavelmente mediado pelo NF-kB. De forma semelhante ao que acontece no sistema nervoso, a EPO suprime a resposta inflamatória à isquemia, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, e o subsequente recrutamento de leucócitos e amplificação do dano. A EPO exerce também efeitos renoprotectores contra toxinas como ciclosporina e cisplatina.

Diversos ensaios clínicos têm concluído que a administração de rHuEPO em doentes em pré-diálise atrasa a progressão da doença renal.

Protecção da retina

A administração sistémica da rHuEPO antes ou imediatamente após um dano na retina protege as células ganglionares da apoptose e promove a recuperação da função da retina no rato [37].

Apoptose é o maior contributo para a morte das células neuronais resultante da retinopatia diabética [54]. A administração de EPO exógena por injeção intravítrea na diabetes precoce pode prevenir a morte celular das células da retina, sendo uma possível terapia para a retinopatia diabética precoce [54].

Ranchon *et al.* verificaram que a EPO protege a retina da exposição à luz durante um longo período [55]. Verificaram ainda que a caspase-9 foi activada aquando do início da exposição à luz, o que sugere que a caspase-9 pode desempenhar um papel na neuroprotecção.

A rHuEPO é um bom candidato na terapia de doenças do sistema nervoso, cardíaco e renal. A EPO oferece protecção neuronal e vascular não só através da manutenção da integridade celular mas também através da prevenção da inflamação.

4. Fisiopatologia da Anemia

A anemia é uma deficiência no número de glóbulos vermelhos funcionais no sangue, que se traduz pela diminuição dos níveis de Hemoglobina (Hb) para valores inferiores a 12 g/dl. Nestas condições a capacidade de transporte de oxigénio no sangue diminui, o aporte de oxigénio para os tecidos fica comprometido e estes entram em hipóxia. As consequências clínicas são várias e incluem astenia, fadiga, dispneia, taquicardia, vertigens, hipertrofia cardíaca, prejuízo da função cognitiva, anorexia, aumento da morbilidade e mortalidade e diminuição da qualidade de vida. Um dos sintomas mais comuns e que mais afecta os doentes com anemia é a fadiga. A fadiga associada à anemia pode ter efeitos consideravelmente negativos na qualidade de vida dos doentes. A condição de exaustão não melhora com o descanso e dificulta a capacidade do doente realizar as actividades diárias normais.

As causas para a anemia envolvem, normalmente, deficiências em vitamina B12, folato e/ou ferro, resultantes de perdas de sangue, má nutrição ou reacções medicamentosas. Na maioria dos casos, a anemia surge como efeito secundário de outras doenças, tais como doença renal crónica, doença inflamatória, cancro, terapêutica aplicada ao tratamento do cancro, entre outras. Actualmente, sabe-se que cerca de 75-80% dos doentes com cancro desenvolvem anemia como consequência da própria doença, assim como pelos efeitos nefrotóxicos e mielo-supressores das terapias (químio- e radioterapia).

A anemia pode ser classificada de acordo com vários parâmetros, desde os níveis de produção, destruição ou perda dos glóbulos vermelhos do sangue, morfologia dos eritrócitos, índices de células vermelhas do sangue (RBC), volume corpuscular médio (MCV) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) [56]. Os níveis de EPO presentes em circulação constituem também um parâmetro de avaliação da anemia, útil para definir o tipo de tratamento a aplicar, nomeadamente a administração de rHuEPO ou ESAs.

4.1. Anemias relacionadas com elevados níveis de EPO

Os níveis elevados de EPO em situações de anemia ocorrem normalmente quando os defeitos na eritropoiese se encontram a jusante da produção de EPO. As causas geralmente envolvem situações de falha ou dano na medula óssea e deficiências nutricionais ou nas proteínas dos eritrócitos.

No caso de ocorrerem disfunções na medula óssea, esta pode ser impedida de produzir eritrócitos a dois níveis: a nível das células estaminais hematopoiéticas (HSC) ou, num estado mais avançado do desenvolvimento das células hematopoiéticas. No primeiro caso, o doente tem risco aumentado de infecção e hemorragia que podem contribuir para o agravamento da anemia. A falha na produção de eritrócitos em estados mais avançados da eritropoiese afecta apenas a linhagem eritróide, e designa-se por aplasia das células vermelhas puras (PRCA: *pure red cell aplasia*). Normalmente resulta da destruição autoimune, por exposição a toxinas, vírus ou drogas, das HSC ou de progenitores específicos da linhagem. Neste caso os eritrócitos imaturos são incapazes de responder ao sinal da EPO porque são destruídos ou danificados. A falha na medula óssea pode também ter origens congénitas raras, ou resultar de mutações nas telomerasas que levam a um encurtamento anormal dos telómeros [57].

Deficiências de substrato ou alterações de enzima metabólicas nos eritrócitos são outra causa de anemia. O fornecimento inadequado dos substratos necessários à maturação dos eritrócitos leva a um contínuo estado de hipóxia, perda do feedback negativo para o rim e, consequentemente, estimulação contínua da produção de EPO numa tentativa de corrigir a hipóxia. Assim sendo, o tratamento com ESAs nestes casos não é eficaz, já que mesmo um elevado nível de EPO é incapaz de ultrapassar a falta de substratos necessária a uma eritropoiese eficaz. Estas anemias são tratadas com suplementos nutricionais [56].

A deficiência em ferro é um dos principais factores que contribuem para a anemia [58], assim como a falta de vitamina B12 ou folato na dieta, ou a sua deficiente absorção [59-60]. O ferro é obrigatório para a eritropoiese, sendo um componente essencial do grupo heme da hemoglobina e de muitas enzimas envolvidas na transferência de electrões no sistema redox da cadeia respiratória.

A hepcidina é um importante regulador do metabolismo do ferro [61]. Produzida pelos hepatócitos, a hepcidina liga-se à ferroportina existente nos macrófagos, na membrana basolateral dos enterócitos e nos hepatócitos, e induz a internalização e degradação da ferroportina. Ao diminuir o número efectivo de exportadores do ferro na membrana dos enterócitos e macrófagos, a hepcidina suprime a captação do ferro e a sua libertação, controlando assim a concentração de ferro disponível para a eritropoiese e para a proliferação bacteriana. A produção de hepcidina diminui na anemia e hipóxia e aumenta na presença de ferro e inflamação [7, 11].

Defeitos na síntese do grupo heme ou de uma globina resultam em situações de anemia, como acontece por exemplo na talassémia [62], anemia falciforme ou na anemia hemolítica.

Nestes casos os níveis de EPO plasmática são mais elevados do que o normal, e o tratamento com ESAs raramente se justifica [63].

4.2. Anemias relacionadas com baixos níveis de EPO

A anemia da doença crónica (ACD) é a segunda maior causa de anemia, depois da falta de ferro. Os doentes têm normalmente níveis normais ou mais elevados de ferritina, mas níveis mais baixos de eritropoietina circulante. Resulta da activação crónica ou aguda do sistema imune e ocorre em cerca de 75% dos doentes com cancros hematológicos ou tumores sólidos, infecções víricas, e doenças autoimunes [64]. As infecções, as células malignas e a desregulação autoimune activam o sistema imune e a produção de citocinas, principalmente, TNF- α , IL-1 e IL-6 [64]. As citocinas pró-inflamatórias inibem a produção de EPO levando à anemia. A presença de radicais livres de oxigénio ou azoto pode inibir também a eritropoiese ao danificar directamente as células progenitoras [65].

Uma forma de anemia da doença crónica muito comum é a anemia associada à insuficiência renal crónica (CRF) que está relacionada à quase completa deficiência de EPO devido à perda de tecido funcional no rim e consequente diminuição da função do órgão. Na presença de toxinas urémicas, a sobrevivência eritrocitária diminui e há inibição da eritropoiese a nível medular, o que também contribui para a anemia. A diálise reduz

os níveis de toxinas urémicas, o que favorece a resposta terapêutica aos ESAs. A transplantação renal permite restabelecer a função renal, no entanto nem sempre o rim transplantado é capaz de repor a produção de EPO. A administração de rHuEPO pode ser benéfica nestes doentes.

Estudos recentes sugerem que a presença do EPOR nas células do rim normal permite que a administração de rHuEPO tenha efeitos protectores da função renal, prevenindo o dano dos tecidos induzido pela isquemia nas doenças renais agudas e crónicas [66, 67].

4.3. Aplicação da rHuEPO no tratamento da Anemia

Em 1985, Egrie *et al.* isolaram e expressaram o gene da EPO humana. A EPO recombinante mostrou-se biologicamente activa tanto *in vitro* como *in vivo* e imunologicamente idêntica à hormona nativa. Ao administrarem a EPO recombinante a animais verificaram um aumento dramático no hematócrito.

A rHuEPO tem sido usada no tratamento da anemia da doença renal crónica desde 1986 [27], ao ser administrada em doentes sujeitos a hemodiálise regular. A concentração de hemoglobina aumentou para valores normais e a qualidade de vida destes doentes melhorou. Os resultados obtidos no tratamento da doença crónica renal levaram a que se estendesse o tratamento da anemia com rHuEPO também a doentes oncológicos.

O tratamento com rHuEPO veio reduzir drasticamente a necessidade de transfusões sanguíneas e a transmissão de doenças como a hepatite B e C [68].

No entanto, a correcção total da anemia pode desencadear alguns problemas vasculares, particularmente em doentes hipertensos [69].

Recentemente têm sido estudadas outras estratégias para o tratamento da anemia, como compostos oralmente activos e capazes de estimular a produção de EPO endógena [70]. Estes agentes incluem estabilizadores do HIF e inibidores do GATA, um factor de transcrição contendo dedo de zinco (*zinc finger-containing transcription factor*).

5. Eritropoietina no Cancro

Existem diversos mecanismos pelos quais a EPO pode influenciar positiva ou negativamente a progressão do tumor, incluindo efeitos directos na regulação do crescimento do tumor devido às suas propriedades anti-apoptóticas, modulação da hipóxia no tumor e impacto na angiogénese através da sua actividade pró-angiogénica, e ainda impacto negativo na eficiência da radio e quimioterapia [71].

Acção anti-apoptótica da EPO

A EPO pode estimular a sobrevivência das células tumorais através das suas propriedades anti-apoptóticas: inibição da actividade de caspases pró-apoptóticas e atenuação da morte celular em resposta ao stress oxidativo.

No cancro da mama, por exemplo, EPO e EPOR são induzidos por hipóxia e poderão contribuir para o aumento da taxa de sobrevivência das células tumorais, através de mecanismos anti-apoptóticos que envolvem a activação do STAT3 e inibição da saída do citocromo c da mitocôndria [72].

A acção anti-apoptótica é dependente da sinalização JAK2/IP3K. Esta via activa os factores Akt1, Akt2 e Akt3, uma família de proteínas cinases, que uma vez activados vão induzir a expressão de múltiplos genes com efeitos anti-apoptóticos. A activação da via PI3K/Akt responde ainda ao stress oxidativo ao regular a transcrição da heme-oxigenase-1 (HO-1), que está envolvida em actividades antioxidantes e anti-apoptóticas [73]. A activação do Akt pode também inibir o FOXO3a e inactivar o Bad [23]. O FOXO3a altera a permeabilidade da membrana mitocondrial e liberta citocromo c, um potente factor pró-apoptótico. A fosforilação do FOXO3a resulta na sua retenção no citoplasma e inibição da apoptose. O Akt pode também inactivar o Bad, um membro da família pró-apoptótica Bcl-2, que está ligado ao Bcl-xL através do seu domínio BH3. A fosforilação do Bad bloqueia a sua acção pró-apoptótica, ao libertar o Bcl-xL e permitir que este bloqueie a apoptose. O Bcl-2 e Bcl-xL previnem a translocação do Bax para a mitocôndria, matêm o potencial da membrana mitocondrial e previnem a libertação do citocromo c. A expressão do Bcl-2 e do Bcl-xL é dependente da EPO.

Hipóxia e papel do HIF na Angiogénese e progressão tumoral

Os tumores sólidos são caracterizados por regiões de hipóxia. A rápida proliferação das células tumorais e a formação de vasos estrutural e funcionalmente anormais impede a difusão adequada de oxigénio. Em casos extremos, a concentração de oxigénio é menor do que a necessária para a sobrevivência das células, resultando na morte celular e selecção das células cancerosas. Nas células tumorais as vias apoptóticas estão inactivas e as vias anti-apoptóticas ou as vias de invasão/metástase que promovem a evasão das células para a circulação estão activas [67]. Esta adaptação à hipóxia pode surgir de alterações na expressão dos genes, mutações no genoma ou ambas. Muitos dos genes alterados são regulados pelo HIF.

O HIF-1 α é sobre-expresso nas células tumorais [74] e esta sobre-expressão está associada, em muitos tipos de cancro, ao aumento da mortalidade dos doentes [75]. A principal razão é o facto do HIF regular a transcrição de genes importantes na patogénese do cancro: imortalização, manutenção da população de células estaminais, diferenciação celular, instabilidade genética, vascularização, reprogramação metabólica, invasão/metástase e resistência ao tratamento.

O HIF induz a transcrição de genes como o VEGF e angiopoetina-2 que estimulam a angiogénese e re-estabelecem a homeostasia nutricional e de oxigénio nos tumores [76]. O próprio gene VHL implicado na degradação do HIF-1 α é um supressor tumoral. Mutações que levam à sua perda de função bloqueiam a ubiquitinação e a degradação do HIF pelo proteossoma [74] e estão associadas com o carcinoma das células renais (RCC) e com a doença de von Hippel-Lindau. A angiogénese e tumorigénese estão assim ligadas através do HIF e dos genes que este regula.

Proteínas envolvidas na invasão/metástase, como a vimentina, fibronectina, queratinas, metaloproteinases de matriz, catepsina D e E-caderina são reguladas pelo HIF que, ao alterar a sua expressão pode promover a ruptura dos contactos célula-célula e da matrix extracelular-célula e a migração das células para o sistema sanguíneo e linfático na metástase.

5.1 A anemia no cancro

A anemia é um efeito lateral comum nos doentes oncológicos e é causada por factores relacionados com a própria doença e com os efeitos mielossuppressores e nefrotóxicos da quimio e radioterapia [29]. A sua prevalência varia com o tipo de tumor, o estadio e a terapia usada [77].

O impacto negativo dos sintomas da anemia como a fadiga e diminuição da qualidade de vida é substancial, para além de que a anemia pode comprometer a tolerância aos tratamentos, resultando na necessidade de reduzir a sua duração ou intensidade [77].

5.2. Efeitos da administração de rHuEPO nos doentes oncológicos

Inicialmente as transfusões de sangue eram a única opção para o tratamento da anemia [29]. Desde 1986 que a EPO humana recombinante tem sido usada no tratamento da anemia da doença renal crónica com sucesso [27], o que levou à avaliação da mesma terapia em doentes oncológicos anémicos. Os resultados do primeiro ensaio clínico em doentes oncológicos demonstraram que a rHuEPO é eficaz no tratamento da anemia em doentes oncológicos sujeitos a quimioterapia [78]. Três grandes ensaios clínicos confirmaram estes resultados [79-81] e levaram à aprovação da epoietina alfa para o tratamento da anemia relacionada com a quimioterapia [27].

5.2.1. Benefícios dos ESAs no tratamento de doentes oncológicos

Diminuição das Transfusões de Sangue

Seis ensaios clínicos usando epoietina alfa e um placebo, em doentes oncológicos anémicos, mostraram uma redução de cerca de 50% na necessidade de transfusões de sangue durante o segundo e terceiro mês de quimioterapia nos doentes tratados com epoietina alfa. Um ensaio com cerca de 314 doentes foi efectuado para estudar o efeito da darbepoietina alfa. Tal como a epoietina alfa, o tratamento com

darbepoietina mostrou também uma redução de cerca de 50% na necessidade de transfusões de sangue para diminuir a anemia [82].

Melhoria da qualidade de vida

Os sintomas da anemia incluem dispneia, fraqueza, taquicardia, depressão e fadiga, que diminuem a qualidade de vida do doente. O tratamento da anemia com ESAs aumenta os níveis de hemoglobina e, consequentemente, melhora a qualidade de vida dos doentes oncológicos e reduz a necessidade de transfusões.

Littlewood *et al.* estudou os efeitos da EPO recombinante usando um placebo como controlo e confirmou a relação entre a anemia, a fadiga e a qualidade de vida [83]. Vários ensaios clínicos têm mostrado que a epoietina alfa aumenta os níveis de Hb, diminui a necessidade de transfusões de sangue e melhora a qualidade de vida [79]. Estes efeitos ocorrem tanto em doentes com tumores sólidos como em tumores hematológicos. A melhoria da qualidade de vida mostrou ser independente da resposta do tumor à quimioterapia. Existe uma relação positiva entre os níveis de Hb e a qualidade de vida ao longo do tempo, sugerindo que a administração de epoietina alfa melhora a qualidade de vida ao aumentar os níveis de Hb [84].

Uma questão importante é a altura exacta de administração da rHuEPO. Estudos mostraram que a intervenção precoce com epoietina alfa pode prevenir ou melhorar os efeitos da anemia [27]. Os níveis de Hb subiram mais rapidamente e a qualidade de vida melhorou mais nos doentes com terapia precoce.

5.2.2. Riscos do uso de ESAs no tratamento de doentes oncológicos

Risco aumentado de trombose

Uma meta-análise [85] que incluiu 9353 doentes oncológicos em 57 ensaios clínicos randomizados controlados com placebo, usando epoetin alfa, epoetin beta, ou darbepoetin alfa mostraram que o tratamento ESAs aumenta o risco de tromboembolias (risco relativo de 1.67 (1.35-2.06), com intervalo de confiança de 95%). O risco aumentou proporcionalmente ao aumento da Hb.

Riscos de progressão do tumor associados ao uso de ESAs

Os efeitos biológicos da EPO sobre a angiogénese e a expressão e activação do seu receptor nas células cancerosas e no endotélio vascular têm levantado a questão dos efeitos dos ESAs sobre o crescimento do tumor e angiogénese [13].

Dois ensaios clínicos recentes mostraram efeitos adversos relacionados com a terapia com rHuEPO em doentes com cancro da mama metastático sob quimioterapia e doentes com cancro do pescoço e cabeça sob radioterapia. Em ambos verificou-se progressão da doença.

