REGIANE APARECIDA FERREIRA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO E miRNAS EM RETICULÓCITOS DE PACIENTES COM TALASSEMIA BETA INTERMEDIÁRIA E ANEMIA FALCIFORME

CAMPINAS
2010

REGIANE APARECIDA FERREIRA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO E miRNAS EM RETICULÓCITOS DE PACIENTES COM TALASSEMIA BETA INTERMEDIÁRIA E ANEMIA FALCIFORME

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas para a Obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas

Orientadora: *Dr. Fernando Ferreira Costa*
Coorientadora: *Dra. Dulcinéia Martins de Albuquerque*

CAMPINAS
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ferreira, Regiane Aparecida

F413a Análise do perfil de expressão de fatores de transcrição e miRNAS em reticulócitos de pacientes com talassemia beta intermediária e anemia falciforme / Regiane Aparecida Ferreira. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Fernando Ferreira Costa, Dulcinéia Martins de Albuquerque

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

Título em inglês : Expression of microRNAS and transcription factors in reticulocytes from beta thalassemia intermedia and sickle cell disease patients

Keywords:
- MicroRNAS
- Transcription factors
- Gene expression
- Beta thalassemia
- Sickle cell disease

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:
Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Prof. Dr. Aderson da Silva Araújo
Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli

Data da defesa: 30-08-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Regiane Aparecida Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Membros:

1. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
2. Profª. Drª. Cláudia Vianna Maurer Morelli
3. Prof. Dr. Aderson da Silva Araújo

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2010

DEDICATÓRIA

A Deus, pela presença constante em minha vida;

A São Rafael Arcanjo, pela inspiração e proteção;

Aos meus pais, Benedito e Josefina, pelo amor,

respeito, confiança e apoio;

Aos meus irmãos, Roseli e Rogério, pela amizade,

apoio e otimismo;

Aos meus sobrinho, Mateus e Ana Clara,

pelos sorrisos;

Aos meus amigos de coração, pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fernando Ferreira Costa pela orientação, paciência, atenção e confiança.

A Dra. Dulcinéia Martins de Albuquerque, por me ensinar a biologia molecular, pela amizade que conquistei, pelo apoio, confiança, conselhos e orientação.

Aos membros da minha banca examinadora Dr. Aderson da Silva Araújo e Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli, pelas correções e opiniões que enriqueceram meu trabalho.

À todos os pacientes envolvidos neste trabalho: obrigada por fazerem parte dessa conquista importante da minha trajetória acadêmica.

Ao hospital Hemope – Pernambuco – e ao Marcos André, que gentilmente forneceram subsídios para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Cris, Miguel, "Bebezão" e Lorenna, por estarem comigo em todas as etapas da minha vida, inclusive durante a elaboração do meu trabalho. Obrigada pela diversão nos momentos difíceis.

À Fernandinha, que contribuiu com sua amizade e opiniões importantes que somaram muito em meu trabalho. Vamos continuar juntas em mais uma etapa!

À Carol, Sheley e Dri pela colaboração e ajuda durante meus experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Mariana, Simone Sene (pelo repertório musical), Leninha (por "adocicar" a vida) Andréia, Renata, Camila, Flávia (Boca), Ana Flávia, Maris, Rose, Lediana, Venina, Diana, Angélica, Pedro, Rashmi, Flavinha...obrigada pela amizade e momentos deliciosos de descontração.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

"A única coisa durável é que tudo muda.

As quatro estações se modificam e se transformam continuamente,

uma na outra, e por isso podem cumprir a duração no tempo.

A mutação é a única lei imutável do Universo"

Confúcio

.....

"O primeiro método para estimar a inteligência de um homem

é olhar para aqueles que ele conserva à sua volta"

Niccolò Machiavelli

RESUMO

As variantes de hemoglobina e as Talassemias estão entre as hemoglobinopatias hereditárias mais frequentes no Brasil. A hemoglobina S é resultante de uma mutação de ponto no gene que codifica a cadeia beta da globina e que em homozigose caracteriza a Anemia Falciforme. Outras variantes neste gene podem ocasionar redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias da globina, originando as Talassemias do tipo beta. Recentemente, alguns estudos relacionaram a interação de fatores de transcrição e microRNAs que mediam, em conjunto, mecanismos regulatórios transcricionais e pós transcricionais e promovem a diferenciação, proliferação e maturação de células eritroides. Dessa maneira, alterações no perfil de expressão de fatores transcricionais e de pequenos RNAs podem ocasionar manifestações clínicas envolvidas na eritropoese de pacientes com Talassemia beta intermediária e com Anemia Falciforme. Este trabalho analisou o perfil de expressão dos fatores transcricionais *GATA-1*, *TAL1*, *NFE-2*, LDB1, *SPI-1*, *LMO2* e *EKLF* e dos miRNAs miR24, miR144, miR155, miR210, miR221, miR222, miR223 e miR451 em reticulócitos de 9 pacientes com Talassemia beta intermediária e 8 pacientes com Anemia Falciforme, através da PCR quantitativa em tempo real. Os resultados apresentaram alterações significativas no perfil de expressão dos FTs *GATA-1*, *TAL1* e *NFE-2* em reticulócitos de pacientes com Talassemia beta intermediária. Nos pacientes com Anemia Falciforme, diferenças significativas foram observadas na expressão dos FTs *LMO2* e *EKLF* e dos microRNAs miR221, miR223 e miR451. Em conjunto, nossos resultados sugerem o envolvimento dos fatores de transcrição em associação aos microRNAs como moduladores da manifestação clínica em pacientes com Talassemia e Anemia Falciforme. Trata-se do primeiro estudo que avalia o perfil de expressão de microRNAs e fatores de transcrição relacionados à eritropoese em reticulócitos de pacientes com Anemia Falciforme e Talassemia beta no Brasil.

ABSTRACT

The hemoglobin variants and thalassemias are the most frequent hemoglobinopathies in Brazil. Hemoglobin S results from a point mutation in the gene that encodes the beta globin chain, which is characterized in homozygous sickle cell disease. Other variants of this gene can cause partial or complete reduction of the synthesis of one or more globin chains that result in beta-thalassemias. Recently, some studies have identified the interaction of transcription factors and microRNAs that mediate, together, regulation of transcriptional and post transcriptional mechanisms to promote the differentiation, proliferation and maturation of erythroid cells. Thus, disorders in the transcriptional factors and small RNAs expression can cause clinical manifestations involved in the erythropoiesis of patients with beta thalassemia intermediate and in sickle cell disease. This study analyzed the expression profile of the transcription factors *GATA-1, TAL1, NFE2, LDB1, SPI1, LMO2* and *EKLF* and microRNAs miR24, miR144, miR155, miR210, miR221, miR222, miR223 and miR451, in reticulocytes from 9 patients with beta thalassemia intermediate and 8 patients with sickle cell disease, by real-time quantitative PCR. The results showed significant changes in the expression profiles of the transcription factors, *GATA-1, TAL1* and *NFE-2*, in the reticulocytes of patients with beta thalassemia intermediate. In patients with sickle cell disease, significant differences were observed in the expression of the transcription factors, *LMO2* and *EKLF*, and microRNAs miR221, miR223 and miR451. Together, our results suggest the involvement of transcription factors in association with miRNAs as modulators of the clinical manifestation in patients with beta thalassemia and sickle cell disease. This is the first study that evaluates the gene expression of microRNAs and transcription factors related to erythropoiesis in reticulocytes from patients with sickle cell anemia and beta thalassemia in Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
α	Alfa
β	Beta
β^0	Beta zero
β^+	Beta mais
γ	Gama
ε	Épsilon
ζ	Zeta
AF	Anemia Falciforme
BAC	Gene constitutivo beta actina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DF	Doença falciforme
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EKLF	*Erythroid Kruppel-like factor*
FT	Fator de transcrição

GAPDH	Gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina Fetal
KCL	Cloreto de Potássio
LMO2	*LIM domain only 2 - rhombotin-like*
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	microRNA
NFE-2	*Nuclear factor - erythroid-derived 2*
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
NH_4Cl	Cloreto de amônio
NH_4CO_3	Bicarbonato de amônio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SCF	Stem cell factor
Tm	Temperature Melting
TAL1	*T-cell acute lymphocytic leukemia*

Tal β	Talassemia beta
TβI	Talassemia beta intermediária

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: : miRNAs utilizados para análise do perfil de expressão 50

Tabela 2: Genes utilizados para análise do perfil de expressão.Todas as reações foram padronizadas com a concentração de *primer* 150 nM e apresentaram eficiência ≥99%. 52

Tabela 3: Características dos FTs e resultados obtidos a partir da análise do perfil de expressão em reticulocitos de pacientes com TβI e com AF 70

Tabela 4: Características dos miRNAs e resultados obtidos a partir da análise do perfil de expressão em reticulócitos de pacientes com TβI e com AF 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura tetramérica da molécula de hemoglobina humana. Cada globina está associada a um grupo prostético heme (figura adaptada do *site*: 21

Figura 2: Fisiopatologia da Anemia Falciforme (Adaptado do: Steinberg; Trends Pharm Sci, 2006) A síntese de hemoglobina S é resultado de uma mutação de ponto, que quando desoxigenada forma polímeros no interior das hemácias, deformando-a e tornando-a rígida (formato de foice). As hemácias, neutrófilos e reticulócitos participam do processo de vaso-oclusão, além da hemólise intravascular de hemácias, são eventos que caracterizam a Anemia Falciforme. 24

Figura 3: Esquema sobre a fisiopatologia da tal-β. As cadeias de globina a livres precipitam no organismo danificando os precursores eritroides e ocasionando a eritropoese ineficaz com diminuição da vida média da hemácia (parte direita da figura). Este evento leva à produção de progenitores celulares que ocasiona expansão da medula óssea. Em casos de anemia muito grave, necessita-se de transfusão, situação na qual aumentam os níveis de ferro no organismo e sua absorção, levando às clínicas relacionadas com as tal-β que são geralmente a causa de óbitos dos pacientes. Em casos onde se observa aumento da produção de hemoglobina fetal (lado esquerdo da figura), o paciente apresenta um quadro clínico melhor (Adaptado de Weatherall et al, 2001). 29

Figura 4: Biogênese do miRNA (Adaptado de Tsung-Cheng Chang e Joshua T. Mendell - *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*): pri-miRNAs são transcritos longos que contém *cap 5´* e cauda poli A. A sequência de miRNA contém cerca de 60-80 nucleotídeos e consiste em uma estrutura *hairpin* que é processada pela *Drosha.* A partir dessa estrutura deriva-se o pré-miRNA que é transportado até o citoplasma pela exportina 5 e sofre ação da endonuclease *Dicer.* Uma das fitas do *duplex* é selecionada para compôr o complexo *RISC* (*RNA-induced silencing complex)* e clivar o RNAm alvo ou bloquear a tradução de proteínas. 36

Figura 5: Controle de qualidade da amostra de RNA. Eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2%, mostrando a integridade das amostras de RNA. 47

Figura 6: Controle de qualidade da amostra de cDNA. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto da PCR (640pb) para verificação da transcrição. (M=marcador de peso molecular Ladder 100pb (*Invitrogen, Life Technologies*). 48

Figura 7: Esquema da transcrição reversa utilizando *primer stem-loop*. A ligação desse *primer* é específica para cada miRNA maduro. 51