Sobrevivência dos doentes

A terapêutica com ESAs não parece influenciar a sobrevivência dos doentes. Quatro ensaios clínicos, o “Breast Cancer Erythropoietin Survival Trial” (BEST) e o ENHANCE em cancros da mama, o EPO-CAN 20 em cancro do pulmão “non-small-cell” e o Amgen 20010103 não mostraram vantagens na sobrevivência, mas outros ensaios clínicos também não mostram desvantagens na sobrevivência dos doentes tratados com ESAs [86]. Os resultados até ao momento são inconclusivos.

6. Produção Renal de Eritropoietina:

6.1. Fisiologia do rim

O rim é um órgão complexo cuja principal função é manter o balanço homeostático dos fluidos corporais. O rim regula a concentração de componentes do plasma como o sódio, potássio e hidrogénio, desempenhando um papel fundamental na regulação da pressão sanguínea e pH. Funciona também como sensor de oxigénio, regulando a eritropoiese.

Estrutura do rim

A unidade estrutural e funcional básica do rim é o nefrónio (Fig. 4).

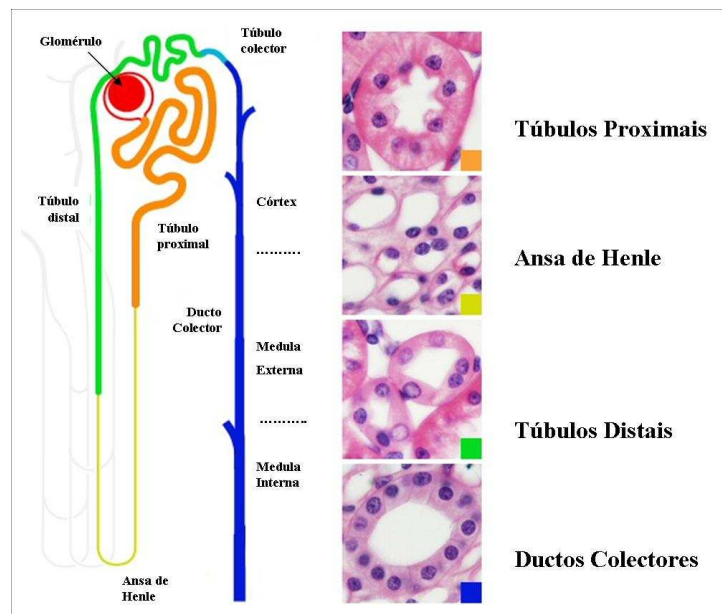


Figura 4 – Esquema simplificado do nefrónio e morfologia das células do túbulo renal.

Cada nefrónio é composto por um corpúsculo renal, o glomérulo, e um túbulo constituído por segmentos especializados:

Glomérulo – novelo de capilares especializado na filtração do sangue que chega da circulação renal através da arteríola aferente.

Túbulo Renal:

Túbulo proximal – pode ser dividido numa porção inicial contornada seguida da porção descendente recta. O filtrado glomerular que entra no túbulo proximal contornado é reabsorvido para os capilares peritubulares, incluindo sais, água e solutos orgânicos filtrados (glucose e aminoácidos).

Ansa de Henle – Túbulo composto por um ramo descendente e outro ascendente que se inicia no córtex desde o túbulo proximal de onde recebe o filtrado, desce para a medula, e retorna ao córtex para dar início ao túbulo distal. O seu papel é concentrar o conteúdo de sais no interstício. O ramo descendente é permeável à água mas completamente impermeável aos sais, o que contribui para concentrar o filtrado. À medida que o filtrado desce, a água sai para o interstício até equilibrar a tonicidade do filtrado e interstício. O ramo ascendente, pelo contrário, é impermeável à água. O sódio é bombeado activamente para o interstício gerando um filtrado hipotónico, que passa para o túbulo distal contornado.

Túbulo distal – É estrutural e funcionalmente diferente do túbulo proximal. As células contêm inúmeras mitocôndrias para gerar ATP suficiente para o transporte activo. O transporte de iões no túbulo distal é regulado essencialmente pelo sistema endócrino. Na presença da hormona da paratiróide, o túbulo distal reabsorve cálcio e excreta fosfato. Quando a aldosterona está presente é reabsorvido mais sódio e excretado mais potássio. O túbulo distal secreta também hidrogénio e amónio para regular o pH.

Ducto colector - O túbulo distal leva o seu filtrado para um sistema de ductos colectores. O primeiro é o túbulo colector cortical. À medida que a urina desce pelo túbulo, passa pelo interstício medular que tem uma concentração de sódio muito

elevada. O ducto colector, na presença da hormona antidiurética (ADH) (antidiuretic hormone) torna-se permeável à água, que é reabsorvida, determinando se a urina vai ser mais ou menos concentrada. Um aumento na ADH é um indicador de desidratação, enquanto que um aporte de água suficiente resulta em pouca ADH permitindo uma urina mais diluída.

O nefrónio contém ainda um conjunto de células especializadas localizado junto à zona de contacto entre o túbulo distal e a arteríola aferente, o **Aparelho Justaglomerular**. Este é constituído por 3 componentes: mácula densa, que contém células granulares de renina; células mesangiais extraglomerulares, junto às arteríolas; e células justaglomerulares, onde é sintetizada e secretada a renina, logo desempenham um papel fundamental na regulação do sistema renina-angiotensina.

Controlo da pressão sanguínea

Uma das funções importantes do rim é a regulação da pressão sanguínea. A pressão sanguínea é regulada essencialmente pelo sistema renina-angiotensina. Quando a pressão sanguínea diminui, a enzima proteolítica renina é secretada pelas células do aparelho justaglomerular (parte do túbulo distal), que são sensíveis à pressão. A renina actua sobre uma proteína do sangue, o angiotensinogénio, convertendo-o em angiotensina I. A angiotensina I é então convertida pela ACE (Angiotensin-converting enzyme) nos capilares dos pulmões em angiotensina II, que estimula a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal, que por sua vez afecta os túbulos renais. A aldosterona estimula o aumento da reabsorção do sódio pelos túbulos distais, o que leva a um aumento do volume de água que é reabsorvido pelo túbulo. Este aumento da reabsorção de água aumenta o volume de sangue que por sua vez aumenta a pressão sanguínea. O aparelho justaglomerular e os túbulos distais contribuem desta forma para a regulação do volume plasmático corporal e controlo da pressão sanguínea.

6.2. Controvérsia na Identificação das Células Renais Produtoras de EPO

Nos mamíferos, o rim é o órgão que, entre outras funções, funciona como sensor de oxigénio e este processo fisiológico está directamente relacionado com a produção de EPO. Quando a oxigenação sistémica é reduzida, tal como acontece por exemplo na doença cardíaca congénita ou doenças respiratórias, a expressão da EPO aumenta em resposta a pequenas alterações dos níveis de Hemoglobina. Sabe-se que a regulação da EPO ocorre ao nível do mRNA mas o controlo da expressão génica da EPO no rim está ainda por caracterizar por não existir ainda um sistema *in vitro* adequado [87].

A eritropoietina é produzida essencialmente pelo fígado no estado fetal e pelo rim no adulto [88, 89]. Desde que o rim foi reconhecido como a principal fonte de eritropoietina endócrina no adulto, o local exacto de produção da EPO renal tem sido um tópico de debate. Diversos estudos moleculares, de modelos animais de hipóxia, ou utilizando ratos transgénicos têm sugerido diferentes localizações para a produção de EPO renal.

Em 1962 Hirashima K *et al.* demonstraram em rins isquémicos a produção de EPO pelas células justaglomerulares [90]. As células justaglomerulares consistem em diversas células epiteliais junto ao hilo glomerular, e muito próximas da mácula densa. Estas células sintetizam, armazenam e secretam a enzima renina, pelo que desempenham um papel importante na regulação do sistema renina-angiotensina, conforme já referido.

Por outro lado, em 1972, Burlington H *et al.* demonstraram, em culturas celulares de glomérulos de cabra, a capacidade das células glomerulares produzirem epo durante períodos de 7 meses, e pensaram que esta descoberta seria uma oportunidade promissora para estudar a regulação da produção de EPO e a possibilidade de desenvolverem uma fonte de EPO em quantidades significativas [91].

Ainda noutros estudos, mais recentes, realizados com técnicas mais sensíveis, tem sido detectada a expressão de EPO em células tubulares [92, 93], células tubulares proximais [94-96] e células peritubulares intersticiais ou endoteliais do tipo fibroblástico [97-102].

A dificuldade em caracterizar as células produtoras de EPO e os mecanismos que controlam a sua produção é, em grande parte, devida ao facto de não ter sido possível ainda isolar uma linha celular renal produtora de EPO. As linhas celulares produtoras de EPO que existem são derivadas de células tumorais de hepatócitos humanos, como as Hep3B e HepG2 [103].

Apesar de não ter sido possível ainda caracterizar as células renais produtoras de EPO, os trabalhos que conduziram à identificação das células intersticiais peritubulares como o local de produção de EPO foram considerados os mais convincentes e, como tal, este tem sido o local assumido para a produção renal da EPO. No entanto, diversos estudos apontam para que as células produtoras de EPO funcionem como sensores de oxigénio [87, 104]. Esta hipótese está de acordo com o facto de uma redução da pressão parcial de oxigénio levar ao aumento da produção da EPO no rim. Admite-se que seja o túbulo distal e o aparelho justaglomerular as estruturas que melhor possam funcionar como sensores de oxigénio, uma vez que é nesses locais que é regulado o pH e o sistema renina-angiotensina envolvido no controlo da pressão sanguínea.

A identificação das células produtoras de EPO e do mecanismo exacto que regula a sua produção, particularmente no homem, em que não há praticamente resultados experimentais, constituem temas de debate ainda actuais e que justificam os trabalhos agora desenvolvidos.

II. OBJETIVO

Objectivo

As maiores linhas de investigação na área da produção renal de EPO têm sido desenvolvidas em modelos animais ou culturas celulares de hepatócitos. No caso dos modelos animais, estes são sujeitos a condições de hipóxia severa de forma a aumentar a expressão do gene da EPO facilitando a sua detecção.

Nos humanos, apesar da EPO ser amplamente utilizada na sua forma recombinante como terapia para anemia resultante de diversas causas, os estudos que se referem à sua fisiologia, nomeadamente expressão e identificação das células produtoras de EPO, são muito escassos.

Este trabalho teve como objectivo identificar as células produtoras de EPO no rim humano.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Biópsias Renais Humanas

O estudo foi realizado num total de 55 biópsias renais humanas do arquivo do departamento de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António (HGSA), fixadas em formol e embebidas em parafina. Foram seleccionadas 45 biópsias de doentes de Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF), com consentimento informado para o efeito.

Para estudar a expressão do gene da eritropoietina no rim humano em condições de normóxia foi essencial escolher as biópsias de acordo com certos parâmetros clínicos, nomeadamente ausência de anemia.

No programa de transplante renal praticado pelo HGSA, os enxertos renais de dadores cadavéricos com idade ≥ 55 anos são submetidos a análise histológica antes do transplante, de forma a avaliar se são apropriados ou não. Destas biópsias renais, 10 foram escolhidas ao acaso a partir de dadores aceitáveis, com função renal normal e sem doença infecciosa ou neoplásica. Todos os rins estudados foram transplantados com sucesso.

A razão pela qual o estudo foi maioritariamente efectuado em biópsias de rim de doentes PAF prende-se com a maior disponibilidade destas amostras e o conhecimento mais aprofundado dos parâmetros clínicos destes indivíduos relativamente aos dadores. Os doentes PAF são seguidos na Unidade Clínica de Paramiloidose, que funciona em parceria com o Centro de Estudos de Paramiloidose do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, local onde foi realizado o trabalho. A colaboração com a Unidade Clínica foi fundamental para o estudo na medida em que permitiu uma maior disponibilidade de amostras, um melhor acesso, e uma melhor uniformização das amostras de acordo com os parâmetros clínicos relevantes. A Paramiloidose ou Polineuropatia Amiloidótica Familiar tipo I é uma doença neurodegenerativa provocada pela variante amiloidogénica da transtirretina TTRV30M, com uma substituição de metionina por valina na posição 30 da TTR. É uma doença hereditária, de transmissão autossómica dominante, com uma grande prevalência em Portugal, especialmente na região da Póvoa de Varzim / Vila do Conde, sendo vulgarmente designada por doença dos pezinhos. A doença está associada à deposição extracelular de fibrilas de amiloide

no tecido conjuntivo a nível sistémico, com a excepção do cérebro e fígado, e afecta principalmente o Sistema Nervoso Periférico (SNP). A manifestação predominante é uma polineuropatia sensitiva, motora e autonómica, podendo existir também manifestações renais (proteinúria e/ou insuficiência renal), oculares, hematológicas e outras. O único tratamento eficaz para a doença é o transplante.

Desde o ano de 1995 a 2001, todos os doentes PAF considerados para transplante de fígado eram submetidos a biópsia renal. As 45 biópsias renais de doentes PAF foram escolhidas de acordo com ausência de anemia e deposição não significativa de substância amilóide no rim e função renal normal. Os doentes PAF tinham 38 ± 7 anos de idade (29 – 56 anos de idade), tinham, em média, 4.5 ± 2.1 anos (2 – 12 anos) de doença sintomática, e uma média de hemoglobina sérica de 13.2 ± 1.6 (10 – 16.2) g/dl.

Foi ainda utilizada uma biópsia de rim humano criopreservada, escolhida ao acaso, para a extracção do mRNA utilizado para a clonagem do gene da EPO.

2. Detecção da expressão do gene da EPO no rim humano por Hibridização *in situ*

A detecção da expressão do gene da EPO, por hibridização *in situ*, com sondas de RNA marcadas com DIG, envolveu uma série de passos intermédios com recurso a técnicas de Biologia Molecular. A primeira etapa consistiu na extracção do RNA das células renais e isolamento do mRNA, de forma a obter apenas o produto da expressão génica das células, síntese do cDNA por RT-PCR e amplificação de um fragmento específico do gene da EPO por PCR. Seguidamente o produto de PCR obtido foi inserido no vector plasmídico pCR-Blunt II-TOPO, posteriormente isolado, purificado e sequenciado. O vector pCR-Blunt II-TOPO tem na sua constituição os promotores das enzimas SP6 e T7 RNA polimerase, logo, depois de confirmada a sequência do produto inserido, procedeu-se à sua transcrição em RNA marcado com DIG, e este RNA foi usado como sonda para a hibridização *in situ*.

2.1. Isolamento do mRNA de rim

Para a amplificação de um fragmento do gene da EPO procedeu-se ao isolamento do mRNA do seu local de expressão, a partir de 50 mg de tecido renal humano criopreservado. A extracção do RNA total foi efectuada com Trizol e o isolamento do mRNA foi efectuado com o “Sistema de Isolamento de mRNA MessageMaker” (Life Thecnologies, GIBCO).

Extracção do RNA total

Resumidamente, uma amostra de 50 mg de tecido renal humano criopreservada foi homogeneizada com 1 mL de Trizol (Gibco), a mistura incubou 5 min à temperatura ambiente (t.a.) e foi centrifugada a 12.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos para remover o material insolúvel do homogeneizado (membranas extracelulares, polissacarídeos, e DNA de elevado peso molecular). O sobrenadante foi

transferido para novo tubo, adicionaram-se 0,2 mL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente durante 15 segundos; a mistura incubou durante 2-3 minutos à t.a. e foi centrifugada a 8.000 rpm durante 15 minutos.

Nota: no final da centrifugação formam-se 3 fases: uma fase orgânica mais densa de fenol-clorofórmio, de cor vermelha; uma interfase; e uma fase aquosa menos densa, onde se encontra dissolvido o RNA.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionou-se 10 µg de glicogénio RNase-free como transportador para a fase aquosa. O glicogénio permanece na fase aquosa e é co-precipitado com o RNA. Em concentrações até 4 mg/mL não inibe o PCR. O RNA foi precipitado com isopropanol, na proporção de 1:2 (0,5 mL isopropanol / 1 mL Trizol usado da homogeneização inicial). A mistura incubou amostra durante 10 minutos à temperatura ambiente e foi centrifugada a 8.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA foi lavado com 1 mL de etanol a 75%. Centrifugou-se a 7.000 rpm durante 5 minutos. Secou-se o pellet de RNA não totalmente (é importante não deixar o pellet de RNA secar totalmente pois diminui muito a sua solubilidade).

O pellet foi dissolvido em água RNase-free e incubou durante 10 min a 55-60°C para dissolver completamente.

Isolamento do mRNA a partir do RNA total de rim humano

O “Sistema de Isolamento de mRNA MessageMaker” (Life Technologies, GIBCO), utilizado para o isolamento do mRNA, baseia-se na interacção entre as caudas poli-A existentes nas moléculas de mRNA e as moléculas de Oligo(dT) presentes numa coluna de celulose. As moléculas de mRNA ficam assim retidas na coluna, enquanto que as restantes moléculas são removidas.

O procedimento foi efectuado segundo as instruções do fabricante. Resumidamente:

Diluiu-se o RNA isolado de rim com 1 mL de água estéril e dividiu-se por 4 tubos de 500 µL em alíquotas de 250 µL. Adicionou-se 0,1 volume de NaCl 5M a cada tubo, aqueceu-se a mistura a 65 °C durante 5 minutos. Adicionou-se 250 µL de Oligo(dT) a cada tubo, agitou-se e aqueceu-se a mistura a 37 °C por 10 minutos. Transferiu-se o conteúdo para uma coluna que reteve o mRNA. Procedeu-se às lavagens com Wash Buffer. Eluiu-se o 1 mL de água estéril pré-aquecida a 65 °C. Adicionou-se

0,1 volumes de Acetato de Amónio 7,5 M (50 µL / tubo) e 2 volumes de etanol absoluto a -20 °C (1 mL / tubo) e deixou-se a precipitar a -20 °C durante a noite. Centrifugou-se a 13.000 rpm durante 20 min. Lavou-se o pellet com 1 mL de etanol 70%, centrifugou-se a 8000 rpm por 5 minutos e desprezar o sobrenadante. Secou-se o pellet ao ar (não totalmente) e dissolveu-se o mRNA em 25 µL de água tratada com DEPC.

2.2. Síntese do cDNA e amplificação de fragmentos do gene da EPO

Partindo do mRNA das células do rim foi possível amplificar os fragmentos de gene pretendidos. Por RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) o mRNA deu origem, por complementaridade de bases e por acção da enzima Transcriptase Reversa, à primeira cadeia de cDNA.

O gene da EPO encontra-se esquematizado no Anexo 1. Com a ajuda do software de análise de primers OLIGO versão 5.0 desenharam-se os primers específicos para a amplificação de vários fragmentos (Anexo 1), os quais foram sintetizados por “Thermo Electron Corporation”. Através de uma reacção de PCR usando os primers escolhidos, e por acção da *Taq* DNA polimerase, obtiveram-se os produtos de PCR EPO, directamente a partir da primeira cadeia de cDNA.

Foram testadas várias combinações dos primers EPO forward e reverse, o que resultou em produtos de PCR de tamanhos diferentes. De todas as combinações testadas foi escolhida a combinação 596F/748R, epo596F: 5'-CTG GGA GCC CAG AAG GAA G-3' e epo748R: 5'-ACC TGG TCA TCT GTC CCC TGT C-3'. A escolha deste fragmento em particular em detrimento dos restantes teve como base as seguintes premissas: maior eficiência da reacção de PCR, o facto de resultar num fragmento mais pequeno, de 174 pares de bases (bp), incluído na região codificante (CDS) do gene da EPO entre os exões 4 e 5 (NCBI GeneID: 2056) e, principalmente o facto do primer forward ter sido desenhado de forma a que a sua extremidade 5' seja homóloga à extremidade 3' do exão 4 e a extremidade 3' seja homóloga à extremidade 5' do exão 5,

ou seja, o primer 596F pertence metade ao exão 4 e a outra metade ao exão 5, o que garante que seja apenas amplificado o cDNA.

Paralelamente à amplificação do gene da EPO foi amplificado também um fragmento do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) que funcionou como gene controlo positivo (Anexo 2). Os primers utilizados foram gapdh302F: 5'-TCT TCC AGG AGC GAG ATC-3' e gapdh822R: 5'-AAA AAC CTG CCA AAT ATG-3'. O primer forward, tal como acontece para a EPO, pertence metade ao exão 5 e a outra metade ao exão 5. O produto de PCR esperado é de 540 bp, incluído entre os exões 4 e 8 do gene da GAPDH.

As condições de amplificação estão esquematizadas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Condições de amplificação, relativamente à composição das misturas de PCR, dos fragmentos EPO 596F/748R e GAPDH 302F/822R

<i>Componente</i>	EPO		GAPDH	
	<i>Volume</i>	<i>Conc. F.</i>	<i>Volume</i>	<i>Conc. F.</i>
cDNA	2 µL		2 µL	
10 µM Primers	1 + 1 µL	0,2 µM	1 + 1 µL	0,2 µM
10x Buffer	5 µL	1x	5 µL	1x
50 mM MgCl ₂	1 µL	1 mM	2 µL	2 mM
10 mM dNTP's	1 µL	200 µM	1 µL	200 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase (5u/µL)	0,3 µL	1,5 U	0,3 µL	1,5 U
H ₂ O	38,7 µL		36,7 µL	
V _{final}	50 µL		50 µL	

Tabela 2 – Perfis de temperatura para a amplificação dos fragmentos EPO 596F/748R e GAPDH 302F/822R, por PCR.

* Nestes 10 ciclos foram acrescentados incrementos de -1°C em cada ciclo;

' – minutos; '' – segundos

	Ciclos	Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	tempo
EPO	1	94 $^{\circ}\text{C}$	2'
	10	94 $^{\circ}\text{C}$	45''
		54-44*	50''
		72 $^{\circ}\text{C}$	50''
	30	94 $^{\circ}\text{C}$	45''
GAPDH		54 $^{\circ}\text{C}$	50''
		72 $^{\circ}\text{C}$	50''
	1	72 $^{\circ}\text{C}$	7'
GAPDH	1	94 $^{\circ}\text{C}$	2'
	35	94 $^{\circ}\text{C}$	45''
		52 $^{\circ}\text{C}$	50''
		72 $^{\circ}\text{C}$	1'
	1	72 $^{\circ}\text{C}$	7'

A amplificação dos produtos de PCR foi confirmada por electroforese em gel de agarose 2% com coloração de brometo de etídio 1 $\mu\text{g/mL}$ e iluminação com lâmpada de UV.

As bandas com o peso molecular esperado foram cortadas, o DNA foi eluído do gel através do “High Pure PCR Products Purification Kit” (Roche) de acordo com as indicações do fabricante e procedeu-se à sequenciação dos fragmentos para confirmação da sua identidade.

2.3. Sequenciação dos produtos de PCR obtidos

Os produtos de PCR amplificados e eluídos do gel foram sequenciados de forma a confirmar a sua identidade, e a especificidade do PCR, antes da clonagem.

As reacções de sequenciação foram efectuadas segundo o kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems).

2.4. Clonagem dos produtos de PCR em vectores plasmídicos

A clonagem dos fragmentos do gene da EPO e GAPDH foi efectuada segundo o kit “Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit” (Invitrogen).

Obtenção dos produtos de PCR com extremidades coesivas

O vector de clonagem usado foi o plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO, o qual só insere fragmentos com extremidades não coesivas (blunt ends). A enzima *Taq* DNA polimerase usada na amplificação tem como característica a adição, em cada ciclo, de um nucleótido de adenina à extremidade 3' dos produtos de PCR após a extensão, o que resulta num produto com extremidades coesivas (sticky ends), ou seja, extremidades que formam uma pequena cadeia simples que pode ligar facilmente através da formação de pontes de hidrogénio por complementaridade de bases. Uma vez que o plasmídeo só insere fragmentos com “blunt ends” as bases de adenina inseridas nos produtos de PCR tiveram que ser removidas antes de se proceder à clonagem. Por conseguinte, efectuou-se uma reacção enzimática com a enzima *T4* DNA polimerase. Esta enzima de restrição tem acção exonuclease de 3'→5', logo, corta as bases de adenina não emparelhadas e cria produtos com extremidades “blunt” prontos para a clonagem.

Clonagem dos produtos de PCR

A clonagem de genes segundo o “Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit” funciona do seguinte modo: o vector é fornecido linearizado com a enzima DNA topoisomerase, do vírus *Vicinia*, covalentemente ligada à extremidade 3' de cada cadeia de DNA. Esta ligação, na presença do grupo 5'-hidroxilo do produto de PCR, é quebrada e leva,

subsequentemente, à libertação da topoisomerase e à ligação do produto de PCR à molécula de DNA plasmídico.

Por electroporação transformaram-se as células electrocompetentes com o plasmídeo recombinante. A inserção do fragmento provoca a ruptura, e consequente inactivação, de um gene letal da *E. coli*, o gene *ccdB*, o que permite uma selecção directa dos transformantes. Os transformantes foram seleccionados por crescimento em meio LB com o antibiótico Zeocina.

O isolamento do DNA plasmídico foi efectuado com o kit “FastPlasmid Mini” (Eppendorf), de acordo com as instruções do fabricante.

A análise dos transformantes passou pelo isolamento dos respectivos plasmídeos, pelo seu corte com a enzima de restrição *EcoRI* e pela amplificação do fragmento com os primers M13 (-20) Forward e M13 Reverse. A amplificação com os primers M13 serviu também para aumentar a quantidade do substrato para a síntese das sondas. As condições de amplificação com os primers M13 estão esquematizadas nas tabelas 3 e 4. A enzima de restrição *EcoRI* corta o DNA 11 bases antes e 7 bases depois do local de inserção do fragmento, logo, quando o fragmento é inserido obtém-se uma banda com o peso molecular correspondente ao peso do fragmento mais 18 pares de bases. A amplificação com os primers M13 resulta num produto de PCR com o peso molecular do fragmento inserido mais 243 bp. A electroforese em gel de agarose permitiu confirmar a presença dos produtos de PCR, por comparação com o DNA de peso molecular padrão.

Tabela 3 – Condições de amplificação, relativamente à composição da mistura de PCR, dos fragmentos inseridos no vector pCR-Blunt II-TOPO, com os primers M13F e M13R

<i>Componente</i>	<i>Volume</i>	<i>Conc. f</i>
DNA	2 µL	
10 µM Primers	1 + 1 µL	0,2 µM
10x Buffer	5 µL	1x
25 mM MgCl ₂	6 µL	1 mM
dNTP's	1 µL	200 µM
Taq DNA polimerase	0,4 µL	
H ₂ O	33,6 µL	
V _{final}	50 µL	

Tabela 4 – Perfis de temperatura para a amplificação, por PCR, dos fragmentos inseridos no vector pCR-Blunt II-TOPO, com os primers M13F e M13R

* Nestes 10 ciclos foram acrescentados incrementos de -1°C em cada ciclo;

' – minutos; '' – segundos

Ciclos	Temperatura/ $^{\circ}\text{C}$	tempo
1	94 $^{\circ}\text{C}$	2'
10	94 $^{\circ}\text{C}$	45''
	65-55*	1'
	72 $^{\circ}\text{C}$	1,5'
30	94 $^{\circ}\text{C}$	45''
	55 $^{\circ}\text{C}$	1'
	72 $^{\circ}\text{C}$	1,5'
1	72 $^{\circ}\text{C}$	7'

2.5. Sequenciação dos clones obtidos

Os clones cuja análise electroforética revelou a existência dos fragmentos com o peso molecular correcto foram sequenciados. A sequenciação teve o intuito de, por um lado, confirmar a identidade dos fragmentos clonados e, por outro, verificar a orientação em que os respectivos fragmentos foram inseridos no plasmídeo. As reacções de sequenciação foram efectuadas segundo o kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems).

2.6. Síntese das sondas de RNA

Para a detecção das células que expressam o gene da EPO foram usadas sondas de RNA marcadas com digoxigenina (DIG).

Utilizando como substrato os clones da EPO obtidos, a síntese das sondas resultou da transcrição *in vitro* do DNA por acção da SP6 ou T7 RNA polimerase dependendo da orientação do produto inserido e do tipo de sonda pretendida (sense ou antisense). Para aumentar a quantidade de substrato e aumentar a especificidade das sondas foi feita uma amplificação por PCR do produto inserido com os primers M13. As condições de amplificação estão esquematizadas em 2.2.4. nas tabelas 3 e 4. Os produtos de PCR obtidos foram analisados num gel de agarose a 2% e as respectivas bandas foram cortadas e o DNA foi extraído e purificado. Estes produtos de PCR foram os substratos utilizados para a síntese das sondas, e não o clone completo. Para a reacção de síntese das sondas utilizou-se o “DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)” (Roche).

As sondas sintetizadas são sondas de RNA de cadeia simples, com tamanho definido, e marcadas com DIG. Os nucleótidos de DIG-UTP foram usados como substrato e incorporados no transcripto (um DIG-UTP em cada 20-25 nucleótidos).

Após cada reacção de síntese verificou-se sempre a qualidade e quantidade das sondas através de electroforese em gel de agarose a 2%. Paralelamente efectuou-se também uma quantificação aproximada das sondas em membrana de nitrocelulose, por comparação com um RNA padrão marcado com DIG. Resumidamente: cortou-se uma tira de membrana Hybond-NX consoante o número de amostras; aplicou-se 1µL de amostra e 1µL (100 ng) de RNA-DIG controlo (Roche); incubou durante 2h a 80°C para fixar as amostras. Mergulhou-se a tira em 5% BSA/PBS durante 15 min para bloquear; seguidamente mergulhou-se a tira no anticorpo monoclonal “anti-digoxigenin-Alkaline Phosphatase (AP)” (Roche) diluído 1:500 em 1%BSA/PBS durante 30 min. Lavou-se com PBS e efectuou-se a revelação, no escuro, com BCIP/NBT (Sigma Fast 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Tablets, Sigma) durante 30 min a 1h. Parou-se a reacção com água.

2.7. Hibridização *in situ*

As técnicas de hibridização *in situ* (ISH) permitem detectar sequências específicas de ácidos nucléicos, ou proteínas, em células preservadas morfológicamente. Usando uma molécula repórter adequada, a técnica permite localizar a expressão génica a nível histológico. O princípio da técnica de ISH é o emparelhamento específico entre uma determinada sonda e as sequências complementares dos ácidos nucléicos alvo, numa amostra fixada, seguida pela detecção e visualização dos híbridos por métodos imunohistoquímicos.

As sondas usadas na ISH podem ser de três tipos: DNA, RNA e oligonucleótidos. No presente trabalho foram usadas sondas de RNA. Para a detecção de transcritos de mRNA as sondas de RNA são as mais sensíveis devido à elevada estabilidade térmica dos híbridos RNA-RNA. A marcação das sondas foi feita com digoxigenina. Sendo a DIG um hapteno de plantas e não de animais, a sua detecção é específica para os híbridos, não sendo detectadas reacções inespecíficas nas células.

As condições de hibridização são variáveis consoante o tipo de tecido, o tratamento do tecido e, principalmente, as características da sonda e do gene em estudo. Com o objectivo de melhorar a detecção da expressão dos genes em estudo, houve vários parâmetros que foram estudados: concentração óptima da sonda, o tampão de hibridização, a temperatura de hibridização, a adstringência das lavagens e o protocolo de detecção.

O protocolo base de hibridização utilizado foi estabelecido durante um estágio realizado no laboratório do Professor Sebastian Bachmann, do Instituto de Anatomia Vegetativa do Charité, Universidade de Berlim, Alemanha. O protocolo aplicado no estudo foi optimizado e as condições de hibridização foram adaptadas ao tipo de tecido e às características específicas das sondas.

Resumidamente:

Cortes de parafina de rim humano de 4 µm foram desparafinados com xilol, re-hidratados com etanol a 100%, 95%, 80% e 70% e pós-fixados em 4% de Paraformaldeído em PBS. Os tecidos foram permeabilizados por incubação com 0,2 M HCl durante 20 min e 10 µg/mL Proteinase K / PBS durante 30 min, e seguidamente, foram desidratados e secos e incubaram em tampão de pré-hibridização (2x SSC, 50%

formamida desionizada, 10% dextran sulfato, 100 µg/mL tRNA e 1x Denhard't Solution) durante 2 h a 45°C. As sondas de RNA marcadas com DIG foram aplicadas aos tecidos a uma concentração de 400-600 pg/µL e incubaram numa câmara húmida durante 18-20 h a 45°C. As lavagens de pós-hibridização foram feitas com uma solução de 2xSSC e 25% formamida durante 1 h a 46°C, seguida de 3 lavagens de 30 min com 2xSSC a 46°C, uma lavagem de 30 min com 2xSSC à t.a. e duas lavagens de 15 min com 1xSSC à t.a. O blocking foi feito com 5% BSA/PBS, seguindo-se a incubação com o anticorpo monoclonal “anti-digoxigenin-Alkaline Phosphatase (AP)” (Roche) diluído 1:500 numa solução de 1% BSA/PBS. A detecção foi efectuada por incubação de 1 a 4 horas à t.a. numa solução de BCIP/NBT (Sigma Fast 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Tablets, Sigma). O anticorpo anti-DIG-AP liga-se especificamente à digoxigenina das sondas. Este anticorpo tem acoplada uma fosfatase alcalina, que vai catalisar a conversão do substrato cromogénico BCIP/NBT num precipitado azul através de uma reacção de desfosforilação do BCIP e redução do NBT. Nas células onde se forma o precipitado significa que há expressão dos respectivos genes em estudo. Depois de contrastados com vermelho nuclear, os tecidos foram desidratados e as lâminas foram montadas com Entellan.

Nota: ao longo de toda a experiência foram sempre usadas soluções previamente tratadas com DEPC ou preparadas com água tratada com DEPC, e o material de vidro foi lavado com uma solução de 10% SDS (sodium dodecil sulphate) e esterelizado durante 3 horas a 195°C para destruir as RNases.

3. Microdissecção a Laser

A microdissecção a laser (LCM) é uma técnica pela qual células individuais podem ser capturadas de secções de tecido enquanto são visualizadas ao microscópio, e recolhidas por adesão a um filme ou tubo adesivo por acção de um raio laser. As células capturadas podem fornecer DNA, RNA, e proteínas para o estudo das suas características genómicas, expressão de genes espectro proteico dos tipos celulares individuais.

Duas biópsias de rim, uma de um dador e outra de um doente PAF, que marcaram positivamente para a expressão da Epo, foram escolhidas para LCM.

Para identificar e isolar apenas as células que expressam EPO, foram efectuados cortes seriados de cada biópsia e submetidos a LCM e ISH. Para LCM foram feitos cortes de 4 µm de espessura das biópsias de rim humano, desparafinados, re-hidratados, corados com hematoxilina-eosina (H&E), e novamente desidratados. A microdissecção a laser foi realizada num microdissector PALM (PALM Microlaser GmbH, Bernried, Germany) com sistema de catapultagem por pressão (LMPC). A identificação das células produtoras de EPO foi feita por visualização directa no microscópio de LMC das lâminas coradas por H&E simultaneamente com o respectivo corte seriado submetido a ISH. As células isoladas por LCM foram células tubulares e glomérulos com marcação positiva para a EPO.

3.1. Isolamento e amplificação do RNA

O RNA das células capturadas por microdissecção foi isolado pelo kit “RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation, Optimized for FFPE Samples” (Ambion) e amplificado por um método de amplificação de RNA baseado na T7 RNA polimerase. O protocolo de amplificação foi adaptado de Moll *et al.* [105] e Nakazono *et. al.* [106] e

usou um primer oligo(dT) contendo o promotor da T7 RNA polymerase. Neste trabalho foram testados dois primers oligo(dT) diferentes:

MluT7dTV2- GGA GGC CGG AGA ATT G TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CGC GTG T₂₀V e EcoOT7dTV1- GGA AGG AAG GAA GAG ATA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CCT GGT₁₈V.