Figura 8: Mecanismo de amplificação dos miRNAs por qRT-PCR. O miRNA, após o rompimento do *hairpin* formado na transcrição reversa, apresenta fita maior do que a outra. Essa fita, por possuir mais nucleotídeos, faz com que seja possível o anelamento do *primer anti-sense* e a sonda. Devido a atividade 5´-3´exonuclease da enzima *Taq*, o fluorocromo é liberado a cada novo ciclo de amplificação e sua fluorescência é captada por um filtro específico, presente no aparelho. 55

Figura 9: Análise de expressão por qRT-PCR: A-I: Genes incluídos na análise de expressão dos FTs envolvidos na eritropoese; estão representadas nos gráficos a curva de amplificação e de dissociação, respectivamente. **J:** Curva de amplificação para os miRNAs estudados (RNU6B, U47, miR24, miR144, miR155, miR210, miR221, miR222, miR223, miR451). 57

Figura 10: Perfil de expressão dos FTs em reticulócitos de pacientes com TβI. A: *GATA-1* (GATA *binding protein 1)*, B: *TAL1* (*T-cell acute lymphocytic leukemia*), C: NFE-2 *(nuclear factor - erythroid-derived 2)* D: *LDB1* (*Lim domain binding 1)* E: *SPI-1*, F: *LMO2* (*LIM-only protein 2*), G: *EKLF* (*erythroid-kruppel like factor*). Análises estatísticas realizadas pelo teste ANOVA complementado com pós-teste Bonferroni, considerando $p<0,05$. 63

Figura 11: Perfil de expressão dos FTs em reticulócitos de pacientes com AF. A: *GATA-1* (GATA *binding protein 1)*, B: *TAL1* (*T-cell acute lymphocytic leukemia*), C: *NFE-2 (nuclear factor - erythroid-derived 2)* D: *LDB1* (*Lim domain binding 1)* E: *SPI-1*, F: *LMO2* (*LIM-only protein 2*), G: *EKLF* (*erythroid-kruppel like factor*). Análises estatísticas realizadas pelo teste ANOVA complementado com pós-teste Bonferroni, considerando $p<0,05$. 67

Figura 12: Perfil de expressão dos miRNAs em pacientes com TβI. A: miRNA 24. B: miRNA 144. C: miRNA 155 D: miRNA 210 E: miRNA 221 F: miRNA 222

G: miRNA 223 H: miRNA 451. Análises estatísticas por ANOVA e pós-teste de Bonferroni, considerando $p<0,05$. 73

Figura 13: Perfil de expressão de miRNAs em pacientes com AF. A: miRNA 24. B: miRNA 144 C: miRNA 155 D: miRNA 210. E: miRNA 221. F: miRNA 222. G: miRNA 223, H: miRNA 451. Análises estatísticas por ANOVA e pós-teste de Bonferroni, considerando $p<0,05$. 77

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA v
AGRADECIMENTOS vi
RESUMO viii
ABSTRACT ix
LISTA DE ABREVIATURAS x
LISTA DE TABELAS xiii
LISTA DE FIGURAS xiv
SUMÁRIO xvii
1. INTRODUÇÃO 21
1.1. Hemoglobinas humanas 21
1.2. As hemoglobinopatias 22
1.3- Doença Falciforme 22
1.4 - AF e sua fisiopatologia 23
1.4.1-Modulação clínica na AF 25
1.5-Bases moleculares das Síndromes Talassêmicas 26
1.5.1- Talassemia β intermediária (TβI) 27
1.5.2 - Fisiopatologia da Tal-β 28
1.6-Eritropoese a nível transcricional 29
1.6.1- *GATA-1* 30
1.6.2- T-cell acute lymphocytic leukemia (TAL1) e LIM domain only 2 - rhombotin-like (LMO2) 31
1.6.3 - Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) e nuclear factor – erythroid – derived 2 (NFE-2) 32
1.7-A descoberta dos microRNAS (miRNAs) 32
1.7.1 - O que são miRNAs? 34
1.7.2 - Biogênese dos miRNAs 34
1.7.3- miRNAs na eritropoese 37
2. OBJETIVOS 40
3. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS 42

3.1- Aspectos éticos da pesquisa 42
3.2- Pacientes e controles 42
4. MATERIAIS E MÉTODOS 45
4.1- Separação de reticulócitos 45
4.2- Estudos com FTs 46
4.2.1- Extração de RNA 46
4.2.2 - Síntese de DNA complementar (cDNA) 47
4.2.3 - Verificação da síntese de cDNA 48
4.3 – Estudos com miRNA 49
4.3.1- Extração de miRNA 49
4.3.2 - Síntese de cDNA 50
4.4 - PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) 51
4.4.1 – Desenho de *Primer*s para qRT-PCR, Padronização das Reações e Eficiência de Reação 51
4.4.2 – qRT-PCR para estudos com FTs 53
4.4.3 – qRT-PCR para estudos com miRNAs 55
4.4.4 - Análise dos dados da qRT-PCR 58
4.5- Análise estatística 59
5. RESULTADOS 61
5.1. Estudos com FTs 61
5.1.1-Perfil de expressão de FTs em reticulócitos de pacientes com T□I 61
5.1.2-Perfil de expressão de FTs em reticulócitos de pacientes com AF 65
5.1.3-Análise do perfil de expressão de FTs em reticulócitos de pacientes com TβI e com AF 69
5.2- Estudos com miRNAs 71
5.2.1- Perfil de expressão de miRNAs em reticulócitos de pacientes com TβI 71
5.2.2 - Perfil de expressão de miRNAs envolvidos em reticulócitos de pacientes com AF 75
5.2.3 Análise do perfil de expressão de miRNAs em reticulócitos de pacientes com TβI e com AF 79

6. DISCUSSÃO 82
7. CONCLUSÕES 87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89
ANEXOS 99

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemoglobinas humanas

As hemoglobinas (Hb) humanas são proteínas tetraméricas de estrutura globular, com peso molecular de 64.500 daltons, compostas por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias de globina, sendo duas do tipo alfa - α ou ζ - e duas do tipo beta - β, δ, γ ou ε, cada uma delas associada a um grupo prostético heme (Figura 1), que possui um átomo de ferro divalente (Fe^{++}) capaz de se ligar de modo reversível à molécula de oxigênio, transportando-a dos pulmões para os tecidos (Perutz et al., 1960; Bunn e Forget, 1986).

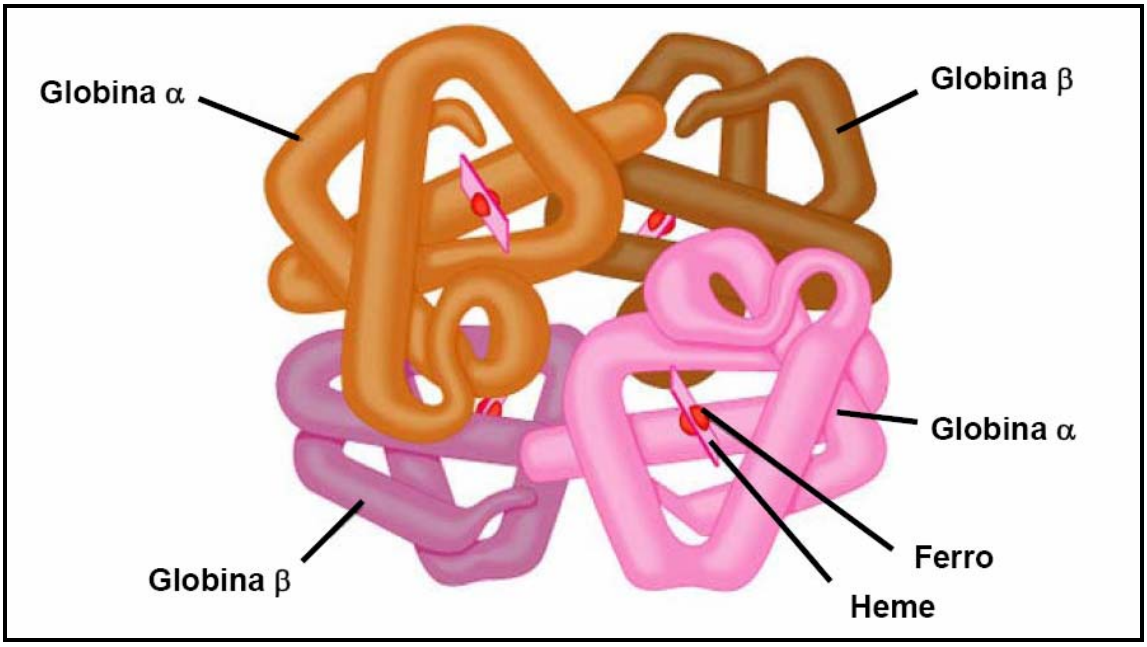


Figura 1: Representação da estrutura tetramérica da molécula de hemoglobina humana. Cada globina está associada a um grupo prostético heme (figura adaptada do *site*: http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/organic.htm).

1.2. As hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas por mutações que afetam genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas (Weatherall & Clegg, 1981). Genericamente, podem ser classificadas em: 1) alterações estruturais, onde ocorre a presença de hemoglobinas estruturalmente anômalas no interior das hemácias, 2) alterações no ritmo de síntese (Talassemias), com a supressão parcial ou total da produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas, ou ainda, 3) em uma anomalia caracterizada pela produção persistente de cadeias γ durante a vida adulta, denominada Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) (Bunn & Forget, 1986; Rochette et al, 1994).

1.3- Doença Falciforme

"Doença Falciforme" (DF) é um termo genérico usado para identificar condições em que a associação da HbS com outra alteração de Hb, estrutural ou talassêmica, leva a um quadro clínico similar ao da Anemia Falciforme (AF). A HbS decorre de uma substituição de base (G**A**G→G**T**G) no sexto códon do gene da globina β (*HBB*), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica (Glu6Val). São exemplos mais comuns de DF: a Doença Falciforme SC, a Talassemia S-β e a hemoglobinopatia SD. Os heterozigotos da HbS (AS) são via de regra, assintomáticos (Serjeant, 2000; Steinberg, 2006).

Estima-se que existam mais de 10.000 portadores de doença falciforme no Brasil e que ocorra o surgimento de 3.500 casos novos anuais da doença que é mais frequente onde a proporção de antepassados negros na população é maior (Região Nordeste, Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais). Nessas regiões, observa-se o surgimento de um novo caso de doença falciforme para cada 1.000 nascimentos (Lobo, 2003).

Brandalise e colaboradores (2004) descreveram a prevalência de 0,02% para a doença falciforme durante o programa de triagem neonatal realizado em Campinas que envolveu 281.884 recém-nascidos. Na avaliação de 1.988 amostras de sangue de cordão umbilical realizada em Fortaleza, encontrou-se que 5,3% dos recém-nascidos apresentaram HbS (Pinheiro, 2006).

1.4 - AF e sua fisiopatologia

A AF é caracterizada pela homozigose da HbS e o evento fundamental na patogenia dessa doença é a polimerização da HbS. A polimerização da desoxi-HbS (única forma passível de se polimerizar) depende de alguns fatores, tais como: concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica e presença de Hbs normais (De Franceschi & Corroche, 2004; Stuart & Nagel, 2004; Costa, 2001). As consequências da polimerização são: deformação, enrijecimento e perda da flexibilidade das células vermelhas, o que resulta em anemia hemolítica, eventos vaso-oclusivos e asplenia funcional, causando um aumento na susceptibilidade a infecções (Kasschau et al., 1996; Fadlon et al., 1998; Rosse et al., 2000). O mecanismo descrito acima pode ser observado na figura 2.