Para o primeiro ciclo de amplificação, 10 µL de RNA total incubaram com 1 µL do primer oligo(dT) durante 10 min a 65°C e seguidamente durante 5 min à temperatura ambiente. A esta mistura foram adicionados: 4 µL de 5x Buffer, 2 µL de 0,1 M DTT, 1 µL de 10 mM dNTP's, 1 µL de Rnase Inhibitor (40 u/µL; Roche Diagnostics), 0,25 µL de T4 gene 32 protein (5 µg/µL; New England Biolabs), e 1 µL de SuperScript III Reverse Transcriptase (200 u/µL, Invitrogen). A mistura incubou durante 45 min a 42°C e depois adicionou-se 1 µL de RnaseH (2 u/µL, Invitrogen), e incubou 20 min a 37°C. O cDNA foi purificado por precipitação com 2 volumes de etanol absoluto, seco na totalidade e ressuspendido em 8 µL de água.

A partir da 1ª cadeia de cDNA foi realizada a transcrição *in vitro*: 8 µL de cDNA foram adicionados a 2 µL de 10x Transcription Buffer, 2 µL de cada 75mM rNTPs e 2 µL de T7 RNA Polymerase (20 u/µL, Promega), para um volume final de 14 µL. Após 5 h de incubação a 37°C, foi adicionado 1 µL de RNase-free DNase I (2 U/ µL, Invitrogen) e a mistura incubou durante 15 min a 37°C. O RNA sintetizado foi precipitado com etanol, seco e dissolvido em 10 µL de água.

Para o segundo ciclo de amplificação, 10 µL de RNA amplificado incubaram com 1 µL de Random Hexamers (1µg/µL) durante 10 min a 70°C, 5 min em gelo, e 10 min à temperatura ambiente. A esta mistura adicionaram-se: 4 µL de 5x 1st Strand Reaction Buffer, 2 µL de 0,1 M DTT, 1 µL de 10 mM dNTPs, 0,5 µL de RNaseIn (40 U/µL), 0,5 µL de T4 gene 32 protein (5 µg/µL) e 1 µL of SuperScript III (200 U/µL) para um volume final de 20 µL. Após 1 h de incubação a 37°C, adicionou-se 1 µL de RNase H (5U/µL) e incubou durante 30 min a 37°C, 2 min a 95°C e 5 min em gelo. O cDNA foi purificado por precipitação com etanol, foi seco e dissolvido em 20 µL de água.

3.2. Avaliação da expressão génica da EPO por qRT-PCR

A reacção de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) é o método de quantificação mais sensível para a detecção de mRNA pouco abundante, normalmente obtido a partir de amostras limitadas de tecido. A utilização de uma sonda marcada com um fluoróforo permite monitorizar a reacção de amplificação em tempo real. No presente trabalho foram usados “molecular beacons” (MB) marcados com fluorosceína (FAM), para a quantificação do gene da EPO.

Os “molecular beacons” são sondas de DNA que operam segundo o princípio do emparelhamento de bases de DNA. São moléculas de DNA sintéticas com conformação em ansa. A sequência da região circular (15-30 bases) é complementar ao DNA alvo, enquanto que a haste é uma sequência de 5-7 bases complementares entre si, de tal forma que antes da ligação ao DNA alvo a estrutura permanece fechada. Numa das extremidades é ligado um marcador fluorescente e na outra está ligado um “quencher”, que consiste num cromóforo não-fluorescente que dissipa na forma de calor a energia que recebe do fluoróforo. Em solução, os beacons livres adoptam uma estrutura em ansa na qual os braços da haste estão ligados por complementaridade, resultando no quenching eficiente do fluoróforo. Quando, na temperatura de anealing, os molecular beacons encontram a sequência complementar alvo de cDNA, eles sofrem uma transição conformacional que força a haste a afastar-se e resulta na formação de um híbrido sonda/alvo que é maior e mais estável do que a haste. Isto faz separar o fluoróforo e o quencher, restituindo a fluorescência, a qual é detectada pelo sensor. Apenas o híbrido emite fluorescência uma vez que qualquer molecular beacon livre permanece “fechado” e não-fluorescente. Se a sequência de DNA alvo não emparelha exactamente com o molecular beacon, a hibridização e fluorescência não ocorrem. Isto é devido ao facto de as propriedades termodinâmicas do molecular beacon favorecerem a formação de uma forma em hairpin em vez de a hibridização com uma sequência que não emparelha totalmente. Esta característica impede que sejam quantificados produtos inespecíficos.

O ensaio descrito usa um MB para a detecção sensível da expressão do gene da EPO humana por amplificação em tempo real de um fragmento específico de 174 bp incluído na região codificante (CDS) do gene da EPO, entre os exões 4 e 5. Os primers usados para amplificação do fragmento da Epo foram os mesmos que para a preparação das sondas RNA-DIG (epo596F e epo748R) e a sequência do MB foi 5'-FAM-ACG GGA AGC TGC TCC ACT CCG AAC TCC CGT-BHQ-1-3' (ver anexo 1). A reacção de PCR em tempo real foi efectuada num termociclador Rotor-Gene 6000, Corbett, usando o Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) da seguinte forma: a mistura de reacção consistiu em 10 µL de 2x Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 2,5 µL de 1mg/mL BSA, 0,6 µL de 50 mM MgCl₂, 1 µL de 4 µM Primer EPO.1-F, 2 µL de 4 µM Primer EPO.1-R, 1 µL de 4 µM da sonda EPO-MB.1 e 0,9 µL de H₂O. Finalmente, 2 µL do cDNA foram adicionados a cada tubo. Como controlos positivos foram usadas diluições sucessivas do vector contendo o fragmento da EPO, e o número de cópias por reacção foi: 6.000, 30.000, 60.000, 3x10⁵, 6x10⁵ e 3x10⁶ cópias. As amostras testadas foram o cDNA de túbulos e glomérulos amplificados com os primers MluT7dTV2 e EcoOT7dTV1.

O perfil térmico de amplificação incluiu 2 min a 50°C (reacção UDG) e 2 min a 95°C (activação da polimerase), seguido de 60 ciclos de PCR: 15 s a 94°C, 30 s a 56°C, e 30 s a 72°C, sucessivamente. A fluorescência foi medida como um único ponto no final do passo de hibridização (30 s a 56°C).

4. Imunohistoquímica

De forma a identificar as células produtoras de EPO procedeu-se a Imunohistoquímica para reconhecer os diferentes segmentos do túbulo renal. Os túbulos proximais foram identificados por marcação com o anticorpo monoclonal de rato “anti-human Renal Cell Carcinoma monoclonal antibody” (anti-RCC, Chemicon International) diluído 1:100, os túbulos distais e colectores corticais foram identificados com o anticorpo policlonal de coelho “anti-human-Calbindin-D-28K” (Thermo Scientific) diluído 1:500, e a Ansa de Henle foi identificada com o anticorpo monoclonal “anti-human Tamm-Horsfall protein” (Cedarlane) diluído 1:100. Foram efectuados cortes de rim humano em parafina com 4 µm de espessura. Foi necessário proceder à recuperação do antígeno com tampão Citrato. Após bloquear com 5% BSA em PBS (pH 7.4) durante 30 min à temperatura ambiente, os tecidos foram incubados com o anticorpo primário por 2 h, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado com HRP. A marcação foi feita usando um sistema avidina-biotina, DakoCytomation LSAB2 System-HRP (DakoCytomation), de acordo com as instruções do fabricante. O DAB (3,3'-Diaminobenzidine) foi usado como cromogénio.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados e discussão

Obtenção dos clones EPO e GAPDH

Por extracção do RNA total das células do rim e o isolamento do mRNA a partir do RNA total obteve-se o produto de expressão génica destas células. Com o mRNA de rim sintetizou-se o cDNA por RT-PCR, a partir do qual foi possível amplificar os fragmentos do gene da EPO e da GAPDH pretendidos (Fig. 5).

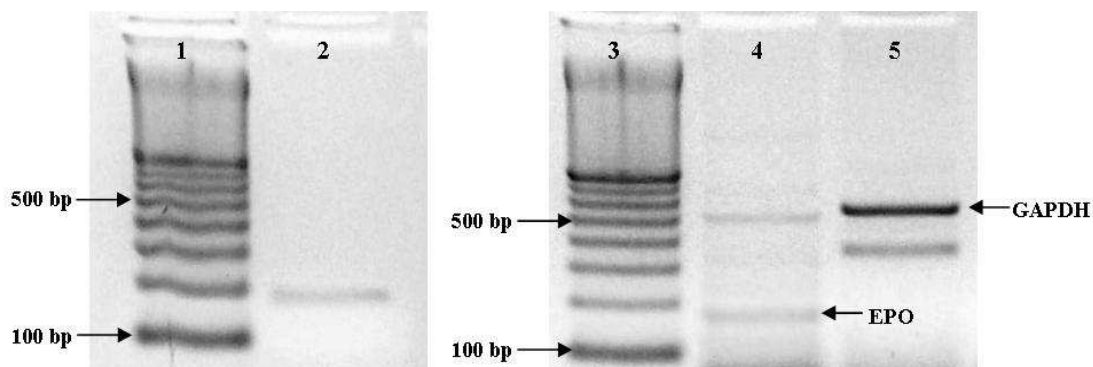


Figura 5 – Electroforese em gel de agarose 2%, com coloração de brometo de etídio 1 μ g/mL e iluminação com lâmpada de UV.

1- padrão de pesos moleculares (pM) de 100 bp; 2- produto de PCR EPO 596F/748R (174 bp); 3- padrão de pesos moleculares (pM) de 100 bp; 4- produto de PCR EPO 596F/748R (174 bp); 5- produto de PCR GAPDH 302F/822R (540 bp).

Os produtos de PCR obtidos foram clonados no vector pCR-Blunt II-TOPO. A inserção do fragmento correcto foi verificada por corte do plasmídeo com a enzima de restrição *EcoRI* e por amplificação do fragmento com os primers M13F (-20) e M13R. A enzima *EcoRI* corta o DNA 11 bases antes e 7 bases depois do local de inserção do fragmento, logo, quando um fragmento é inserido obtém-se uma banda com o peso molecular correspondente ao peso do fragmento mais 18 pares de bases (Fig. 6). A amplificação com os primers M13 resulta num produto de PCR com o peso molecular do fragmento inserido mais 245 bp. A electroforese em gel de agarose permitiu

confirmar a presença dos produtos de PCR com os pesos moleculares esperados, por comparação com o DNA de peso molecular padrão Fig. 7).

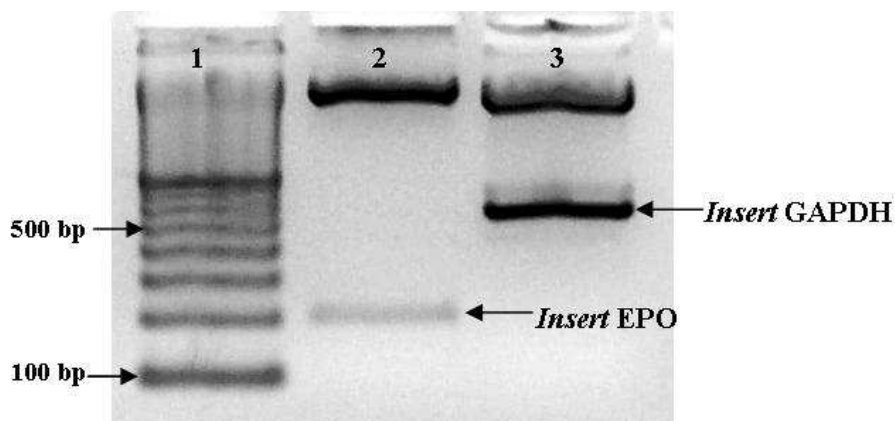


Figura 6 – Corte dos vetores pCR-Blunt II-TOPO, com a enzima de restrição *EcoRI*, após clonagem da EPO e GAPDH para verificação da inserção dos respectivos fragmentos.

1- padrão de pM de 100 bp; 2- verificação da clonagem do fragmento EPO 596F/748R (fragmento de 192 bp) ; 3- verificação da clonagem do fragmento GAPDH 302F/822R (fragmento de 558 bp).

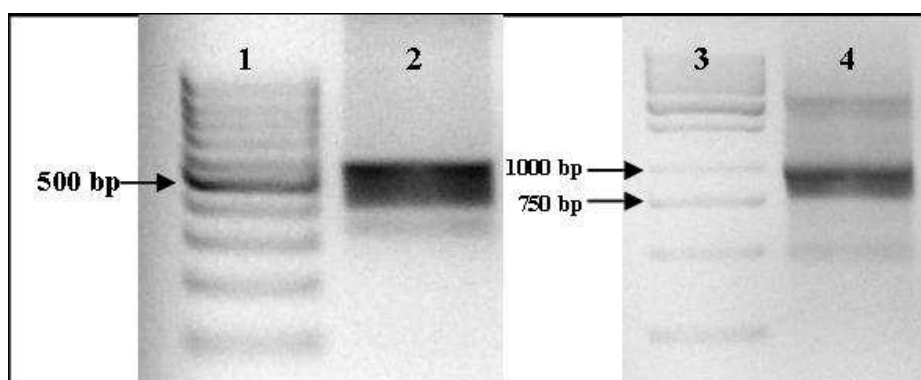
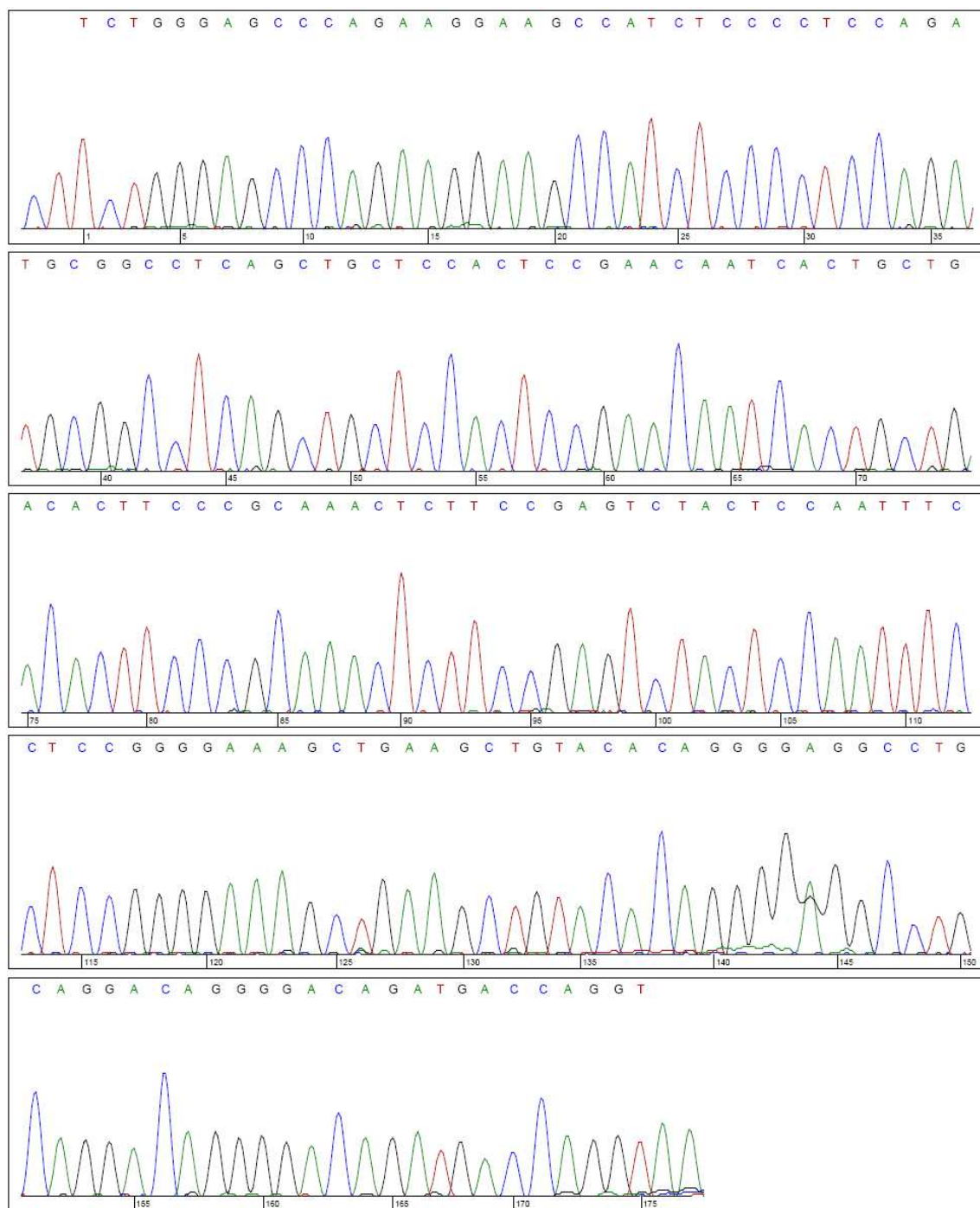


Figura 7 – Amplificação do “insert” EPO e GAPDH no vector pCR-Blunt II-TOPO com os primers M13F (-20) e M13R.