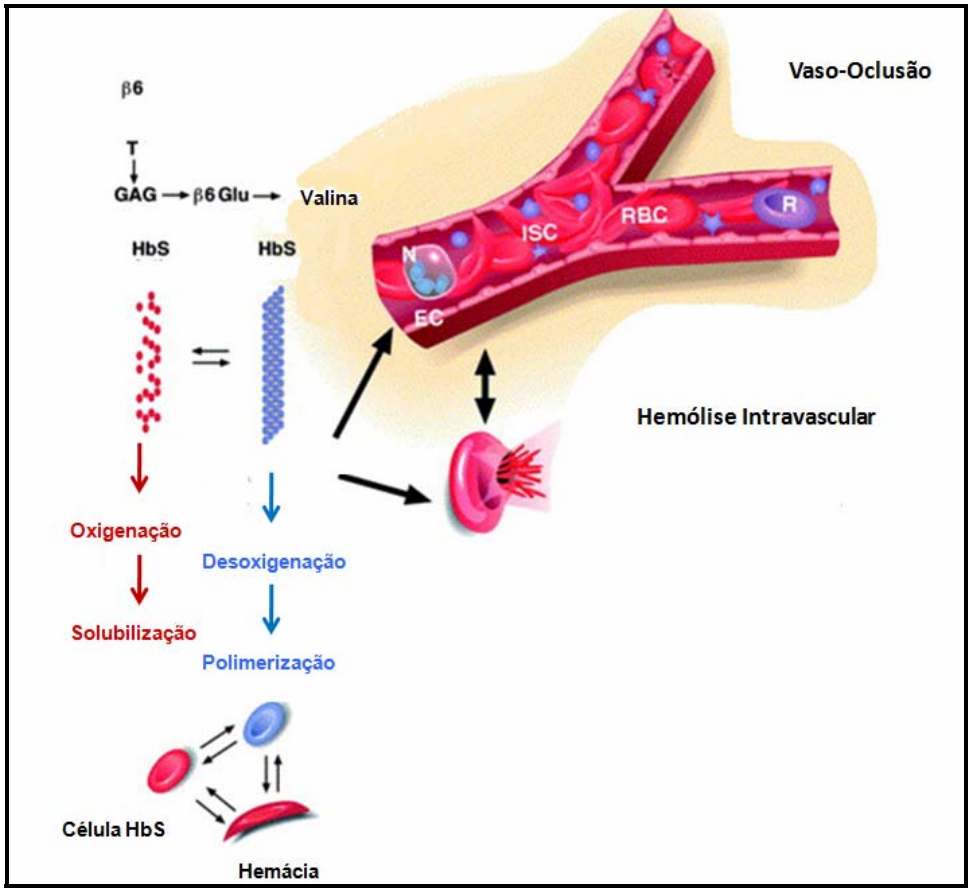


Figura 2: Fisiopatologia da Anemia Falciforme (Adaptado do: Steinberg; Trends Pharm Sci, 2006) A síntese de hemoglobina S é resultado de uma mutação de ponto, que quando desoxigenada forma polímeros no interior das hemácias, deformando-a e tornando-a rígida (formato de foice). As hemácias, neutrófilos e reticulócitos participam do processo de vaso-oclusão, além da hemólise intravascular de hemácias, são eventos que caracterizam a Anemia Falciforme.

Entre outras manifestações clínicas envolvidas na AF pode-se citar: 1) quantidade elevada de HbS no interior da hemácia, favorecendo a polimerização intracelular e consequente falcização, 2) o aumento da viscosidade sanguínea, 3) a adesão de hemácias falcizadas e de leucócitos ao endotélio vascular, 4) a expressão de moléculas de adesão, 5) aumento do número de leucócitos, ativação de monócitos, expressão de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. Portanto, o portador de AF apresenta estado pró-

inflamatório constante (Wang & Lukens, 1999; Costa, 2001; Ohene-Frempong & Steinberg, 2001; Conran et al., 2004; Stuart & Nagel, 2004).

Episódios de acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda (STA), ulceras de perna, sequestro esplênico, alterações pulmonares e oculares, priapismo, retardo no crescimento e desenvolvimento também são manifestações clínicas observadas com frequência (Weatherall & Provan, 2000; Costa, 2001; Stuart & Nagel, 2004).

1.4.1-Modulação clínica na AF

Alguns fatores estão associados à gravidade e evolução clinica dos pacientes com AF, dentre os quais podemos ressaltar os níveis de Hb fetal (HbF), o tipo de haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e a concomitância com a Talassemia α (Steinberg, 2001).

A HbF é um importante modulador clinico da AF. Níveis elevados estão inversamente associados à gravidade clínica da doença. A Hb fetal é uma molécula formada pela combinação de 2 cadeias globínicas α e 2 γ substituindo as cadeias β. Esta combinação inibe a polimerização da Hb e, consequentemente, a falcização dos eritrócitos, reduzindo os sintomas da AF (Serjeant, 2001).

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S são constituídos pela presença de sítios para endonucleases de restrição distribuídos ao longo de genes da globina beta e são classificados em cinco tipos diferentes de acordo com a origem e área geográfica onde predominam. O haplótipo Benin (Ben) está associado à África do Ocidental; o Bantu ou República Centro Africana (CAR) à África Oriental e Centro Sul; haplótipo Senegal (Sen) à África Atlântico Ocidental; o Índia-Arábia Saudita (Saudi) está associado à Índia e Península Arábica Oriental e o Camarões (Cam) à Costa Ocidental Africana (Nagel, 1984; Sutton et al., 1989). O haplótipo Ben está associado a níveis medianos de HbF e curso clínico moderado da doença. O CAR, a níveis diminuídos de HbF e quadro clínico mais grave e os haplótipos Sen e Saudi, associados a níveis elevados de HbF e curso clinico menos grave da doença (Nagel, 1984; Rahgozar et al., 2000).

A associação da AF com a Talassemia-α promove manifestações clínicas menos grave, aumentando a sobrevida dos indivíduos portadores dessas alterações genéticas (Steinberg, 2001).

Além desses fatores, pode-se incluir a região controladora do lócus da globina β (LCR) que corresponde a uma série de sítios de ligações que desempenham um papel importante na expressão específica de genes do grupo da globina β (Steinberg, 1998). Cada um desses sítios contém diferentes combinações de domínios conservados, onde ocorre a ligação de proteínas que influenciam o processo de transcrição. Alterações na sequencia destes domínios podem conduzir a ligações que modificam a expressão desses genes. Entre esses sítios, o HS-2 é o que possui evidencia maior de estar associado aos níveis elevados de HbF descritos em portadores da Anemia Falciforme (Steinberg, 2001).

1.5-Bases moleculares das Síndromes Talassêmicas

As síndromes talassêmicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias em que existe uma redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da Hb. Esta anormalidade, de natureza complexa, ocasiona, em última análise, a supressão total ou parcial da produção de cadeias α nas Talassemias α e de cadeias β nas Talassemias-β (tal-β). Daí advém hemoglobinização deficiente e, consequentemente, microcitose e hipocromia características dessas síndromes. Além disso, a síntese das cadeias não afetadas permanece inalterada provocando acúmulo e formação de agregados instáveis das cadeias não pareadas. A precipitação desses agregados provoca numerosos efeitos deletérios sobre as hemácias ou seus precursores. Essas lesões são as responsáveis pela destruição prematura dos eritroblastos na medula óssea, caracterizando a eritropoese ineficaz comum a essas síndromes, e também pela redução na sobrevida dos eritrócitos na circulação, determinante do quadro hemolítico (Bank, 1978; Weatherall & Clegg, 1981).

As tal-β são um grupo de alterações moleculares causadas por redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias de globina β, levando a uma menor produção de Hb, originando desta forma anemia de graus variados, de característica microcítica e hipocrômica (Weatherall e Clegg, 1981). Mutações no gene da globina β em heterozigose levam, com raras exceções, a uma anemia leve e assintomática denominada tal β menor. Mutações em homozigose, dependendo do grau de impedimento da síntese de globina, podem provocar anemia sintomática moderada (tal β intermediária), que pode exigir transfusões de eritrócitos apenas esporadicamente; ou formas graves (tal β maior) que são

sintomáticas e exigem regime transfusional mensal, na maioria dos casos. Mutações no gene da globina β que suprimem totalmente a síntese são chamadas de beta zero (β°). Mutações em que existe alguma síntese de cadeia de globina β são chamadas de beta mais (β+) (Thein, 1998).

1.5.1- Talassemia β intermediária (TβI)

A Tal-β é clinicamente definida como intermediária, quando se revela como uma anemia crônica moderada com níveis de Hb entre 6 e 9 g/dl, que se mantém espontaneamente sem necessidade transfusional contínua e na presença de esplenomegalia. Geralmente, o início dos sintomas e o reconhecimento da anemia ocorrem mais tardiamente, em geral, após o segundo ano de vida (Weatherall, 1990). Portanto, a definição de TβI subentende um diagnóstico clínico que envolve um amplo espectro de fenótipos em dois extremos, em que se distingue desde formas leves até formas graves. Formas leves podem permanecer assintomáticas e bem toleradas até a idade adulta quando, geralmente, se apresentam com marcada hepatoesplenomegalia e sinais de hiperesplenismo (Ho et al, 1998).

Entre os dois extremos da TβI coloca-se um espectro de quadros clínicos de gravidade variável, que parecem depender basicamente de um mecanismo principal que é a eritropoese ineficaz, que por sua vez é fruto do desequilíbrio da síntese de globinas α e β (Ho et al, 1998).

Baseado nesse pressuposto fisiopatológico há uma tendência imediata em se pensar que um fenótipo intermediário seja ligado a vários genótipos talassêmicos. Nos últimos anos, com aquisição de conhecimentos moleculares, foram feitas várias tentativas de relacionar manifestações clínicas com mutações e outros arranjos moleculares que pudessem de alguma forma, traduzirem-se na expressão do fenótipo (Ho et al, 1998). É o caso de certas mutações leves no gene β globínico (β^{+} ou β^{++}) que se caracterizam por uma menor redução na síntese de globina β levando, consequentemente, a uma menor quantidade de cadeias α livres. Os exemplos que com maior frequência estão relacionados com quadros de TβI são as mutações -101 (C→T), -87 (C→T), -88 (C→T), -29 (A→ G) e a IVS-I-6 (T→C) (Forget, 2001). No estado de Pernambuco, a Talassemia tende a um quadro clínico mais brando devido à predominância da mutação β^{+Leve} IVS-I-6 (T→C),

estudada neste trabalho (Araújo et al., 2003), sendo encontrada em 54,9% dos alelos (Bezerra, 2007).

1.5.2 - Fisiopatologia da Tal-β

As complicações clínicas da TβI são decorrentes de três processos principais: eritropoese ineficaz, anemia crônica e sobrecarga de ferro. A gravidade clínica depende primariamente do defeito molecular no gene β. A diminuição da síntese de cadeias β leva a um desequilíbrio com as cadeias α que são extremamente instáveis e precipitam formando corpos de inclusão. Estas inclusões de cadeias α são responsáveis pela destruição intramedular de precursores de eritrócitos, causando danos na membrana e morte celular que irão caracterizar a eritropoese ineficaz nas Tal-β (Wickramasingle e Hughes, 1980). É importante enfatizar que, quanto menor for o desequilíbrio da síntese das globinas, menor será a taxa de globinas α livres que precipitam dentro da hemácia e, consequentemente, menores serão a taxa de eritropoese ineficaz, o grau de anemia e suas complicações clínicas (Cappellini, 2000).

A eritropoese leva à expansão medular que ocupa a matriz óssea e provoca osteoporose e deformidades ósseas. O *stress* eritropoético a que a medula é constantemente imposta pode determinar compressão por massas eritropoéticas em vários locais, prevalentemente intravertebrais, mas também no fígado ou intra-raqueanas (Cappellini, 2000).

O nível de eritropoese ineficaz é o determinante primário no desenvolvimento da anemia. A anemia crônica leva a um aumento da absorção grastrointestinal de ferro, resultando em sobrecarga de ferro, que pode ser a causa de várias complicações sérias, incluindo cardiopatia como hipertensão arterial pulmonar e anormalidades endócrinas, tais como diabetes mélito e hipogonadismo (Taher et al., 2006) (Figura 3).

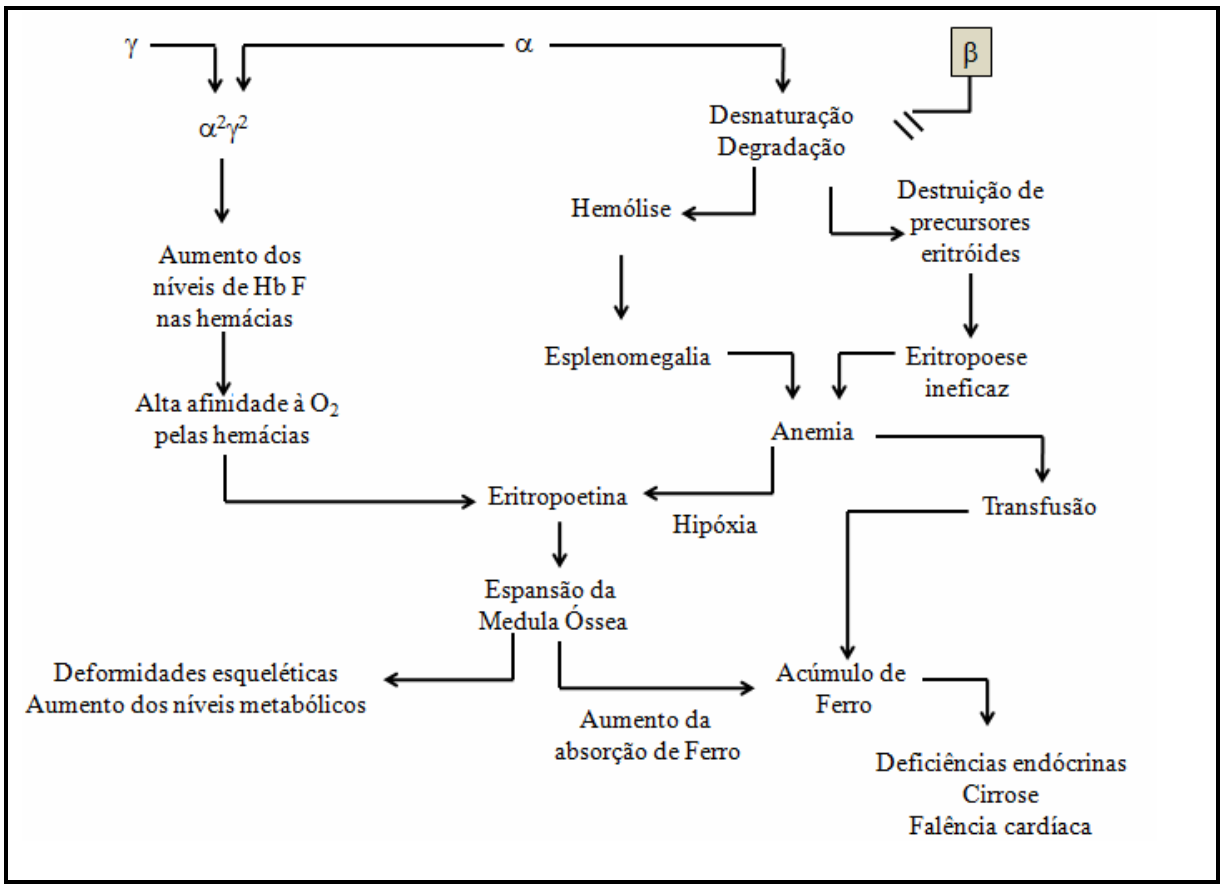


Figura 3: Esquema sobre a fisiopatologia da tal-β. As cadeias de globina a livres precipitam no organismo danificando os precursores eritroides e ocasionando a eritropoese ineficaz com diminuição da vida média da hemácia (parte direita da figura). Este evento leva à produção de progenitores celulares que ocasiona expansão da medula óssea. Em casos de anemia muito grave, necessita-se de transfusão, situação na qual aumentam os níveis de ferro no organismo e sua absorção, levando às clínicas relacionadas com as tal-□ que são geralmente a causa de óbitos dos pacientes. Em casos onde se observa aumento da produção de hemoglobina fetal (lado esquerdo da figura), o paciente apresenta um quadro clínico melhor (Adaptado de Weatherall et al, 2001).

1.6-Eritropoese a nível transcricional

A eritropoese é um processo que exige ação específica de mecanismos moleculares combinados ao microambiente celular que em conjunto são responsáveis por promover a diferenciação de precursores eritroides, proliferação, maturação e apoptose (Cantor & Orkin, 2002).

Durante a diferenciação celular, o perfil de expressão de genes eritroides específicos segue uma programação precisa que é, principalmente, regulada a nível transcricional.

Os fatores de transcrição (FTs) não estão envolvidos apenas na ativação de genes eritroides específicos, mas também no bloqueio da divisão celular e na supressão de multilinhagens transcricionais associadas às células-tronco hematopoéticas. Dessa maneira, os FTs agem como ativadores e repressores durante a diferenciação eritroide (Cantor & Orkin, 2002).

1.6.1- *GATA-1*

GATA-1 desempenha papel fundamental no desenvolvimento eritroide. Foi primeiramente identificado pela habilidade de sua ligação em sequências regulatórias de genes globínicos (Tsai et al., 1989; Evans e Felsenfeld, 1989) e desde então, os motivos GATA ((T/A) GATA (A/G) foram encontrados em praticamente todos os genes eritroides específicos estudados (Orkin, 1992; Weiss e Orkin, 1995).

Este FT contém dois motivos *zinc fingers* conservados, específicos para a família GATA. A porção carboxi-terminal possui afinidade forte de ligação ao DNA enquanto que a porção amino-terminal estabiliza a interação DNA/GATA.

A expressão de *GATA-1* é praticamente restrita à células precursoras do sistema hematopoético que irão definir as linhagens eritroide, megacariocítica, eosinofílica e mastócitos (Tsai et al., 1989, Evans e Felsenfeld, 1989), estando o único sítio de expressão não hematopoético localizado nas células de Sertoli do testículo (Tsai et al., 1989).

Estudos demonstraram a importância de *GATA-1* no comprometimento com a eritropoese através do bloqueio de sua expressão em camundongo. Os resultados apresentaram fortes evidências de seu papel como regulador da diferenciação eritroide, uma vez que células *GATA-1* negativas não apresentaram maturação nessa linhagem (Simon et al., 1992).

As consequências da ausência de *GATA-1* foram melhor definidas em ensaios de proliferação *in vitro,* os quais demonstraram que houve bloqueio da maturação de pro-eritroblastos e consequente apoptose dessas células (Weiss & Orkin, 1995).

A atividade transcricional de *GATA-1* é dependente da interação proteína-proteína incluindo *FOG1, LMO 2, TAL1*, *SPI-1* dentre outras (Cantor & Orkin, 2005). Dessa forma,

a maturação das linhagens eritroides é regulada via cooperação entre GATA1 e seu cofator *FOG1,* que são coexpressos durante o desenvolvimento embrionário e hematopoético e sinergicamente ativam a transcrição a partir de regiões regulatórias hematopoéticas específicas (Tsang et al., 1997; Freson *et al*, 2003; Cantor & Orkin, 2005).

1.6.2- T-cell acute lymphocytic leukemia (TAL1) e LIM domain only 2 - rhombotin-like (LMO2)

TAL1 pertence a uma família de FT caracterizada por possuir duas hélices-α unidas por uma "alça" e está associado à sequências de DNA "CANNTG." Estas sequências são encontradas em elementos *cis*-regulatórios de genes eritroides específicos que estão em conjunto com motivos de ligação *GATA* (Begley et al., 1989; Finger et al., 1989; Chen et al, 2005).

Estudos demonstraram que a deleção deste FT interferiu na diferenciação de todas as linhagens hematopoéticas de camundongos adultos e os embriões acometidos a esse mesmo bloqueio morreram durante a embriogênese, com ausência completa de sangue no saco vitelino. Esse fato indica que *TAL1* desempenha papel importante na hematopoese primitiva (Porcher et al., 1995; Shivdasani et al., 1995; Robb et al., 1995).

LMO2, um fator nuclear "*LIM domain"*, exerce interação importante com *TAL1*. Foi identificado em casos raros de leucemia linfoblástica aguda e é um importante regulador do desenvolvimento de células tronco eritropoéticas, sendo parte integrante do complexo transcricional multimérico que inclui *GATA-1*, *TAL1* e LDB1 (Hasson et al, 2007).

Estudos realizados por Warren e Rabbitts demonstraram que o bloqueio de *LMO2* causou a morte de embriões de camundongos durante a mesma fase gestacional, devido à ausência de eritrócitos e consequente anemia grave.

A semelhança entre os fenótipos de *TAL1* e *LMO2* sugerem que a interação física entre estas proteínas é fisiológica e que atuam pela mesma via de regulação gênica. Juntos, estes FTs podem controlar ou estabelecer uma programação genética que favorece a diferenciação de precursores eritroides (Hasson et al., 2007).

1.6.3 - Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) e nuclear factor – erythroid – derived 2 (NFE-2)

A sequência de nucleotídeos CACCC é um dos motivos *cis*-regulatórios mais críticos para a transcrição de genes eritroides, incluindo os das globinas. Assim como outros elementos regulatórios, a compreensão da ativação da transcrição mediada por este motivo é bastante complexa uma vez que múltiplas proteínas estão envolvidas nesse processo, dentre elas o FT *EKLF*.

Experimentos *in vitro* demonstraram que este FT se liga preferencialmente ao sítio CACCC do promotor do gene da globina β humana e mutações nessa sequência foram associadas à manifestação de tal-β (Orkin et al., 1992).

Outros estudos mostraram que camundongos nocauteados para este FT apresentaram anemia grave durante o estágio de desenvolvimento do fígado fetal, devido à falha da ativação do gene da globina β e, além disso, foi observado que esses camundongos apresentaram níveis reduzidos de globina β em contraste a níveis elevados de globina γ. Dessa maneira, estes experimentos sugerem que *EKLF* é indispensável na hematopoese primitiva por favorecer a proliferação de precursores eritroides além de participar do *switch* da HbF para Hb adulta (HbA) (Perkins et al., 1996).