1- 1,5 µg de padrão de pM de DNA de 100 bp (GeneRuler, Fermentas); 2- Amplificação do “insert” EPO596F/748R, com pM esperado de 419 bp; 3- 0,5 µg de padrão de pM de DNA de 1 kbp; 4- Amplificação do “insert” GAPDH302F/822R, com pM esperado de 785 bp

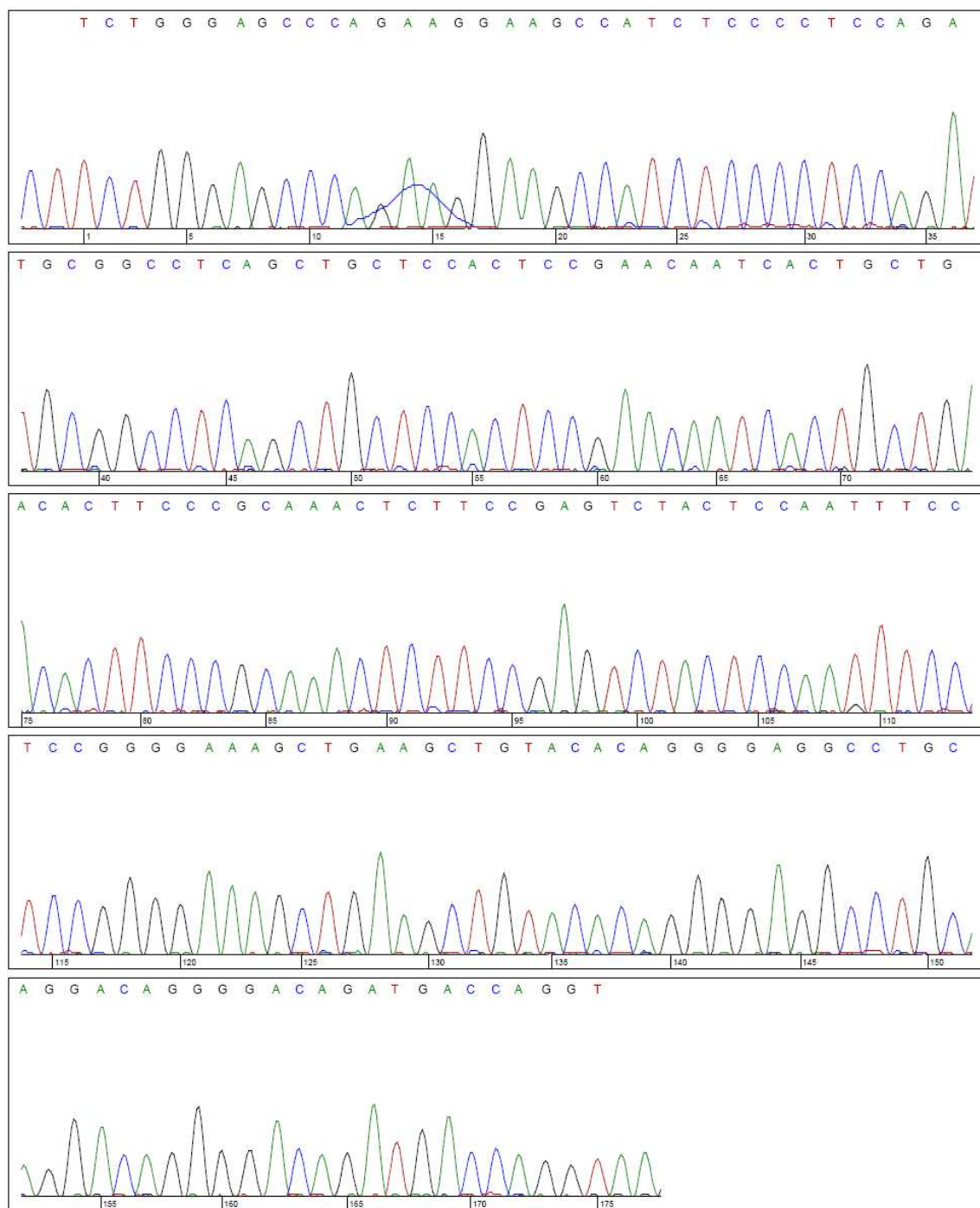
Sequenciação dos clones obtidos

Embora a análise electroforética seja indicativa da presença do clone de interesse, é imprescindível a sequenciação do produto clonado: por um lado, para confirmar que se trata do clone correcto e, por outro, para verificar a orientação em que o fragmento foi inserido no plasmídeo. A orientação é importante uma vez que vai determinar a síntese da sonda sense ou antisense. Com a ajuda do software “Chromas, versão 1.56 e efectuando uma análise, com base nos cromatogramas obtido (Fig. 8 e 9), de alinhamento das sequências obtidas com as disponíveis nas bases de dados (Sanger Institute, Ensembl, BLAST/SSAHA e NCBI Nucleotide BLAST), foi possível verificar a identidade dos clones obtidos (Fig. 10 e 11). A análise dos resultados da sequenciação, por comparação com a base de dados do “NCBI human genome database” [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>], mostra que a sequência de 174 bp incluída na região CDS do gene da EPO entre os exões 4 e 5, tem um alinhamento único de 99% com a sequência de mRNA da EPO, o que minimiza a possibilidade de falsos positivos devidos a alinhamentos inespecíficos com outros genes.



Ridom TraceEdit 1.1, Ridom GmbH, www.ridom.de

Figura 8- Resultado da sequenciação do vector EPO com o primer M13F (está representada a cadeia complementar reversa).



Ridom TraceEdit 1.1, Ridom GmbH, www.ridom.de

Figura 9 - Resultado da sequenciação do vector EPO com o primer M13R

```

>  ref|NM\_000799.2|  Homo sapiens erythropoietin (EPO), mRNA
Length=1340

GENE ID: 2056 EPO | erythropoietin [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)

Score = 318 bits (172), Expect = 2e-84
Identities = 174/175 (99%), Gaps = 0/175 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 85 ACCTGGTCATCTGTCCCTGTCTGCAGGCCTCCCCTGTGTACAGCTTCAGCTTTCCCCG 144
      |||
Sbjct 769 ACCTGGTCATCTGTCCCTGTCTGCAGGCCTCCCCTGTGTACAGCTTCAGCTTTCCCCG 710

Query 145 GAGGAAATTGGAGTAGACTCGGAAGAGTTTGCGGGAAGTGTACAGAGTATTGTTTCGGAG 204
      |||
Sbjct 709 GAGGAAATTGGAGTAGACTCGGAAGAGTTTGCGGGAAGTGTACAGAGTATTGTTTCGGAG 650

Query 205 TGGAGCAGCTGAGGCCGCATCTGGAGGGGAGATGGCTTCCTTCTGGGCTCCCAGA 259
      |||
Sbjct 649 TGGAGCAGCTGAGGCCGCATCTGGAGGGGAGATGGCTTCCTTCTGGGCTCCCAGA 595

```

Figura 10 - Alinhamento do resultado da sequenciação com o primer M13F com a base de dados do NCBI:

```

>  ref|NM\_000799.2|  Homo sapiens erythropoietin (EPO), mRNA
Length=1340

GENE ID: 2056 EPO | erythropoietin [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)

Score = 318 bits (172), Expect = 2e-84
Identities = 174/175 (99%), Gaps = 0/175 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 3 TCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCG 62
      |||
Sbjct 595 TCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCG 654

Query 63 AACAACTCACTGCTGACACTTCCCGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGG 122
      |||
Sbjct 655 AACAACTCACTGCTGACACTTCCCGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGG 714

Query 123 AAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGT 177
      |||
Sbjct 715 AAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGT 769

```

Figura 11 - Alinhamento do resultado da sequenciação com o primer M13R com a base de dados do NCBI:

Síntese das sondas de RNA

Após obtenção dos clones EPO e GAPDH foi possível proceder à síntese das sondas de RNA marcadas com DIG. Como substrato para a síntese das sondas foram usados os produtos de PCR obtidos por amplificação com os primers M13 (Fig. 7).

Como forma de verificar a qualidade e quantidade de sonda produzida procedeu-se a uma electroforese em gel de agarose (Fig. 12). Após revelação obtiveram-se bandas bem definidas, sem qualquer vestígio de degradação. Através da hibridização em membrana de nitrocelulose, a quantificação foi efectuada de uma forma aproximada por comparação das sondas com um padrão de RNA marcado com DIG (Roche) (Fig. 13).

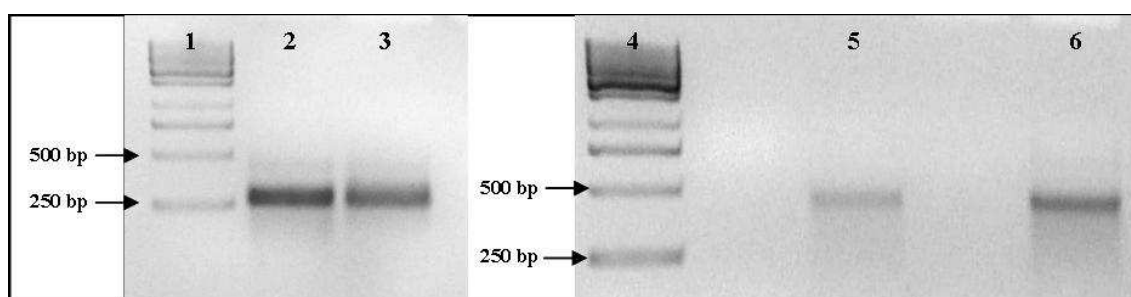


Figura 12 – Electroforese em gel de agarose 2% das sondas de RNA marcadas com DIG
1- 0,5 µg de padrão de pM DNA 1 kbp; 2- Sonda EPO antisense; 3- Sonda EPO sense;
4- 0,5 µg de padrão de pM DNA 1 kbp; 5- Sonda GAPDH sense; 6- Sonda GAPDH antisense.

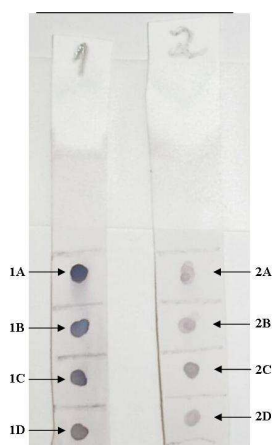


Figura 13 – Quantificação das sondas de RNA, em membrana de nitrocelulose.

Linha 1 – padrão de RNA marcado com DIG: 1A-100ng; 1B-50ng; 1C-25ng; 1D-12ng;
2A – EPO antisense; 2B – EPO sense; 2C – GAPDH antisense; 2D – GAPDH sense

Hibridização *in situ*

As condições de hibridização estudadas foram baseadas, principalmente, nas recomendações do Prof. Sebastian Bachmann (Charité, Berlim). Após algumas experiências de optimização em que foram ajustados vários parâmetros, desde a temperatura de hibridização, a composição do tampão de hibridização, a composição do tampão de lavagem, a temperatura e duração das lavagens, e até mesmo o tamanho da sonda, foi possível estabelecer o protocolo de hibridização adequado ao estudo da expressão do gene da EPO. O gene da GAPDH foi utilizado como controlo positivo uma vez que, tratando-se de uma enzima glicolítica, é de expressão constitutiva em todas as células. No rim, com a sonda GAPDH antisense verificou-se um maior número de células marcadas a nível dos túbulos renais, o que está de acordo com o esperado uma vez que estas são células metabolicamente muito activas. Com a sonda GAPDH sense não se verificou marcação, assim como na lâmina de controlo negativo (só tampão), o que indica que a reacção com a sonda antisense é específica para o gene da GAPDH.

Expressão do gene da EPO no rim humano

Os resultados da hibridização *in situ* para o gene da EPO mostraram um sinal de elevada especificidade com a sonda antisense e ausência de sinal com a sonda sense, o que confirma a especificidade da sonda e da técnica de hibridização *in situ*. A marcação da expressão do gene da EPO foi detectada essencialmente em células tubulares (Figuras 14A-14D, 15A, 16 – 18) e, em algumas biópsias, foi detectada também em células glomerulares (Figuras 14E, 15B). O mesmo padrão de marcação das células tubulares foi detectado em 32 das 45 biópsias PAF e 4 das 10 biópsias de doadores. As biópsias diferiam entre elas apenas em termos de intensidade da marcação e número de células marcadas. As restantes 13 biópsias PAF e 6 biópsias de doadores foram consideradas negativas para a EPO uma vez que não marcaram com a sonda EPO antisense (Fig. 14F).

Todas as amostras foram obtidas de doentes com valores de hemoglobina superior a 10 g/dl, e a maioria apresentavam valores de hemoglobina superiores a 11.5 g/dl, logo estavam sob condições de normóxia. Os resultados obtidos na hibridização *in situ* em ambos os subgrupos de amostras renais (doadores de rim e doentes PAF), e em

condições normais ou anêmicas (10 - 11.5 g/dl) mostraram o mesmo padrão de marcação tubular. É importante salientar que os túbulos que marcaram para a EPO estão localizados preferencialmente junto dos glomérulos e de alguns vasos ou arteríolas, normalmente formando conjuntos ou aglomerados de túbulos marcados (Figuras 17 e 18). Este padrão foi constante em todas as biópsias com marcação positiva para a EPO.

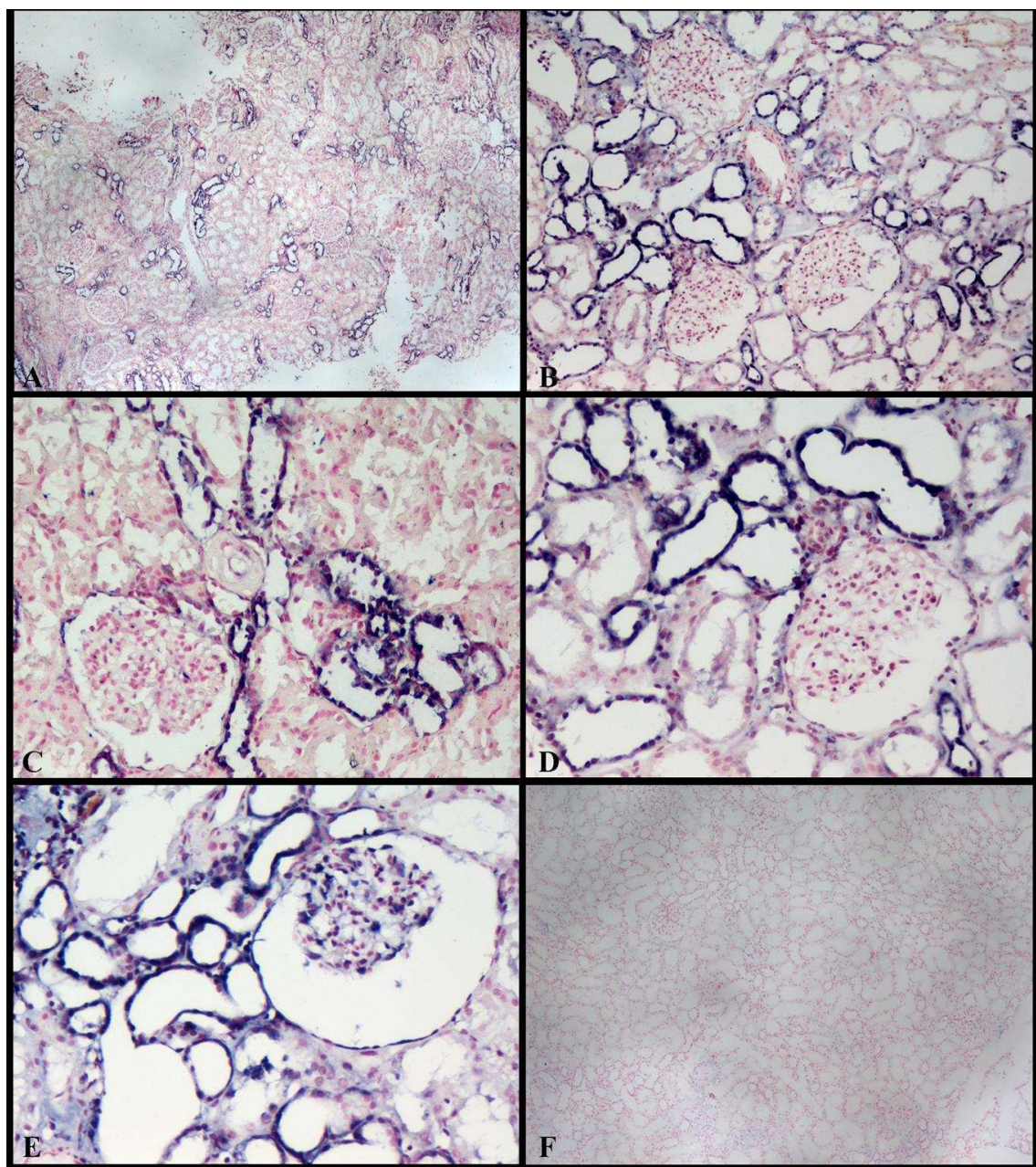


Figura 14 – Identificação dos locais de expressão do gene da EPO, por hibridização *in situ*, em amostras de rim humano normais (14A – 14F). A marcação positiva foi detectada principalmente em determinados túbulos renais (14A – 14D) e, em algumas amostras a expressão da EPO foi detectada também em células glomerulares (14E). Ausência de sinal com a sonda sense (14F). Ampliação original: 4x (14A, 14F), 10x (14B) e 20x (14C, 14D, 14E).

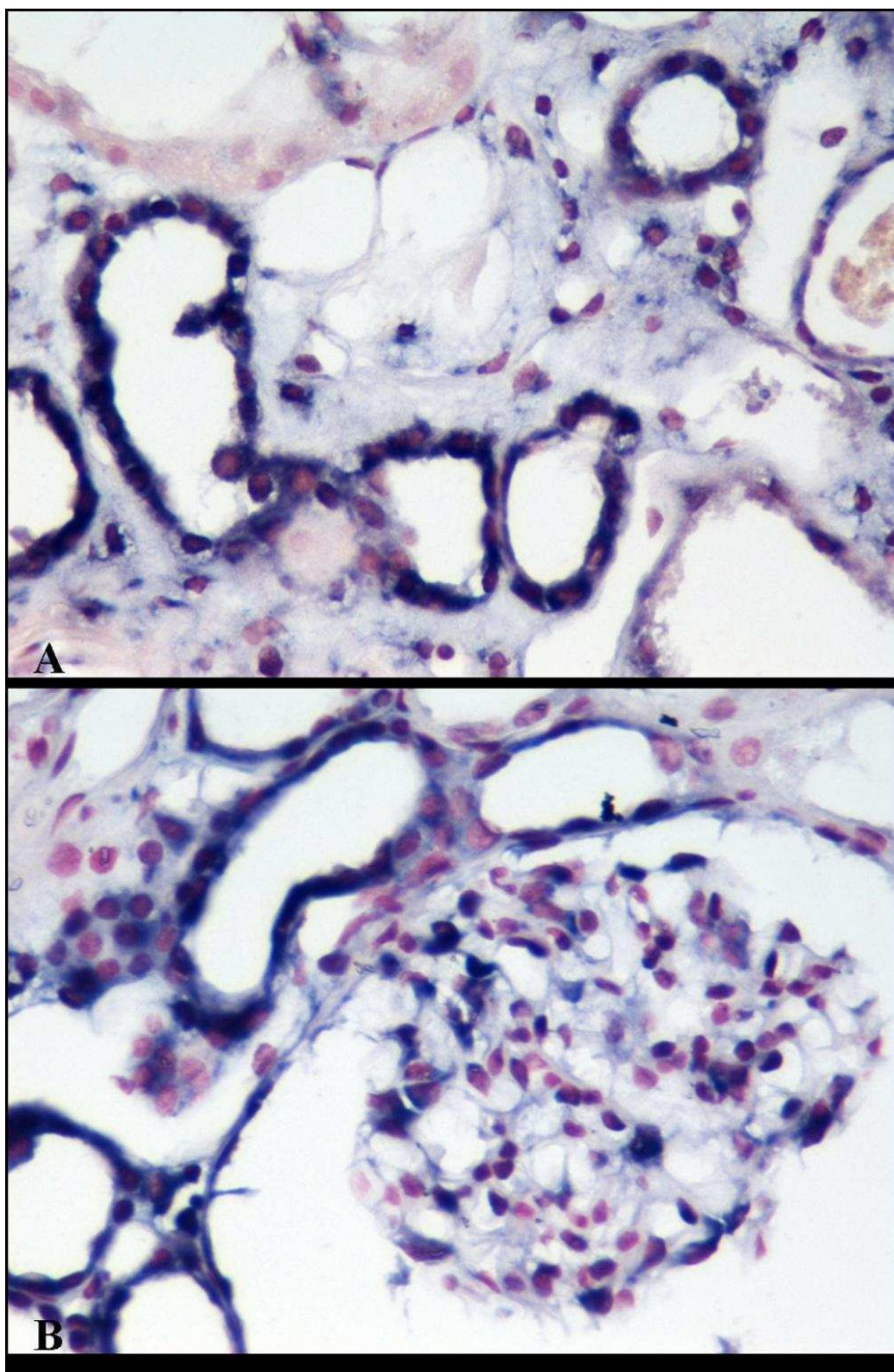


Figura 15 – Maior ampliação mostrando em detalhe as células com marcação positiva para a expressão da EPO por hibridização *in situ*. A expressão foi detectada em células tubulares (15A) e glomerulares (15B). Ampliação original: 40x (15A, 15B).