Outra proteína envolvida na ativação da transcrição de genes eritroides é *NFE-2*, um membro da família proteica denominada *leucine zipper* que tem a capacidade de se ligar à região *cis*-regulatória CACCC. É composto pelas subunidades proteicas hematopoéticas p45 e p18 (Perkins et al., 1996).

1.7-A descoberta dos microRNAS (miRNAs)

A descoberta da regulação gênica mediada pelos miRNAs derivou-se da análise de fenótipos particulares de um nemátodo conhecido como *Caenorhabditis elegans*. No início de 1990, Ambros e Ruvkun estudavam uma mutação que causava sérios problemas no desenvolvimento do *C. elegans* e acabaram descobrindo que o gene mutado, *lin-4,* curiosamente não codificava nenhuma proteína. Além disso, era expresso na forma de um RNA minúsculo que se ligava especificamente a um RNA mensageiro (RNAm), bloqueando a tradução de proteínas (Lee et al., 2003).

O segundo miRNA descoberto novamente em *C. elegans* no ano 2000 apareceu bloqueando a produção de pelo menos cinco proteínas. Em pouco tempo descobriu-se que a técnica de interferência de RNA (RNAi) é justamente a característica que os miRNAs possuem para o silenciamento da tradução de proteínas (Fire et al. 1998).

Até agora foram descritas 940 sequências de miRNAs humanos e 590 sequências de miRNAs de camundongos, além de várias outras espécies (*Browse* miRbase, versão 15); a maioria delas permanecem conservadas entre as espécies relacionadas, o que significa que podem dirigir processos essenciais no desenvolvimento e manutenção do organismo (Lee et al., 2003).

1.7.1 - O que são miRNAs?

Os miRNAs são moléculas de RNA fita simples com um tamanho aproximado de 19-25 nucleotídeos gerados a partir de um precursor de 60-80 nucleotídeos com estrutura *hairpin* (Kim, 2005). Atua regulando de forma negativa a expressão de genes a nível pós transcricional ao se ligar em regiões 3'- UTR complementares no RNAm alvo. Dependendo do grau de complementaridade entre o miRNA e o RNAm, o silenciamento gênico poderá ocorrer pela degradação do RNAm ou inibindo a tradução da proteína. A regulação da expressão pelo miRNA é um fenômeno frequente e natural que envolve centenas ou milhares de genes em uma via complexa de regulação, por exemplo, um único miRNA pode se ligar e regular muitos RNAm alvos diferentes. De forma contrária, vários miRNAs diferentes podem se ligar a um único alvo e regular de forma cooperativa (Lewis & Shih, 2003).

1.7.2 - Biogênese dos miRNAs

Estudos revelam que 70% dos miRNAs estão localizados em introns ou exons e os 30% restantes encontram-se em regiões intergênicas. Os miRNAs humanos estão em sua maioria localizados em introns e são transcritos pela RNA polimerase II que dará origem a miRNA primários (pri-miRNAs) que contém *cap 5´* e cauda poli-A e com centenas de quilobases de comprimento (Lee & Ambros, 2001).

Os miRNAs maduros, por sua vez, se originam a partir de regiões de pri-miRNAs que se "dobram" sobre si mesmas para formar estruturas *haripin de* aproximadamente 60 a 80 nucleotídeos. Esta estrutura é clivada ainda no núcleo pela RNase III, *Drosha,* e seu cofator DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*), gerando o pré-miRNA, que contém aproximadamente 22 pares de bases e um fosfato em sua extremidade 5´ mais 2 nucleotídeos protundentes na extremidade 3´. Estas características estruturais favorecem o reconhecimento da *exportina 5* (Exp5) uma proteína de exportação nuclear que utiliza Ran-GTP como cofator (Bohnsack et al., 2004; Yi et al, 2003).

Após ser transportado para o citoplasma, o pré-miRNA tem seu componente *hairpin* removido pela endonuclease *RNA Dicer*, originando o miRNA maduro, uma estrutura *duplex* de RNA que contém de 18 a miR24 nucleotídeos (Grishok et al, 2001; Hutvagner et al, 2001; Ketting et al, 2001). Uma vez processado, o *duplex* pré-miRNA é incorporado no

complexo proteico *RNA-induced silencing complex* (*RISC*), que tem como componente nuclear as proteínas argonautas. Estas proteínas são responsáveis por mediar a interação "miRNA/*RISC"* e durante esse processo, uma das fitas do *duplex* é selecionada para permanecer estável no *RISC* enquanto a outra é rapidamente degradada e removida. Estudos para determinar qual das fitas é incorporada ao *RISC* demonstraram que geralmente é aquela que possui o terminal 5´ com pareamento de bases mais instável (Yi et al, 2003).

Por sua vez, o complexo *RISC* realiza o silenciamento gênico através de dois mecanismos principais: clivagem do RNAm ou bloqueio da tradução de proteínas (Yi et al, 2003). Em plantas o anelamento do miRNA ao RNAm alvo é completo, o que resulta na clivagem do RNAm. No entanto, os miRNAs presentes na maioria dos vertebrados, incluindo humanos, geralmente se anelam de maneira incompleta à sítios de RNAm e reprimem a tradução de proteínas (Bagga et al., 2005) (Figura 4).

Alguns estudos indicam que um miRNA possa regular 200 RNAs apresentando funções totalmente diferentes e dessa forma, constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular. Experimentos *in vitro* mostram que os miRNAs regulam uma diversidade de processos celulares incluindo diferenciação, desenvolvimento, apoptose, oncogênese e metabolismo, podendo ainda ser associados a FTs (Zhou et al., 2007).

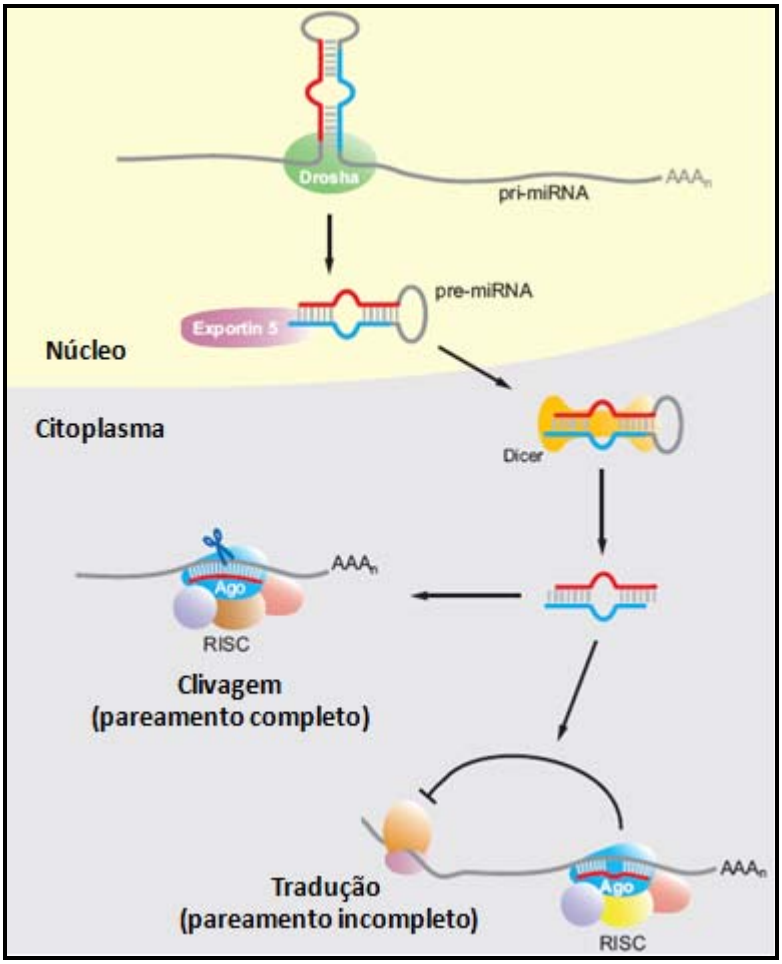


Figura 4: Biogênese do miRNA (Adaptado de Tsung-Cheng Chang e Joshua T. Mendell - *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*): pri-miRNAs são transcritos longos que contém *cap 5´* e cauda poli A. A sequência de miRNA contém cerca de 60-80 nucleotídeos e consiste em uma estrutura *hairpin* que é processada pela *Drosha.* A partir dessa estrutura deriva-se o pré-miRNA que é transportado até o citoplasma pela exportina 5 e sofre ação da endonuclease *Dicer.* Uma das fitas do *duplex* é selecionada para compôr o complexo *RISC* (*RNA-induced silencing complex)* e clivar o RNAm alvo ou bloquear a tradução de proteínas.

1.7.3- miRNAs na eritropoese

As possíveis funções dos miRNAs na eritropoese ainda não estão estabelecidas e vários estudos revelaram que precursores eritroides contém múltiplos miRNAs cuja expressão se altera durante a diferenciação e maturação (Zhou et al., 2007).

Dentre os miRNAs identificados por participarem efetivamente da eritropoese estão miR221 e miR222. Os níveis de expressão destes miRNAs diminuem durante os estágios de diferenciação eritroide e provocam a indução da proteína *c-Kit*, um receptor do tipo tirosina kinase para a citocina *stem cell factor* (SCF). Essa sinalização resulta na proliferação e na maturação de precursores eritroides (Masaki et al., 2007). O miR223 está envolvido na regulação das células de linhagem granulocítica. No entanto, a função deste miRNA não se restringe apenas a esta linhagem já que está associado aos miR221 e miR222 durante o estágio terminal do desenvolvimento eritropoético. Estudos demonstraram que a expressão aumentada de miR223 inibe a maturação de células $CD34^+$ e ainda pode atuar em conjunto com o FT *LMO2* (Felli et al., 2009).

O miR155 pode atuar na eritropoese bloqueando a diferenciação de células progenitoras imaturas para um estágio mais maduro de desenvolvimento, quando superexpresso (Masaki em 2007, Lawrie, 2007). Em 2008, Wang e colaboradores reportaram que o miR24 pode inibir a diferenciação eritroide de células K562 além de bloquear a maturação de células $CD34^{+,}$ devido à ligação deste miRNA ao receptor humano *ALK4*, uma importante proteína transmembrana responsável por modular a proliferação e diferenciação eritroide, promovida a partir do aumento do número de colônias de células eritroides. Neste estudo foi demonstrado que o miR24 pode promover a diminuição da expressão deste receptor ao se ligar à região 3' não traduzida do RNAm, interferindo na atividade sinalizadora do *ALK4*. O miR144 e miR451 atuam como principais ligantes do FT *GATA-1* e seu cofator *FOG1* e consequentemente participam da regulação eritroide, promovendo, em conjunto, a maturação celular (Dore et al., 2008).

A maior parte dos miRNAs descritos foram previamente analisados em precursores eritroides, porém, alguns estudos demonstram que muitos deles estão presentes de maneira funcional em reticulócitos e eritrócitos. No entanto, a função destes pequenos RNAs nestas células permanece desconhecida, embora haja especulações de que alguns miRNAs possam promover proteção tecidual contra patógenos (Valadi et al., 2007). Além disso, algumas

descrevem que durante a fagocitose de eritrócitos promovida por macrófagos, pode ocorrer transferência de miRNAs funcionais para o interior das células fagocitárias através das microvesículas que promovem endocitose (Yuan, et al., 2009; Bruchova et al., 2008). Contudo, afirma-se que os miRNAs podem regular a eritropoese de maneira independente através de mecanismos ainda desconhecidos.

Diante de todos os dados apresentados, consideramos importante estudar o perfil de expressão de alguns FTs e miRNAs que foram descritos por mediar efetivamente a regulação da eritropoese. Desse modo, intencionamos avaliar o perfil de expressão dessas moléculas em reticulócitos de pacientes com TβI e com AF, abrindo maiores perspectivas para o entendimento sobre mecanismos moleculares que podem determinar a manifestação dessas doenças.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

1. Avaliar o perfil de expressão dos FTs *GATA-1, TAL1, NFE-2, LDB1, SPI-1, LMO2 e EKLF* em reticulócitos de pacientes com TβI e AF;

2. Avaliar o perfil de expressão dos miRNAs miR24, miR144, miR155, miR210, miR221, miR222, miR233 e miR451 em reticulócitos de pacientes com TβI e AF;

3. Relacionar os dados de expressão com o grupo controle composto por indivíduos com níveis hematimétricos normais (grupo controle 1) e com o grupo controle composto por pacientes com esferocitose hereditária (grupo controle 2).

3. Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS

3.1- Aspectos éticos da pesquisa

Conforme determinações estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96 e 251/97), o presente projeto foi submetido à apreciação pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (sob registro n° 942/2007) e da Fundação Hemope (sob registro n° 245/2008) que aprovaram, sem restrições, o protocolo de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido, bem como todos os anexos incluídos no trabalho.

3.2- Pacientes e controles

Para o estudo realizado foram selecionados pacientes com AF (SS) utilizando métodos de eletroforese de Hb e cromatografia líquida de alta pressão HPLC (VARIANT^{TM}; Bio-Rad Laboratoryes, Hercules, CA, USA) e pacientes TβI homozigotos para a mutação IVS-I-6 (T → C), classificados segundo os procedimentos recomendados internacionalmente (*Guidelines for the Clinical Management of Thalassemia – Thalassemia International Federation, 2000*), diagnosticados e acompanhados no Hospital HEMOPE – Pernambuco.

Estes pacientes apresentavam idade entre 18-60 anos, encontravam-se em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatórios, sem transfusão sanguínea por pelo menos três meses e sem crises de dor por este mesmo período e sem terapia com hidroxiuréia.

As amostras de sangue periférico dos pacientes com idade superior a 18 anos e que estavam em fase estável da doença, na ausência de infecção ou processos inflamatórios, sem medicamentos que interferissem na pesquisa e sem transfusão prévia por pelo menos 3 meses, foram incluídas.

Os grupos controle consistiram em indivíduos com valores hematimétricos normais **(Grupo Controle 1)** composto por doadores voluntários de sangue do Hospital HEMOPE, com a mesma faixa etária. Também foram selecionados 5 pacientes com esferocitose hereditária, **(Grupo Controle 2)** diagnosticados no Hemocentro da UNICAMP, por não apresentarem qualquer tipo de alteração estrutural da molécula de Hb além de apresentarem níveis altos de reticulócitos.

Todos os participantes deste estudo leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo CEP (Comitê de Estudo e Pesquisa) e cujo conteúdo descreve os propósitos deste projeto.

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Separação de reticulócitos

A separação de reticulócitos foi realizada como descrito pelo protocolo do "*The New York Blood Center*". O sangue foi submetido à separação de soros dos elementos figurados do sangue (células brancas e células vermelhas) por centrifugação em tubos falcon de 50 mL por 10 minutos à 3000 rpm. O soro foi descartado e as hemácias foram lisadas durante 30 minutos sob agitação em tampão (5 volumes de 0,144M NH_4Cl – cloreto de amônio - e 0,5 volumes de 0.011M NH_4HCO_3 - bicarbonato de amônio), mantido em gelo. Após a lise das hemácias, o conteúdo foi submetido à centrifugação por 10 minutos à 3000 rpm em temperatura de 4°C.

O sobrenadante contendo hemácias lisadas e reticulócitos foi recuperado e submetido a gradiente em 1/10 Sacarose/KCL por centrifugação à 5000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, as hemácias precipitadas foram descartadas e o sobrenadante tratado com 700 ul de ácido acético 10% gelado para precipitação dos reticulócitos em centrifugação à 5000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente.

O pellet de reticulócitos foi ressuspendido em 1-2 mL de Trizol (*Invitrogen, Life Technologies*) para a extração de RNA e miRNA para posteriormente serem transcritos em cDNA.

4.2- Estudos com FTs

4.2.1- Extração de RNA

O RNA das amostras dos pacientes e indivíduos controle foi extraído pelo método de extração com o reagente Trizol (*Invitrogen, Life Technologies*), uma solução monofásica de fenol e guanidina isocianato. Durante a homogeneização, o reagente Trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares.

A solução de Trizol foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Acrescentou-se às amostras homogeneizadas 200 μL de clorofórmio ($CHCL_3$) que foram em seguida agitadas vigorosamente. Nova incubação foi realizada por mais 5 minutos à temperatura ambiente e, então, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 135000 rpm, em temperatura de 4°C. A fase orgânica, onde fica o RNA, foi recuperada, transferida para um novo tubo e procedeu-se a precipitação do RNA por adição de 500 ul de Isopropanol gelado, incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 13500 rpm por 10 minutos, em temperatura de 4°C. Após a precipitação, o "pellet de RNA" foi lavado com Etanol 70% para remoção do excesso de sal e, novamente centrifugado, agora à 11500 rpm por 5 minutos, em temperatura de 4°C.

As amostras de RNA foram ressuspendidas em água com dietilpirocarbonato (DEPC) e incubadas por 10 minutos à 55°C e 2 horas em gelo, para completa solubilização do RNA. Foram realizadas quantificações através de leitura da densidade ótica em espectofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e a integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1,2%. Após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas em freezer -80°C. Figura 5.

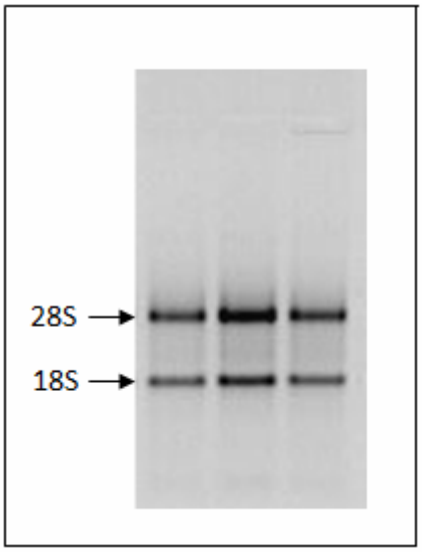


Figura 5: Controle de qualidade da amostra de RNA. Eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2%, mostrando a integridade das amostras de RNA.

4.2.2 - Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada a partir de aproximadamente 1 μg de RNA de pacientes e controle por meio da enzima Superscript III RT^{TM} (*Invitrogen, Life Technologies*). As amostras de RNA foram tratadas com DNaseI por 20 minutos em temperatura ambiente, para remoção de qualquer DNA contaminante. A reação foi interrompida com a adição de EDTA, composto quelante de Mg^{++} – cofator necessário para a atividade de DNase – por aquecimento à 65°C por 5 minutos.

Procedeu-se a adição de dNTPs necessários para a formação da fita a ser sintetizada e do oligodT, que se ligará à região poli-A do RNA mensageiro servindo de ancorador para que a *Transcriptase Reversa* possa fazer a síntese de cadeia de cDNA. A reação foi incubada por 50 minutos à 42°C, temperatura ótima para a atividade da enzima; logo em seguida, uma nova incubação foi realizada à 70°C para inativação da mesma.

4.2.3 - Verificação da síntese de cDNA

A verificação da síntese de cDNA foi feita através da reação de polimerase em cadeia (PCR) para o gene da beta-actina (β-actina). As reações de PCR foram realizadas com: 5,0 µL de 10xPCR *buffer* (20 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µL de 50 mM MgCl2, 1,0 µL de 10 mM dNTP's, 1,0 µL de 10 mM de *primer* BAC_F (5' – AAGAGATGGCCACGGCTGCT – 3'), 1,0 µL de 10 mM de *primer* BAC_R (5' – TCGCTCCAACCGACTGCTGT – 3'), 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 1,0 ul de cDNA e 39,0 µL de água, para um volume final de 50,0 µL. O programa foi iniciado por 2 minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C/30 segundos, 58°C/45 segundos e 72°C/40 segundos, sendo finalizado por 72°C/7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificar a amplificação de um fragmento de 640 pares de base (pb), expostos na figura 6.

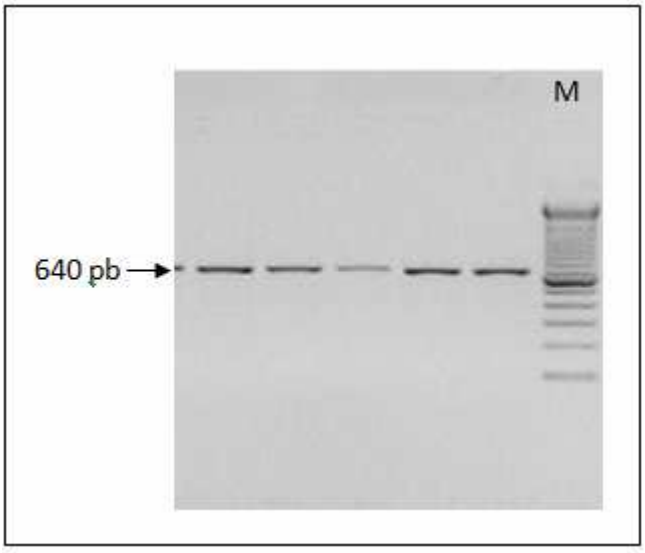


Figura 6: Controle de qualidade da amostra de cDNA. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto da PCR (640pb) para verificação da transcrição. (M=marcador de peso molecular Ladder 100pb (*Invitrogen, Life Technologies*).

4.3 – Estudos com miRNA

4.3.1- Extração de miRNA

As amostras de miRNA foram extraídas com kit comercial - mirVana™ miRNA Isolation Kit *(Invitrogen, Life Technologies).*

Ao pellet de reticulócitos ressuspendidos em Trizol (*Invitrogen, Life Technologies*) foi adicionado 1/10 do volume de *miRNA Homogenate Additive* e os tubos foram agitados várias vezes por inversão. Adicionou-se, em seguida, 500 μL de ácido Fenol Clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 5 minutos na velocidade de 10.000 rpm à temperatura ambiente. Depois da centrifugação, a interfase estava compacta e o volume da fase aquosa foi retirado e transferido para um novo tubo. Adicionou-se 1,25 do volume do pellet de etanol 100% à fase aquosa e essa mistura foi depositada dentro da coluna de extração. Centrifugou-se por 30 segundos a 15.000 rpm e o filtrado foi descartado. Nesse momento, os miRNAs ficam retidos na membrana da coluna. Procedeu-se, então, com as etapas de lavagem da membrana: adicionou-se 700 μL da solução *1 miRNA wash* no tubo contendo a coluna e os miRNAs e posteriormente, centrifugou-se durante 15 segundos a 10.000 rpm. O filtrado foi novamente descartado. Em seguida, foram adicionados 500 μL da solução *2/3 wash solution* e centrifugou-se durante 15 segundos a 10.000 rpm. Este procedimento foi repetido e a coluna contendo os miRNAs foi depositada em um novo tubo de coleta, onde foram adicionados 30 μL da solução de ressuspensão pré-aquecida à 95°C. Após centrifugação por 15 segundos à 10.000 rpm, o pellet de miRNA foi estocado a -80°C.