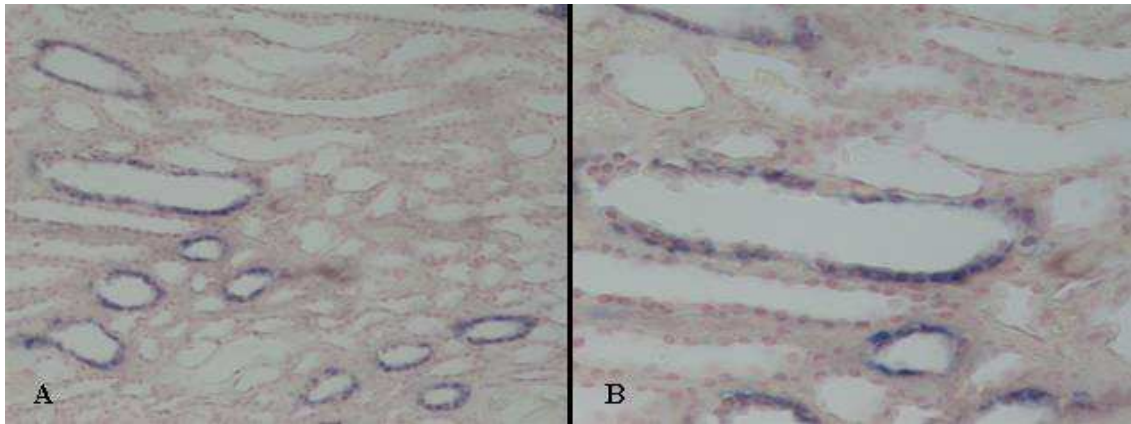


Figura 16 – Hibridização *in situ* com sonda EPO antisense em rim humano. Pormenor da marcação de túbulos renais. Ampliação original: 20x (16A), 40x (16B).

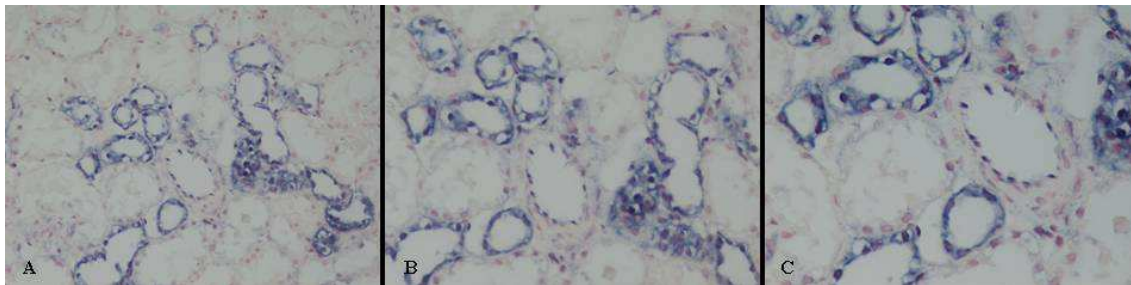


Figura 17 – Hibridização *in situ* com sonda EPO antisense em rim humano. Pormenor da marcação de um aglomerado de túbulos renais dispostos à volta de um vaso. Ampliação original: 20x (17A), 20x (17B), 40x (17C).

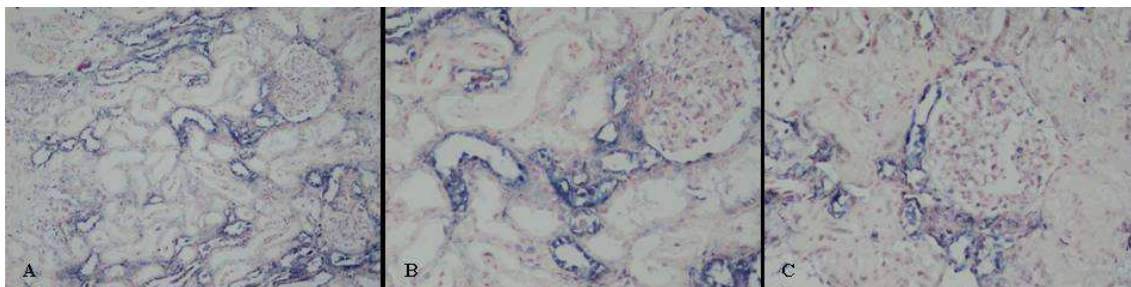


Figura 18 – Hibridização *in situ* com sonda EPO antisense em rim humano. Pormenor da marcação de túbulos renais dispostos preferencialmente junto dos glomérulos e vasos. Ampliação original: 10x (18A), 20x (18B), 20x (18C).

Isolamento das células renais produtoras de EPO e quantificação dos níveis de expressão do gene da EPO nestas células

A detecção da expressão da EPO apenas nos túbulos renais e por vezes em células glomerulares veio contrariar a maioria dos trabalhos publicados que assumem serem as células intersticiais peritubulares do tipo fibroblástico o local de produção de EPO no rim. Para validar este resultado, algo inesperado, procedeu-se à microdissecção a laser para estudar a expressão do gene da EPO apenas nas células tubulares e glomerulares que marcaram para a EPO na hibridização *in situ*. O RNA total destas células foi isolado e amplificado. A amplificação do RNA foi necessária devido a diversos factores: a escassez das amostras; as células capturadas provinham de material fixado em formol e impregnado com parafina, uma vez que se tratava de material de arquivo, condições que contribuem para a perda de material e consequentemente menor recuperação de RNA; o próprio gene da EPO tem um nível baixo de expressão, o que dificulta a sua detecção.

A partir do RNA amplificado foi possível verificar a expressão do mRNA da EPO nas células tubulares positivas e nos glomérulos. Como curva padrão foram utilizadas diluições sucessivas do vector EPO com concentrações padrão variando entre 6000 e 3×10^6 cópias / reacção. A detecção do sinal nos túbulos e glomérulos ocorreu apenas ao fim do ciclo 35 com um valor de Ct (threshold Cycle) superior ao limite da curva de calibração (menos de 6000 copias), o que impossibilitou a quantificação do número de cópias do gene da EPO nos túbulos e glomérulos. No entanto, a análise electroforética dos produtos de PCR obtidos no final do RT-PCR confirmam a amplificação do fragmento de EPO esperado tanto nos túbulos como nos glomérulos (Fig. 19). Este resultado confirma a presença de mRNA nas células tubulares e glomerulares, logo o gene da EPO está a ser expresso nestas células. O nível de expressão do gene da EPO é de facto muito baixo, o que dificulta a sua detecção. Novos ensaios terão que ser estudados e melhorados de forma a aumentar o limite detecção e assim possibilitar a quantificação do gene da EPO. O método de amplificação do RNA e síntese do cDNA terá também que ser melhorado de forma a aumentar a sua eficiência e diminuir a possibilidade de perdas de material durante os vários processos, nomeadamente nos passos de purificação por precipitação com etanol.

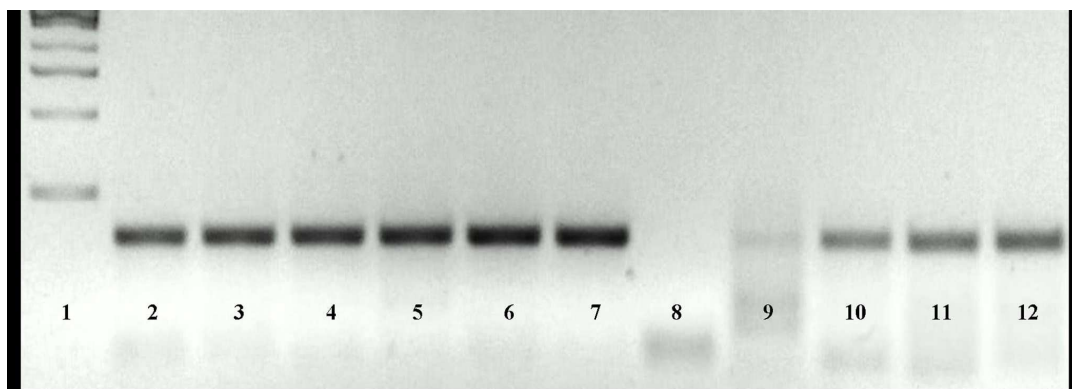


Figura 19 – Visualização do fragmento de 174 pares de bases da EPO, amplificado por PCR em tempo real.

1- Padrão de pesos Moleculares de DNA de 1kb, GeneRuler, Fermentas; 2- Vector EPO 6.000 cópias / reacção; 3- Vector EPO 6×10^4 cópias / reacção; 4- Vector EPO 3×10^5 ; 5- Vector EPO 6×10^5 ; 6- Vector EPO 3×10^6 ; 7- Controlo Negativo; 8- Túbulos-Mlu; 9- Túbulos-Eco; 10- Glomérulos-Mlu; 11- Glomérulos-Eco

Identificação das células renais humanas produtoras de EPO

A microdissecção a laser seguida da análise da expressão do gene da EPO por RT-PCR permitiu confirmar que a EPO é expressa por células tubulares e algumas células glomerulares. No entanto, apenas através da observação microscópica não é possível verificar com rigor as características morfológicas identificativas de cada estrutura e segmento renal. Foi necessário recorrer à análise com marcadores de superfície celular específicos de cada tipo de célula renal tubular. Para tal, as células tubulares proximais foram identificadas com o anticorpo anti-RCC, as células dos túbulos distais e colectores corticais foram identificadas com o anticorpo anti-Calbindina-D-28K e a Ansa de Henle foi identificada com o anticorpo anti-proteína de Tamm-Horsfall. A comparação de cortes seriados de hibridização *in situ* para a EPO e imunohistoquímica com estes anticorpos permitiu verificar que as células tubulares proximais são negativas para a marcação com a sonda EPO antisense (Fig. 20B, 20D, 20F, 20H), assim como as células da Ansa de Henle (Fig. 21C). A marcação para a EPO sobrepõe-se à marcação com o anticorpo anti-Calbindina-D-28K (Fig. 21B), que identifica as células dos túbulos distais e colectores corticais. Este resultado indica que a EPO é expressa no rim humano em condições de normóxia pelas células tubulares

distais e colectoras corticais. A identificação das células glomerulares que marcam em certas biópsias não foi ainda realizada. Somente pela análise histologica das células não é possível identificar com rigor o tipo celular, no entanto, pelas características morfológicas pode-se inferir que se tratam de podócitos.

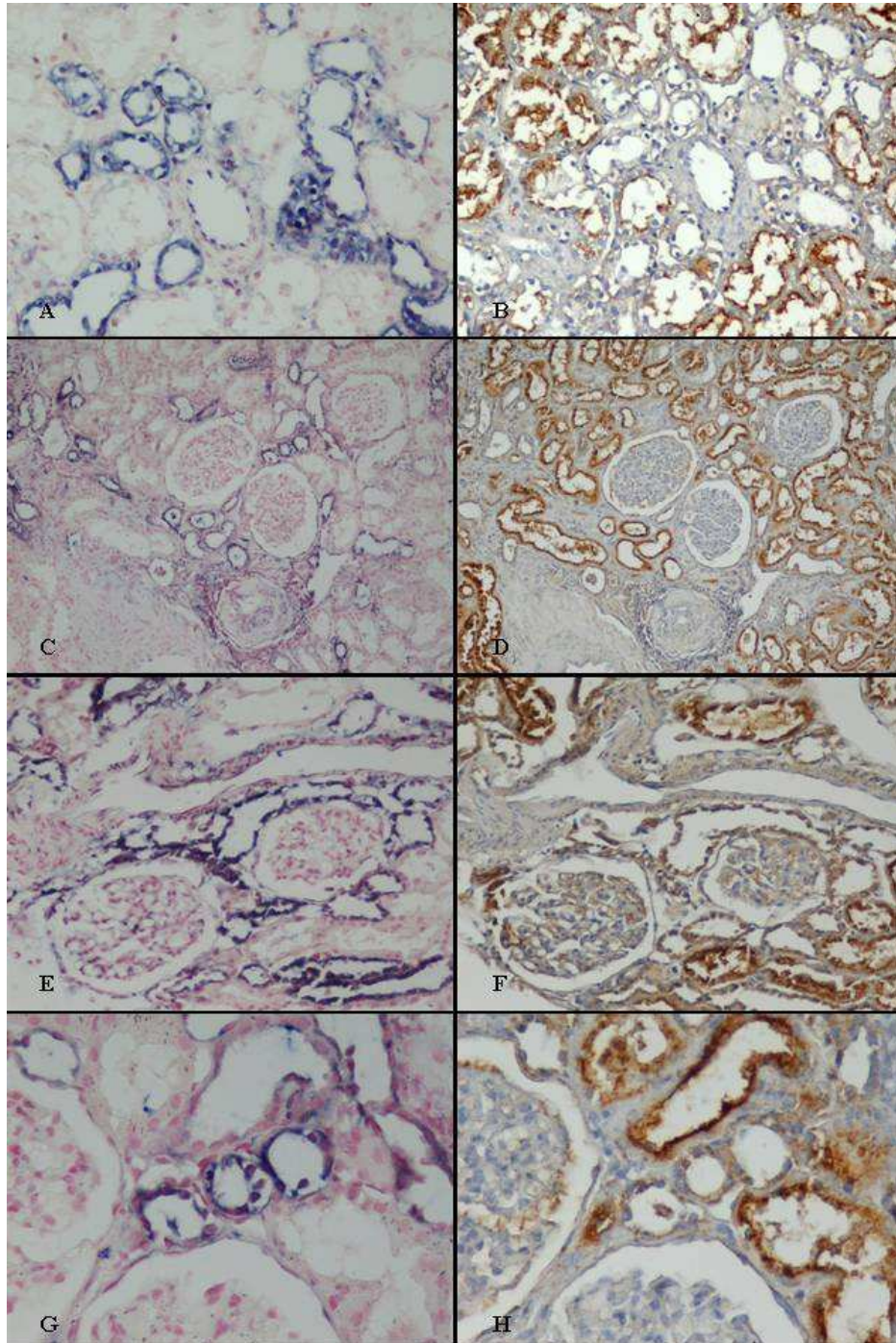


Figura 20 – Hibridização *in situ* para a EPO (A, C, E, G) e distribuição da proteína imunorreactiva “Renal Cell Carcinoma” (B, D, F, H), em cortes seriados de rim humano normal. Ampliação original: 20x (A, B); 10x (C, D), 20x (E, F), 40x (G, H).

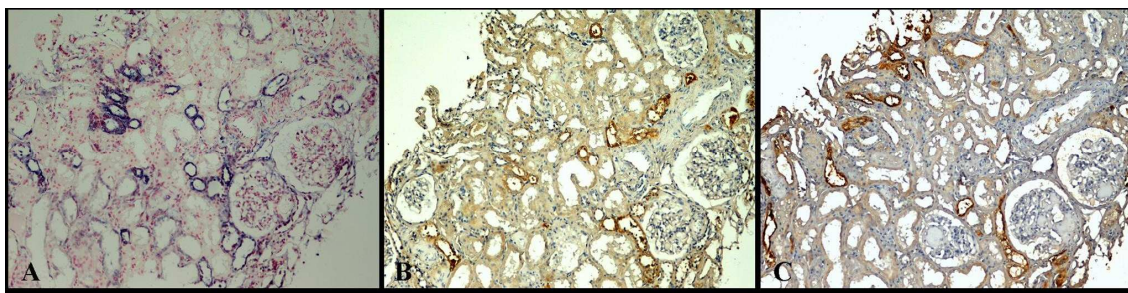


Figura 21 – Cortes seriados de hibridização *in situ* para a EPO (21A) e imunohistoquímica (21B, 21C) para as proteínas imunorreactivas Calbindina-D-28K (21B) e Proteína de Tamm-Horsfall (21C) produzidas pelos túbulos distais e colectores corticais (21B), e Ansa de Henle (21C), respectivamente.