Tabela 1: : miRNAs utilizados para análise do perfil de expressão

miRNAs	Sequência do miRNA maduro
miR24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
miR144	UACAGUAUAGAUGAUGUACU
miR155	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
miR210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
miR221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
miR222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
miR223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
miR451	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU

Fonte: http://www.mirbase.org

4.3.2 - Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada através de reações de transcrição reversa utilizando o kit *TaqMan®* miRNA *assay* (*Invitrogen, Life Technologies*).

O método baseia-se na utilização de um *primer* com estrutura do tipo *stem-loop* para realização da Real Time PCR. O *stem-loop* do *primer* é específico para o miRNA maduro e resulta um amplicon maior através da extensão da extremidade 5´ do miRNA. A figura 7 exemplifica a síntese de cDNA através da ligação do *primer stem-loop*.

As reações de transcrição foram realizadas com: 0,15 μL de dNTPs 10mM, 1,0 μL de Multiscribe RT, 1,5 μL de Buffer 10x, 0,19 μL de RNAse, 1,0 μL de amostra de miRNA (1-10 ng) e 3,0 μL de *primer stem-loop*. Realizamos 3 reações de transcrição para cada amostra, pipetando 4 *primers stem-loop* no primeiro tubo 4 no segundo e 2 no terceiro tubo, todos eles somando 15 μL de volume final.

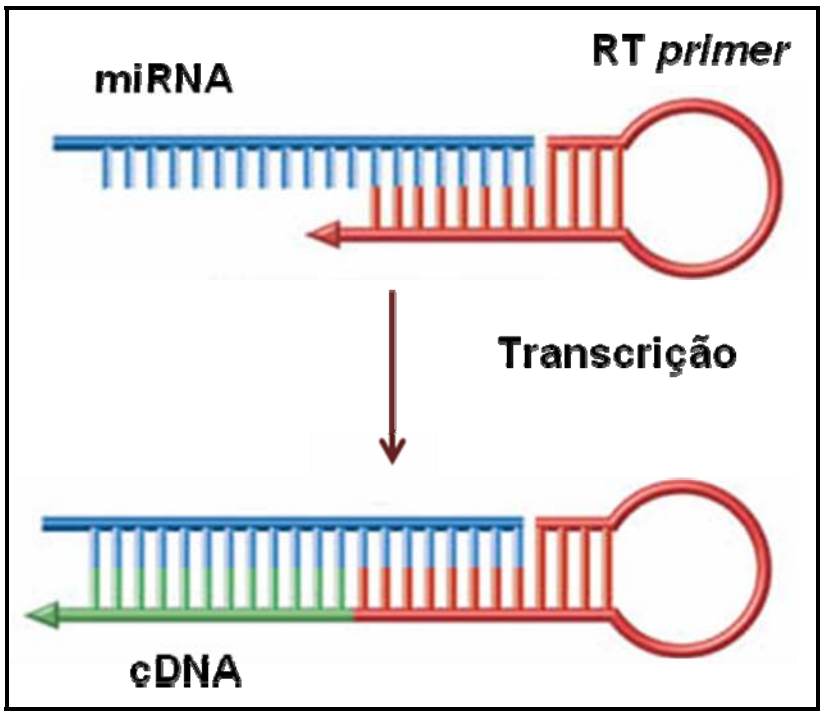


Figura 7: Esquema da transcrição reversa utilizando *primer stem-loop*. A ligação desse *primer* é específica para cada miRNA maduro.

4.4 - PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

4.4.1 – Desenho de *Primer*s para qRT-PCR, Padronização das Reações e Eficiência de Reação

As sequências do RNA mensageiro dos FTs envolvidos na eritropoese foram obtidas do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Com o auxílio do *software* "*Primer Express*" (*Invitrogen, Life Technologie*s), os *primers* foram desenhados, sempre que possível, em exons diferentes, com produto de amplificação entre 60 e 150pb e temperatura de anelamento de 60ºC. Posteriormente as sequências selecionadas foram submetidas aos programas: *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmação de homologia com o gene de interesse, e *Gene Runner*, para avaliação da gravidade das estruturas formadas (*hairpins, dimers, etc)* (Tabela 1).

Tabela 2: Genes utilizados para análise do perfil de expressão.Todas as reações foram padronizadas com a concentração de *primer* 150 nM e apresentaram eficiência ≥99%.

FTs	Sequência	Tamanho pb	TM
BAC	F = 5′-AGGCCAACCGCGAGAAG-3′ R = 5′-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3′	79 pb	82
GAPDH	F = 5-GCACCTCAAGGCTGAGAAC-3′ R = 5′-CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3′	89 pb	81
SPI-1	F = 5′-CCCCTATCTCAGCAGTGATGG-3′ R = 5′-AACTCGCTGTGCACGTGGT-3′	78 pb	84
LMO2	F = 5′-GCGGCGCCTCTACACAAAC-3′ R = 5′-GAGACCGTCTTGCCCAAAAA-3′	76 pb	84
LDB1	F = 5′-GGCTGTCCAATTCCACTCTCA-3′ R = 5′-GTAGGTCTTGTGGCGTGACATG-3′	86 pb	82
TAL1	F = 5′-TTCACCACCAACAATCGAGTG-3′ R = 5′-AAGATACGCCGCACAACTTTG-3′	92 pb	81
GATA-1	F = 5′-CTACTACAGGGACGCTGAGG-3′ R = 5′- CCCCGTCTTGCCGTAGG-3′	79 pb	83
NFE-2	F = 5′-ATGGAACTGACTTGGCAGGAGA-3′ R = 5′-GGGCTCAAATGATGGCTCA-3′	80 pb	82
EKLF	F = 5′-TGCGGCAAGAGCTACACCA-3′ R = 5′-GCAGGCGGTATGGCTGCTCC-3′	86 pb	85

A padronização da reação para qRT-PCR seguiu o protocolo preconizado no Laboratório de Hemoglobina e Genoma, que considera a concentração ideal de *primer* a ser utilizada a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a

cada ciclo de reação. Dessa forma, utilizando uma determinada concentração de amostra, foram realizadas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 150nM, 300nM, 600nM, sendo selecionada a condição de reação em que o gene alvo foi amplificado foi mais precocemente (menor valor de Ct – "*cycle threshold*").

A confiabilidade e reprodutibilidade da PCR em tempo real estão diretamente relacionadas com a eficiência de reação. Assim, uma reação é realizada utilizando a concentração de *primer* selecionada e diluições seriadas de uma amostra, obtendo-se uma curva cujo valor da inclinação (*slope)* é aplicado à fórmula $[10^{(-1/slope)} -1]X100 = 100\%$, resultando no valor percentual de eficiência de reação.

4.4.2 – qRT-PCR para estudos com FTs

As reações foram feitas em duplicatas utilizando como sistema de detecção o reagente SYBR^{TM} Green PCR Master Mix® (*Invitrogen, Life Technologie*s), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, $MgCl_2$, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBR Green; uma molécula que emite maior quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla fita. Para cada gene analisado foram utilizados *primers* específicos.

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *Step One Plus* (*Invitrogen, Life Technologie*s) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. Quanto maior a expressão de um determinado gene, isto é, quanto mais cópias existirem dele no início da reação, mais precocemente ocorrerá a amplificação e consequentemente, menor será o Ct.

A análise de expressão foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores foram normalizados em relação aos "controles endógenos": genes β-actina *e GAPDH*.

Todas as amostras foram ensaiadas em 12 μL de volume final; sendo 6,0 μL do reagente SYBR Green PCR Master Mix 1x®, 3,0 μL de mix de amostra de cDNA (5 ng/ μL de concentração final) e 3,0 μL mix do *primer* (150nM). Em todas as placas foram pipetados controles negativos (NTC), ou seja, para cada *primer* avaliado foram feitos poços contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram realizadas em placas de

96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem da luz. O programa foi iniciado a 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto. Adiciona-se um passo de 20 minutos, no qual a temperatura aumenta gradualmente de 60° para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento de temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de Tm (temperatura de *melting*) entre os produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada produto.

Na figura 9 estão apresentadas as representações gráficas dos resultados obtidos na qRTCR (para os FTs: A-I). A curva de amplificação é dada pela emissão do sinal fluorescente versus o número de ciclos na reação; quanto maior a fluorescência, maior o produto de PCR acumulado. Dessa maneira, o valor utilizado para o cálculo da expressão (Ct) é derivado da intersecção do *threshold* (limiar de detecção estabelecido pelo usuário, na fase exponencial da reação) com a curva de amplificação. O gráfico resultante da curva de dissociação permite a verificação de produtos inespecíficos e formação de estruturas como *primer dimer*, de acordo com a temperatura de *melting* (TM) do produto gerado.

4.4.3 – qRT-PCR para estudos com miRNAs

As reações foram feitas em duplicatas utilizando como sistema de detecção o sistema *TaqMan®* MiRNA *assay* (*Invitrogen, Life Technologies*) que utiliza uma sonda para determinar sequencias específicas nos fragmentos amplificados pela PCR. Essa sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz). Durante a qRT-PCR a sonda TaqMan hibridiza com a sequencia da fita simples complementar e ocorre a amplificação. No processo de amplificação, a sonda é degradada devido à atividade exonuclease 5´ - 3´da *TaqDNA polimerase,* separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta o aumento da intensidade da fluorescência que é captada pelo aparelho (Holland et al, 1991). O mecanismo de amplificação dos miRNAs por qRT-PCR está representado na figura 8.

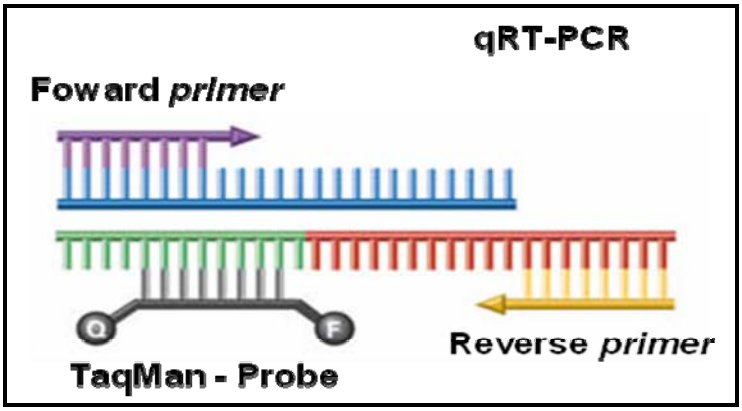


Figura 8: Mecanismo de amplificação dos miRNAs por qRT-PCR. O miRNA, após o rompimento do *hairpin* formado na transcrição reversa, apresenta fita maior do que a outra. Essa fita, por possuir mais nucleotídeos, faz com que seja possível o anelamento do *primer anti-sense* e a sonda. Devido a atividade 5´- 3´exonuclease da enzima *Taq*, o fluorocromo é liberado a cada novo ciclo de amplificação e sua fluorescência é captada por um filtro específico, presente no aparelho.