A identificação da expressão do gene da EPO nos túbulos distais e colectores corticais, apesar de ter sido um resultado surpreendente, pode estar relacionada com o facto do HIF-1 α , um regulador da transcrição do gene da EPO, ser expresso nas células de túbulos distais e colectores corticais de ratos hipóxicos e isquémicos [18]. Sabe-se que a expressão da EPO é mediada pelo HIF-1 α e HIF-2 α , no entanto permanece por explicar qual destes dois factores de transcrição dá o seu maior contributo para a expressão da EPO. Recentemente, Yeo *et al* demonstraram em ratos hipóxicos que a transcrição renal da EPO é induzida igualmente pelo HIF-1 α e HIF-2 α [22]. O HIF-1 α é expresso predominantemente em células tubulares, enquanto o HIF-2 α é expresso em células endoteliais de um pequeno conjunto de glomérulos, e em células peritubulares endoteliais e fibroblastos [18]. Considerando esta observação e tendo em conta que a maioria dos estudos indicam serem células peritubulares intersticiais as produtoras de EPO, tem sido sugerido que é o HIF-2 α o principal regulador da expressão da EPO. No entanto, o HIF-1 α também induz a expressão de EPO em células, e é expresso em células tubulares distais e dos túbulos colectores corticais. Zhong *et al.* estudaram a expressão do HIF-1 α em tecidos normais e em cancros humanos comuns ressecados durante procedimentos oncológicos cirúrgicos de rotina [107]. A maioria dos tecidos humanos normais estudados mostrou ausência de expressão do HIF-1 α , excepto para células corticais adrenais, células acinares pancreáticas, hepatócitos fetais, células B proliferativas do baço, túbulos seminíferos e epitélio tubular distal renal. Curiosamente algumas destas células têm sido identificadas como outros locais de produção de EPO

para além do fígado e rim. A identificação destas como produtoras de EPO sugere um papel do HIF-1 α na indução da expressão da EPO nas células renais humanas. Para além da regulação da síntese da EPO, o sistema HIF regula diversos genes importantes para a fisiologia renal e processos fisiopatológicos, incluindo o metabolismo energético, a regulação vasomotora, a angiogénese e produção de metaloproteinases de matriz, e a regulação da apoptose / sobrevivência celular [108-110].

O rim funciona como “critmeter” na medida em funciona como sensor da tensão de oxigénio e do volume extracelular [111]. A disponibilidade de oxigénio versus a sua necessidade regula a produção de EPO através de um loop de feedback no qual a pressão de oxigénio nos tecidos é de importância central [112, 113]. Uma diminuição na pressão de oxigénio aumenta a produção da EPO, que por sua vez aumenta a massa de glóbulos vermelhos no sangue, melhora a capacidade de transporte de oxigénio do sangue para as células, e consequentemente aumenta os níveis de oxigénio nos tecidos. Um hematócrito normal de 45% é o valor para o qual a distribuição de oxigénio para os tecidos é máxima [114], e por isso o volume plasmático e a massa de eritrócitos têm de ser bem coordenados para se aproximarem do valor óptimo. Tem sido proposta uma localização comum para a regulação destes dois factores, nos topos das pirâmides corticais, na área justamedular, onde a EPO é produzida fisiologicamente [111]. Do oxigénio total que é fornecido ao rim, cerca de 80 % são gastos na produção de energia necessária para a reabsorção de sódio, que ocorre essencialmente no túbulo contornado proximal [115]. Alterações do volume plasmático podem também afectar a produção de EPO [116].

O sistema renina-angiotensina, um dos sistemas de controlo do volume corporal mais importantes está também envolvido na produção de EPO [117-119]. A libertação de renina leva ao aumento da angiotensina II, que promove a reabsorção do sódio pelo túbulo proximal e o consumo de oxigénio. Este aumento de actividade da renina é acompanhado por um aumento dos níveis de EPO séricos [117]. A renina é produzida pelas células justaglomerulares, que funcionam como mecanorreceptores sensíveis à pressão sanguínea. Estas células estão em contacto com as células da mácula densa, parte do túbulo distal contornado, que funciona como quimiorreceptor das alterações na concentração do soluto e velocidade de passagem do filtrado.

A identificação das células tubulares distais como produtoras de EPO é interessante e coloca a produção de EPO e o controlo do volume corporal no mesmo segmento renal. O nefrónio distal funciona assim como “critmeter”, para além da regulação do pH, potássio e água.

A identificação das células produtoras de EPO noutras espécies foi realizada sob condições não fisiológicas, após hemorragia severa para indução de anemia e hipóxia. Esta condição força a produção de EPO a ocorrer em áreas mais superficiais do cortex renal, e poderia explicar a identificação do mRNA da EPO em células tubulares proximais e células intersticiais.

Este trabalho foi o primeiro realizado *in situ* em biópsias renais humanas para identificar as células produtoras de EPO no rim humano em condição de normóxia.

O gene da EPO, em condições normais, é pouco expresso, sendo a sua expressão altamente estimulada em condições de hipóxia pelo HIF [17, 108-110, 120]. Este facto constitui a razão principal pela qual os estudos realizados até à data usam modelos animais sujeitos a hipóxia severa. A hipóxia nos modelos animais pode ser estimulada de várias formas: por hemorragia induzida de forma a reduzir o hematócrito, por exposição dos animais a uma atmosfera com níveis reduzidos de oxigénio (normalmente 8%), por exposição a monóxido de carbono (CO), ou por tratamento com CoCl_2 . Os padrões de expressão do HIF-1 α e HIF-2 α diferem consoante as condições em que a hipóxia foi induzida [18]. Nesse trabalho, Rosenberger *et al.* observaram que em condições de hipóxia normobárica (níveis reduzidos de oxigénio) o HIF-1 α é produzido a nível dos túbulos corticais, ductos colectores papilares e células intersticiais papilares; em hipóxia induzida com CO o HIF-1 α é expresso nos túbulos conectores, ductos colectores corticais e algumas células intersticiais, e o HIF-2 α foi detectado em certas células glomerulares e células peritubulares intersticiais. Na hipóxia induzida por CoCl_2 a distribuição tubular do HIF-1 α diferiu marcadamente da induzida pelo CO. O HIF-1 α foi produzido em cerca de 70-80% dos túbulos distais, os ductos colectores foram negativos para o HIF-1 α e a marcação para o HIF-2 α verificou-se apenas em algumas células glomerulares e peritubulares. Estes resultados sugerem que a expressão do HIF-1 α pode ocorrer praticamente em todos os segmentos renais, dependendo do tipo de hipóxia à qual o organismo está sujeito, ou seja, as células renais produtoras do HIF em condições de hipóxia variam consoante o tipo de hipóxia que é induzida. Por outro lado,

independentemente do tipo de estímulo, a expressão do HIF-2 α foi mais constante, tendo-se limitado a um conjunto de células glomerulares e intersticiais. Vários estudos apontam para que seja o HIF-2 α o principal regulador da produção da EPO. Uma vez que o HIF estimula a produção de EPO, estes resultados podem explicar as diferenças encontradas entre os resultados publicados em modelos animais e os resultados obtidos neste trabalho com as amostras de rim humano normóxico. Em normóxia, Rosenberger *et al.* verificaram marcação citoplasmática, embora fraca, para o HIF-2 α em algumas células tubulares do córtex. Este dado, juntamente com o facto de, no rim humano a produção de EPO ter sido encontrada em células tubulares distais e colectoras corticais e algumas células intersticiais e glomerulares pode de facto indicar que a EPO seja regulada pelo HIF-2 α . Por outro lado, o facto do HIF ser produzido em diferentes células renais consoante o tipo de estímulo à hipóxia, e o facto do HIF regular a produção de EPO podem, por si só, justificar as diferenças relativamente às células produtoras de EPO em modelos animais sujeitos a hipóxia e às células produtoras de EPO no rim humano em normóxia.

V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclusões e Perspectivas Futuras

A eritropoietina humana é produzida essencialmente pelo rim no adulto. Através da técnica de hibridização *in situ* e com sondas específicas para o gene da EPO humano foi possível detectar a sua expressão a nível renal. No rim humano normóxico o gene da EPO é expresso essencialmente em células dos túbulos distais e colectores corticais, assim como em algumas células glomerulares e intersticiais.

O rim funciona como sensor da tensão de oxigénio e do volume extracelular. O controlo do volume corporal depende essencialmente do sistema renina-angiotensina. Sendo a renina produzida pelas células justaglomerulares, que estão em contacto com as células da mácula densa e parte do túbulo distal contornado, a identificação das células tubulares distais como produtoras de EPO é interessante e coloca a produção de EPO e o controlo do volume corporal no mesmo segmento renal, ou seja, no topo das pirâmides corticais, na área justamedular.

A identificação do local de expressão da EPO no rim humano é importante essencialmente para melhorar o conhecimento da fisiologia e fisiopatologia do rim. O conhecimento das células renais produtoras de EPO poderá permitir, por exemplo, relacionar certas doenças renais com a génese da anemia que lhes está associada.

Sendo a expressão da EPO induzida pelo factor de transcrição HIF seria interessante, no futuro, estudar a produção do HIF-1 α e HIF-2 α nas mesmas biópsias, e a sua eventual relação com a produção de renina.

Num futuro, talvez longínquo e um pouco pretensioso, a identificação das células renais produtoras de EPO poderá permitir estabelecer uma terapia génica dirigida para essas células de forma a regular a produção de EPO em situações patológicas.

Uma abordagem interessante seria tentar estabelecer culturas celulares renais produtoras de EPO e estudar o efeito de vários factores, nomeadamente de citocinas inflamatórias e factores de transcrição, sobre a produção de EPO.

No cancro, a correcção da anemia melhora a qualidade de vida dos doentes mas pode potenciar o crescimento tumoral devido aos seus efeitos anti-apoptóticos. Esta acção anti-apoptótica é realizada através da via JAK2/STAT5/BCL-X. A descoberta de receptores para a EPO próprios das células tumorais poderia levar ao desenvolvimento de um novo alvo terapêutico susceptível de inibição selectiva.

VI. BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. Cameron J.S. Towards the millenium: a history of renal anaemia and the optimal use of epoietina. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(2): 10-21.
2. Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Pysiol* 2004; 286: R977-R988.
3. Carnot P., DeFlandre C. Sur l'activite hemopoietique de serum au cours de la regeneration du sang. *C R Acad Sci Paris* 1906; 143: 384-386.
4. Erslev A. Humoral Regulation of Red Cell Production. *Blood* 1953; 8:349-357.
5. Zanjani ED. Liver to kidney switch of erythropoietin formation. *Exp Heamatol*. 1980; 8:29-40.
6. Zanjani ED, Ascensao JL, McGlave PB, Banisadre M, Ash RC. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest*. 1981; 67(4):1183-1188
7. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 1998; 92(9):3218-3225.
8. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72: 449-489.
9. Zanjani ED, Ascensao JL. Erythropoietin. *Transfusion* 1989; 29(1):46-57.
10. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998; 93(3):385-395.
11. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999; 98(2):181-191.
12. Udupa K.B. Functional Significance of Erythropoietin Receptor on Tumor Cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12(46): 7460-7462.
13. Hardee M.E., Arcasoy M.O., Blackwell K.L., Kirkpatrick JP., Dewhirst M.W. Erythropoietin Biology in Cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2): 332-339.

14. Konstantinopoulos P.A., Karamouzis M.V., Papavassiliou A.G. Selective modulation of the erythropoietic and tissue-protective effects of erythropoietin: Time to reach the full therapeutic potential of erythropoietin. *Biochemica et Biophysica Acta* 2007; 1776: 1-9.
15. Noguchi C.T., Asavaritikrai P., Teng R., Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 2007; 64: 159-171.
16. Percy M.L.J. Genetically heterogeneous origins of idiopathic erythrocytosis. *Hematology* 2007; 12(2): 131-139.
17. Bunn H.F. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007; 109(3): 868-873.
18. Rosenberber, C, Mandriota, F, Jürgensen, YS, Wiesener, MS, Hörstrup, JH. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and -2 α in Hypoxic and Ischemic Rat Kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13:1721-1732.
19. Mole D.R., Ratcliffe P.J. Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatr Nephrol*, 2007.
20. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 1999; 94(6):1864-1877.
21. Al-Sheikh M, Moradkhani K., Lopez M., Wajcman H., Préhu C. Disturbance in the HIF-1 α pathway associated with erythrocytosis: Further evidences brought by frameshift and nonsense mutations in the prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) gene. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2008; 40(2):160-165.
22. Yeo, EJ, Cho, YS, Kim, MS, Park, JW. Contribution of HIF-1 α or HIF-2 α to erythropoietin expression: in vivo evidence based on chromatin immunoprecipitation. *Ann Hematol.* 2008; 87:11-17.
23. Li F., Chong Z.Z., Maiese K. Erythropoietin in a Tightrope: Balancing Neuronal and Vascular Protection between Intrinsic and Extrinsic Pathways. *Neurosignals* 2004; 13: 265-289.
24. Cheetham J.C., Smith D.M., Aoki K.H., Stevenson J.L., Hoeffel T.J., Syed R.S., Egrie J., Harvey T.S. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat.Struct.Biol.* 1998; 5: 861-866.

25. Witzig T. E., Silberstein P. T., Loprinzi C.L., Sloan J.A. Phase III, randomized, double-blind study of epoetin alpha compared with placebo in anemic patients receiving chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 2606-2617.
26. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R., Villa P., Fratelli M., Savinio C. *et al.* Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004; 305(5681): 239–242.
27. Henry D. H. The Evolving Role of Epoetin Alfa in Cancer Therapy. *The Oncologist* 2004; 9: 97-107.
28. Tsiolakidou G., Koutroubakis I.E. Stimulating erythropoiesis in inflammatory bowel disease associated anemia. *World J Gastroenterol* 2007; 13(36): 4798-4806.
29. Engert A. Recombinant human erythropoietin in oncology: current status and further developments. *Annals of Oncology* 2005; 16: 1584-1595.
30. Ghezzi P., Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death and Differentiation* 2004; 11: S37–S44.
31. Mori M, Uchida M, Watanabe T, Kirito K, Hatake K, Ozawa K, Komatsu N. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol* 2003; 195(2): 290-297.
32. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K., Lee E.S., Keissimian N., Noguchi C.T. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3974-3978.
33. Ammarguella F, Gogusev J, Drueke TB. Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:687-692.
34. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 39754-39761.
35. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal L.S., Thompson R.B., Petrofski J.A., Matsumoto A., Stamler J.S., Koch W.J. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; 279: 20655-20662.

36. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K., Kobayashi S., Kim S.U. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *JNeuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 386-392.
37. Grimm C, Wenzel A, Groszer M., Mayser H., Seeliger M., Samardzija M., Bauer C., Gassmann M., Remé C.E. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 2002; 8: 718-724.
38. Ohneda O, Yanai N, Obinata M. Erythropoietin as a mitogen for fetal liver stromal cells which support erythropoiesis. *Exp Cell Res* 1993; 208:327-331.
39. Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 1989; 74: 103-109.
40. Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 1999; 55: 808-820.
41. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem.* 1994; 269(30): 19488-19493.
42. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K., Nagao M., Sasaki R. Estrogen dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273:25381-25387.
43. Conrad KP, Benyo DF, Westerhausen-Larsen A, Miles TM. Expression of erythropoietin by the human placenta. *FASEB J* 1996; 10(7): 760-768.
44. Magnanti M., Gandini O., Giuliani L, Gazzaniga P., Marti H.H., Gradilone A., Frati L., Aglianò A.M., Gassmann M. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood* 2001; 98:2872-2874.
45. Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int.* 2006; 70(2):246-250.
46. Sakanaka M., Wen TC., Matsuda S., Masuda S., Morishita E. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 4635-4640.
47. Celik M, Gökmen N., Erbayraktar S., Akhisaroglu M., Konakc S., Ulukus C., Genc S., Sagiroglu E., Cerami A., Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron

- apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 2258-2263.
48. Maiese K., Li F., Chong Z. Z. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2004; 25(11): 577-583.
 49. Juul S.E., Anderson D.K., Li Y., Christensen R.D. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998; 43(1): 40-49.
 50. Grasso G, Buemi M, Alafaci C, Sfacteria A, Passalacqua M, Sturiale A, Calapai G, De Vico G, Piedimonte G, Salpietro FM, Tomasello F. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(8):5627-5631.
 51. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(19):10526-10531.
 52. Martínez-Estrada OM, Rodríguez-Millán E, González-De Vicente E, Reina M, Vilaró S, Fabre M. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci.* 2003; 18(9): 2538-2544.
 53. Calvillo L., Latini R., Kajstura J., Leri A., Anversa P., Ghezzi P., Salio M., Cerami A., Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodelling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 4802-4806.
 54. Zhang J, Wu Y, Jin Y, Ji F, Sinclair SH, Luo Y, Xu G, Lu L, Dai W, Yanoff M, Li W, Xu GT. Intravitreal Injection of Erythropoietin Protects both Retinal Vascular and Neuronal Cells in Early Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(2): 732-742.
 55. Ranchon Cole I, Bonhomme B, Doly M. Pre-treatment of adult rats with high doses of erythropoietin induces caspase-9 but prevents light-induced retinal injury. *Exp Eye Res.* 2007; 85(6):782-789.
 56. Hodges V.M., Rainey S., Lappin T.R., Maxwell A.P. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 2007; 64: 139-158.

57. Xin ZT, Beauchamp AD, Calado RT, Bradford J.W., Regal J.A., Shenoy A., Liang Y., Lansdorp P.M., Young N.S., Ly H. Functional characterization of natural telomerase mutations found in patients with hematological disorders. *Blood* 2007; 109:524–532.
58. Umbreit J. Iron deficiency: a concise review. *Am J Hematol* 2005; 78:225–231.
59. Whitehead VM. Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *Br J Haematol* 2006; 134: 125–136.
60. Grasbeck R. Megaloblastic anaemia (MA). *Hematology* 2005; 10(1): 227–228.
61. Malyszko J., Mysliwiec M. Hepcidin in Anemia and Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* 2007; 30:15–30.
62. Forget BG. De novo and acquired forms of alpha thalassemia. *Curr Hematol Rep* 2006; 5:11–14
63. McMullin MF, Hillmen P, Elder GE, Lappin TR, Luzzatto L. Serum erythropoietin levels in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: implications for therapy. *Br J Haematol* 1996; 92: 815–817.
64. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1011–1023.
65. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho H.J., Keefer L.K., Nathan C.F., Young N.S. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1995; 96: 1085–1992.
66. Fliser D, Bahlmann FH, Haller H. Epo: renoprotection beyond anemia correction. *Pediatr Nephrol* 2006; 21:1785–1789.
67. Sharples EJ, Yaqoob MM. Erythropoietin and acute renal failure. *Semin Nephrol* 2006; 26:325–331.
68. Jurado García JM, Torres Sánchez E, Olmos Hidalgo D, Alba Conejo E. Erythropoietin pharmacology. *Clin Transl Oncol.* 2007; 9(11):715-722.
69. Casati S, Passerini P, Campise MR, Graziani G, Cesana B, Perisic M, Ponticelli C. Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in

- patients having haemodialysis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987; 295(6605):1017-1020.
70. Jelkmann W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. *Methods Enzymol*. 2007; 435:179-197.
 71. Österborg A., Aapro M., Cornes P., Haselbeck A., Hayward C.R., Jelkmann W. Preclinical studies of erythropoietin receptor expression in tumour cells: Impact on clinical use of erythropoietic proteins to correct cancer-related anaemia. *Eur J Cancer* 2007; 43: 510-519.
 72. Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, Leśniewicz T, Kanczuga-Koda L, Sulkowski S. STAT3, HIF-1alpha, EPO and EPOR - signaling proteins in human primary ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007; 45(2):81-86.
 73. Calò LA, Davis PA, Piccoli A, Pessina AC. A role for heme oxygenase-1 in the antioxidant and antiapoptotic effects of erythropoietin: the start of a good news/bad news story? *Nephron Physiol*. 2006; 103(3):107-111.
 74. Hirota K, Semenza GL Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 59(1):15-26.
 75. Semenza G.L.Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discovery Today* 2007; 12: 853-858.
 76. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006; 93(8): 73-80.
 77. Stasi R., Amadori S., Littlewood T.J., Terzoli E., Newland A.C., Provan D. Management of Cancer-Related Anemia with Erythropoietic Agents: Doubts, Certainties, and Concerns. *The Oncologist* 2005; 10: 539-554.
 78. Henry DH, Abels RI. Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer and chemotherapy-induced anemia: results of double-blind and open-label follow-up studies. *Semin Oncol*. 1994; 21(3):21–28.
 79. Glaspy J, Bukowski R, Steinberg D, Taylor C, Tchekmedyian S, Vadhan-Raj S. Impact of therapy with epoetin alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies during cancer chemotherapy in community oncology practice. Procrit Study Group. *J Clin Oncol*. 1997; 15(3):1218-1234.

80. Demetri GD, Kris M, Wade J, Degos L, Cella D. Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study. Procrit Study Group. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 3412–3425.
81. Gabrilove JL, Cleeland CS, Livingston RB, Sarokhan B, Winer E, Einhorn LH. Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin alfa in chemotherapy patients: improvements in hemoglobin and quality of life are similar to three-times-weekly dosing. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 2875–2882.
82. Vansteenkiste J, Pirker R, Massuti B, et al. on behalf of the Aranesp 980297 Study Group. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of darbepoetin alfa in lung cancer patients receiving chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 1211–1220.
83. Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercammen E, Rapoport B. on behalf of the Epoetin Alfa Study Group. Effects of epo-etin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 2865–2874.
84. Fallowfield L, Gagnon D, Zagari M, Cella D, Bresnahan B, Littlewood TJ, McNulty P, Gorzegno G, Freund M; Epoetin Alfa Study Group. Multivariate regression analyses of data from a randomised, double-blind, placebo-controlled study confirm quality of life benefit of epoetin alfa in patients receiving non-platinum chemotherapy. *Br J Cancer*. 2002; 87(12):1341-1353.
85. Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, Piper M, Schwarzer G, Sandercock J, Trelle S, Weingart O, Bayliss S, Djulbegovic B, Bennett CL, Langensiepen S, Hyde C, Engert A. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98(10): 708-714.
86. Crawford J, Robert F, Perry MC, Belani C, Williams D. on behalf of the Anemia Prevention in nsclC Group. A randomized trial comparing immediate versus delayed treatment of anemia with once-weekly epoetin alfa in patients with non-small cell lung cancer scheduled to receive first-line chemotherapy. *J Thorac Oncol*. 2007; 2: 210–220.

87. von Wussow U., Klaus J., Pagel H. Is the renal production of erythropoietin controlled by the brain stem? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: 82-86.
88. Jacobson L.O., Goldwasser E., Fried W., Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. 1957; 179(4560): 633-634.
89. Kuratowska Z., Lewartowski B., Michalak E. Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood*. 1961; 18:527-534.
90. Hirashima K, Takaku F. Experimental studies on erythropoietin. II. The relationship between juxtaglomerular cells and erythropoietin. *Blood*. 1962; 20:1-8.
91. Burlington, H, Cronkite, EP, Reincke, U, Zanjani, ED. Erythropoietin Production in Cultures of Goat Renal Glomeruli. *Proc Nat Acad Sci* 1972; 69(12): 3547-3550.
92. Maxwell, AP, Lappin, TR, Johnston, J, Bridges, JM, McGeown, MG. Erythropoietin production in kidney tubular cells. *Br J Haematol* 1990; 74: 353-539.
93. Mujais, SK, Bery, N, Pullman, TN, Goldwasser, E. Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney. *Cell Biochem Biophys* 1999; 30: 153-166.
94. Loya, F, Yang, Y, Lin, H, Goldwasser, E, Albitar, M. Transgenic mice carrying the erythropoietin gene promoter linked to lacZ express the reporter in proximal convoluted tubule cells after hypoxia. *Blood* 1994; 84: 1831-1836.
95. Shanks, JH, Hill, CM, Lappin, TR, Maxwell, AP. Localization of erythropoietin gene expression in proximal renal tubular cells detected by digoxigenin-labelled oligonucleotide probes. *J Pathol*. 1996; 179(3): 283-287.
96. Horiguchi, H, Oguma, E, Kayama, F. Cadmium and cisplatin damage erythropoietin-producing proximal renal tubular cells. *Arch Toxicol* 2006; 80(10): 680-686.
97. Koury, ST, Bondurant, MC, Semenza, GL, Koury, MJ. The use of in situ hybridization to study erythropoietin gene expression in murine kidney and liver. *Microsc Res Tech* 1993; 25(1): 29-39.
98. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest*. 1988; 81(2): 620-623.

99. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Salzmann JL, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P. Cellular localization of erythropoietin gene transcription. *Adv Exp Med Biol.* 1989; 271: 69-74.
100. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Tambourin P, Varet B. Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion. *Am J Kidney Dis.* 1991;18(4):14-19
101. Fisher, JW, Koury, S, Ducey, T, Mendel, S. Erythropoietin (Epo) production by interstitial cells of hypoxic monkey Kidneys. *Br J Haematol* 1996; 95: 27-32.
102. Bachmann, S, Le Hir, M, Eckardt, KU. Co-localization of Erythropoietin mRNA and Ecto-5'-Nucleotidase Immunoreactivity in Peritubular Cells of Rat Renal Cortex Indicates That Fibroblast produce Erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 335-341.
103. Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(22): 7972-7976.
104. Bauer, C, Kurtz, A. Oxygen sensing in the kidney and its relation to erythropoietin production. *Annu Rev Physiol* 1989; 51: 845-856.
105. Moll, PR, Duschl, J, Richter, K. Optimized RNA amplification using T7-RNA-polymerase based in vitro transcription. *Anal Biochem* 2004; 334(1):164-174.
106. Nakazono, M, Qiu, F, Borsuk, LA, Schnable, PS. Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell* 2003; 15(3):583-596.
107. Zhong H, De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W.B., Semenza G.L., Simons J.W. Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 α in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Res.* 1999; 59: 5830-5835.
108. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 551-578.

109. Pugh, CW, Chang, GW, Cockman, M, Epstein, AC, Gleadle, JM. Regulation of gene expression by oxygen levels in mammalian cells. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1999; 29: 191-206.
110. Sowter, HM, Ratcliffe, PJ, Watson, P, Greenberg, AH, Harris, AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 6669-6673.
111. Donnelly, S. Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a critmeter. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38 (2): 415-425.
112. Erslev A.J. Erythropoietin. *N Engl J Med* 1991; 324(19): 1339–1344.
113. Ratcliffe, P.J. Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int* 1993; 44: 887-904.
114. Fan F.C., Chen R.Y.Z., Schuessler G.B., Chien S. Effects of hematocrit variations on regional hemodynamics and oxygen transport in the dog. *Am J Physiol* 1980; 238: 545-552.
115. Piroso, E, Erslev, AJ, Flaharty, KK, Caro, J. Erythropoietin life span in rats with hypoplastic and hyperplastic bone marrows. *Am J Hematol* 1991; 36: 105-110
116. Eckardt, KU, Kurtz, A, Bauer, C. Regulation of erythropoietin production is related to proximal tubular function. *Am J Physiol* 1989; 256: 942-947.
117. Vlahakos D.V., Balodimos C., Papachristopoulos V., Vassilakos P., Hinari E., Vlachojannis J.G. Renin-angiotensin system stimulates erythropoietin secretion in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1995; 43: 53-59.
118. Donnelly, S, Shah BR. Erythropoietin deficiency in hyporeninemia. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 947-953.
119. Nowicki, M, Kokot, F, Wiecek, A. Influence of the rennin-angiotensin system stimulation on erythropoietin production in patients with various forms of arterial hypertension. *Nephron* 1993; 65: 527-532.
120. Jelkmann, W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 2004; 43: 649-659.

ANEXO 1 – GENE DA EPO

Gene da EPO

Adaptado de:

Ensembl Gene ID - **ENSG00000130427**

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000130427

e de

Homo sapiens erythropoietin (EPO), mRNA - NM_000799

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=Nm_000799.2

```
1   CCCGGAGCCG GACCGGGGCC ACCGCGCCCG CTCTGCTCCG ACACCGCGCC CCCTGGACAG
   CCGCCTCTCT CTCCAGGCCG GTGGGGCTGG CCCTGCACCG CCGAGCTTCC CGGGATGAGG
   GCCCCCGGTG TGGTCACCCG GCGCGCCCA GGTGCTGAG GGACCCCGGC CAGGCGCGGA 178F
181  GATGGGGGTG CACG
   gtgagtactcggggctgggctccccgcccgggtccctgtttgagcgggga.....
   .....cgtggggatgaaggaagctgtccttcacagccacccttctccctccccgcctgac
   tctcagcctggctatctgttctag
195  AATGTCCTGC CTGGCTGTGG CTCTCCTGT CCCTGCTGTC GCTCCCTCTG GGCCTCCAG
   TCCTGGGCGC CCCACCACGC CTCATCTGTG ACAGCCGAGT CCTGGAGAGG TACCTCTTGG
315  AGGCCAAGGA GGCCGAGAAT ATCAGC
   gtgagacccttccccagcacattccacagaactcacgctcagggcttcagggaac.....
   .....gcagatcctacggcctgtgggccagggccagagccttcagggaacccttgactcccc
   gggctgtgtgcatttcag
341  ACGGGCTGTG CTGAACACTG CAGCTTGAAT GAGAATATCA CTGTCCAGAG CACCAAAGTT 393F
   AATTCTATG CCTGGAAGAG GATGGAG
   gtgagttccttttttttttttttcttttcttttgagaatctcatttgcgagcct.....
   .....ttggggctgctgaggggcaggaggagagggtgacatgggtcagctgactcccaga
   gtccactccctgtag
428  GTCGGGCAGC AGGCGGTAGA AGTCTGGCAG GGCCTGGCCC TGCTGTCGGA AGCTGTCCTG
   CGGGGCCAGG CCCTGTTGGT CAACTCTTCC CAGCCGTGGG AGCCCTGCA GCTGCATGTG
548  GATAAAGCCG TCAGTGGCCT TCGCAGCCTC ACCTCTCTGC TTCGGGCTCT GGGAGCCCCAG 596F
   gtgagtaggagcggacacttctgcttgcctttctgtgaagaaggggagaaggggtcttgct
   aaggagtagaggaactgtccgtattccttccctttctgtggcactgcagcgacctcctgt
   tttctccttggcag
608  AAGGAAGCCA TCTCCCTCC AGATGCGGCC TCAGCTGCTC CACTCCGAAC AATCACTGCT 596F
   GACACTTTCC GCAAACCTTT CCGAGTCTAC TCCAATTTCC TCCGGGGAAA GCTGAAGCTG
728  TACACAGGGG AGGCCTGCAG GACAGGGGAC AGATGACCAAG GTGTGTCCAC CTGGGCATAT 748R
   CCACCACCTC CCTACCAAC ATTGCTTGTG CCACACCCTC CCCCGCCACT CCTGAACCCC
   GTCGAGGGGC TCTCAGCTCA GCGCCAGCCT GTCCCATGGA CACTCCAGTG CCAGCAATGA
908  CATCTCAGGG GCCAGAGGAA CTGTCCAGAG AGCAACTCTG AGATCTAAGG ATGTCACAGG 976R
   GCCAACTTGA GGGCCAGAG CAGGAAGCAT TCAGAGAGCA GCTTTAACT CAGGGACAGA
   GCCATGCTGG GAAGACGCCT GAGCTCACTC GGCACCCTGC AAAATTTGAT GCCAGGACAC
1088 GCTTTGGAGG CGATTTACCT GTTTTCGCAC CTACCATCAG GGACAGGATG ACCTGGATAA
   CTTAGGTGGC AAGCTGTGAC TTCTCCAGGT CTCACGGGCA TGGGCACTCC CTTGGTGGCA 1186R
   AGAGCCCCCT TGACACGGG GTGGTGGGAA CCATGAAGAC AGGATGGGGG CTGGCCTCTG
1268 GCTCTCATGG GGTCCAAGTT TTGTGTATTC TTCAACCTCA TTGACAAGAA CTGAAACCAC 1329R
1328 CA
```

Lista de primers utilizados para amplificar o gene da EPO

EPO 1F - Tm 56°C 178F - ggagatgggggtgcacga
 EPO 2F - Tm -- 393F - ccaaagttaatttctatgcctgga
 EPO 3F - Tm 54°C 596F - ctgggagcccagaaggaag

 EPO 1R - Tm 58°C 597R - cactctgcttcgggctct
 EPO 2R - Tm 57°C 748R - gacaggggacagatgaccaggt
 EPO 3R - Tm -- 976R - gatgtcacagggccaacttg
 EPO 4R - Tm -- 1186R - acttctccaggtctcacggg

Fragmentos (bp) obtidos com as várias combinações de primers:

		Reverse			
		1R	2R	3R	4R
Forward	1F	420 bp	592 bp	767 bp	799 bp
	4F	205 bp	377 bp	552 bp	584 bp
	6F	--	173 bp	349 bp	381 bp

ANEXO 2 – cDNA DA GAPDH

cDNA da Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH)

Ensembl Gene ID - ENSG00000111640

```
1 AGGCGGGGTCCGAGTCACCGCCTGCCGCCGCGCCCCGGTTTCTATAAATTGAGCCCGCA
61 GCCTCCCGCTTCGCTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGCCTC
121 GCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATT
181 TGGTCGTATTGGGCGCCTGGTCACCAAGGCTGCTTTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTGT
241 TGCCATCAATGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATGATTC
301 CACCCATGGCAAATTCCATGGCACCCTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCATCAATGG
361 AAATCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGGCGATGCTGG
421 CGCTGAGTACGTGCTGGAGTCCACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCA
481 TTTGCAGGGGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCATGTT
541 CGTCATGGGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTC
601 CTGCACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGGTATCGT
661 GGAAGGACTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCC
721 CTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTAC
781 TGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCAT
841 GGCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAA
901 ACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAA
961 GGGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCA
1021 CTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGTCAT
1081 TTCCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCACAT
1141 GGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGA
1201 GAGACCCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCC
1261 CTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTT
1321 GTCATGTACCATCAATAAA
```

Primers utilizados para amplificar um fragmento do gene da GAPDH:

302F - TCTTCCAGGAGCGAGATC

822R - AAAAACCTGCCAAATATG

ATRIBUIÇÕES

A Figura 2 foi retirada da referência:

Al-Sheikh M, Moradkhani K., Lopez M., Wajcman H., Préhu C. Disturbance in the HIF-1 α pathway associated with erythrocytosis: Further evidences brought by frameshift and nonsense mutations in the prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) gene. Blood Cells, Molecules, and Diseases 2008; 40(2):160-165.

O consentimento para uso da imagem na tese/dissertação foi obtido por acordo entre Luciana Vaz Moreira e Elsevier Limited, com o Número de Licença 1897970827455.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ACD	anemia da doença crónica
Ang-1	angiopoietina 1
anti-RCC	anticorpo monoclonal anti-human Renal Cell Carcinoma
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium
bp	pares de bases
cDNA	DNA complementar
CIS	cytokine-inducible SH2-domain-containing protein
CRF	insuficiência renal crónica
DIG	digoxigenina
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
EPO	Eritropoietina
EPOR	receptores da eritropoietina
ERKs	<i>extracelullar signal-regulated kinase</i>
ESAs	agentes estimuladores da eritropoiese
FAM	fluoresceína
FGF	factor de crescimento dos fibroblastos
FIH1	factor de inibição do HIF
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Gbr2	<i>growth factor receptor-binding protein 2</i>
GSK-3 β	<i>glycogen synthase kinase-3β</i>
H&E	hematoxilina-eosina
Hb	Hemoglobina
HGSA	Hospital Geral de Santo António
HIF	<i>hypoxia-inducible transcription factor</i>
HO-1	<i>heme oxygenase-1</i>
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HSC	células estaminais hematopoiéticas
IAPs	inibidores das proteínas apoptóticas
iNOS	<i>inducible nitric-oxide synthase</i>
ISH	hibridização <i>in situ</i>

JAK2	Janus Kinase 2
JNKs	<i>Jun N-terminal Kinases</i>
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i> - Microdissecção a Laser
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MB	<i>Molecular Beacon</i>
MCHC	concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	volume corpuscular médio
MMP2	metaloproteinase de matriz 2
mRNA	RNA mensageiro
PAF	Polineuropatia Amiloidótica Familiar
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	polietilenoglicol
PHDs	<i>prolyl-hydroxylase domain proteins</i>
PI-3K	<i>phosphoinositide-3 kinase</i>
pM	peso molecular
PO ₂	pressão de oxigénio
PRCA	aplasia das células vermelhas puras – “pure red cell aplasia”
pVHL	proteína von Hippel–Lindau
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RBC	células vermelhas do sangue
rH-EPO	EPO recombinante humana
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SHP2	<i>Src homology 2-containing tyrosine phosphatase</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOCS	<i>suppressors of cytokine signaling</i>
SOS	<i>son-of-sevenless</i>
STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
t.a.	temperatura ambiente
TTR	transtirretina
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>