Todas as amostras foram ensaiadas em 12 μL de volume final, sendo 6,0 μL do reagente *TaqMan 2x universal PCR MasterMix*, 3,0 μL mix da amostra de cDNA (5,0 ng/ μL de concentração final) e 3,0 μL mix *TaqMan*^{TM} *MiRNA assay*. Em todas as placas foram pipetados controles negativos (NTC). As reações foram realizadas em placas de 96 poços e o programa foi iniciado a 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto.

Como o sistema de detecção por sondas *TaqMan* não permite a análise da Tm – devido à especificidade da sonda – ao final da reação, pode-se analisar a curva de amplificação gerada pela emissão de fluorescência (Figura 9 - J).

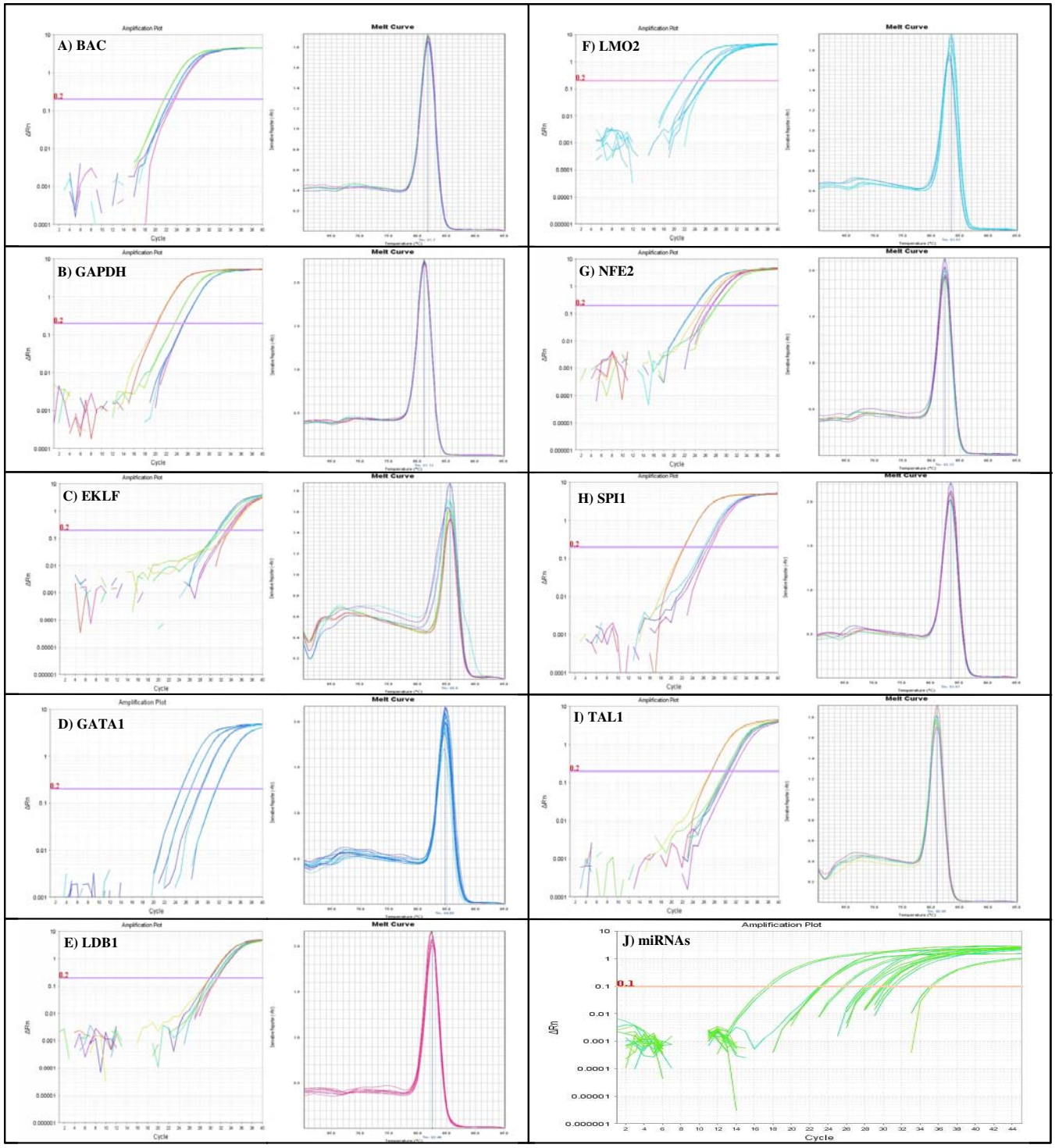


Figura 9: Análise de expressão por qRT-PCR: A-I: Genes incluídos na análise de expressão dos FTs envolvidos na eritropoese; estão representadas nos gráficos a curva de amplificação e de dissociação, respectivamente. **J:** Curva de amplificação para os miRNAs estudados (RNU6B, U47, miR24, miR144, miR155, miR210, miR221, miR222, miR223, miR451).

4.4.4 - Análise dos dados da qRT-PCR

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão são normalizados em relação a genes chamados de "controles endógenos". Neste trabalho foi utilizado o gene da β-actina e *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), para os FTs, e RNU6B e U47, para os miRNAs.

Os valores de Ct de cada gene foram obtidos em duplicata, dessa forma, foram calculadas as médias aritméticas destas, para cada amostra que teve um determinado gene estudado. Em seguida foi obtido o valor de delta Ct (ΔCt), que consistiu na subtração do menor Ct de um gene de uma determinada amostra com os demais Cts desse mesmo gene de outras amostras estudadas. O próximo cálculo foi o de "Q" valor, que corresponde a $2^{\Delta Ct}$. Os valores de Q dos genes Beta actina e GAPDH de cada amostra analisada foram submetidos ao programa geNorm (Vandesompele, et al., 2002), que calculou a média geométrica entre eles, valor este denominado de Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor de Q do gene de interesse da amostra pelo fator de normalização da amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (UA) ou valor absoluto de expressão.

O programa geNorm (Vandesompele, *et al.,* 2002) foi utilizado para o cálculo da média geométrica entre os "controles endógenos", resultando no denominado Fator de Normalização da amostra, que é utilizado para estimar a expressão do gene de interesse.

4.5- Análise estatística

As variáveis quantitativas obtidas a partir dos dados de normalização das amostras foram testadas para verificar o tipo de distribuição através do teste de normalidade efetuado pelo *software GraphPad InsTat.* Todas as amostras representaram uma distribuição normal e dessa maneira, os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

Posteriormente, utilizou-se o teste paramétrico com análise de variância (ANOVA) para analisar possíveis diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Após constatar variância significativa utilizou-se o teste de Bonferroni que efetuou a comparação entre dois grupos (dois a dois) para localizar entre quais deles existia(m) a(s) diferença(s).

O teste de Bonferroni adotou: $*p<0,05$ para diferença significativa, $**p<0,001$ para diferença muito significativa e $***p<0,0001$ para diferença extremamente significativa.

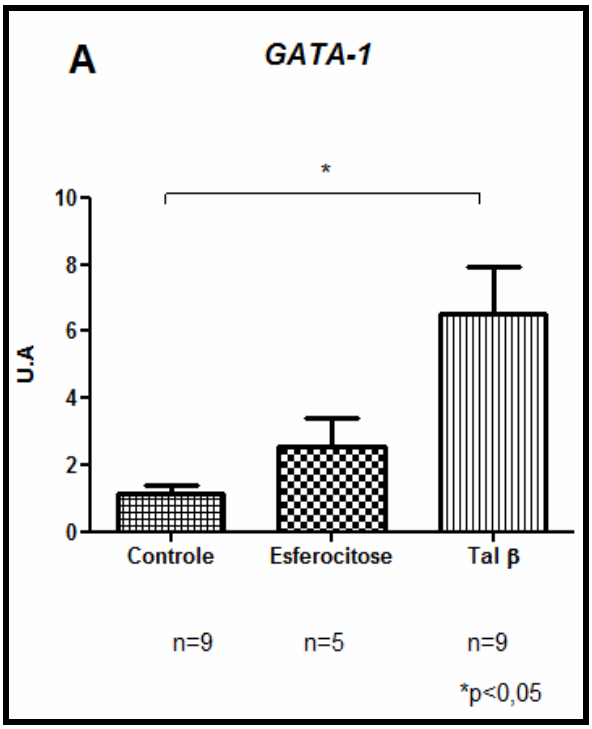
5. Resultados

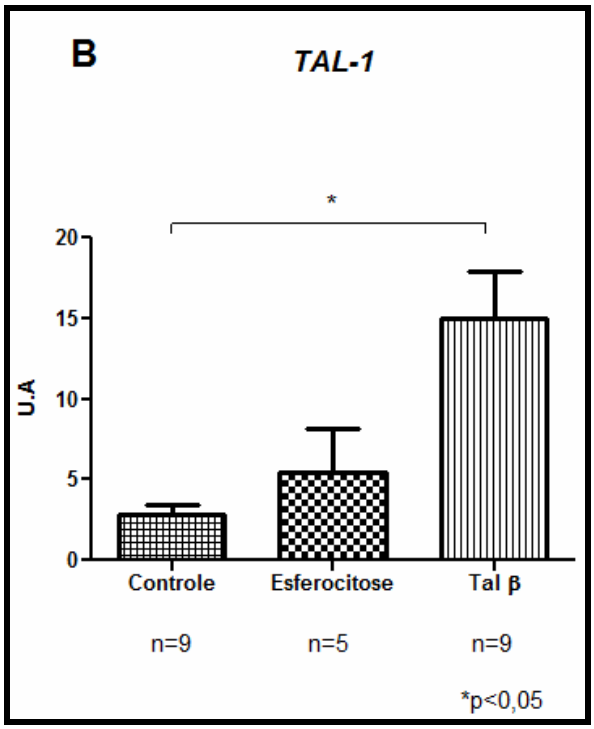
5. RESULTADOS

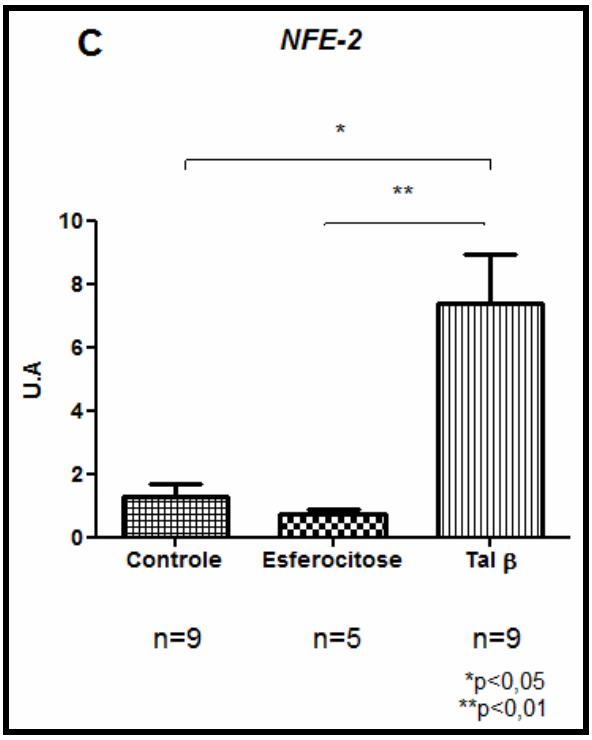
5.1. Estudos com FTs

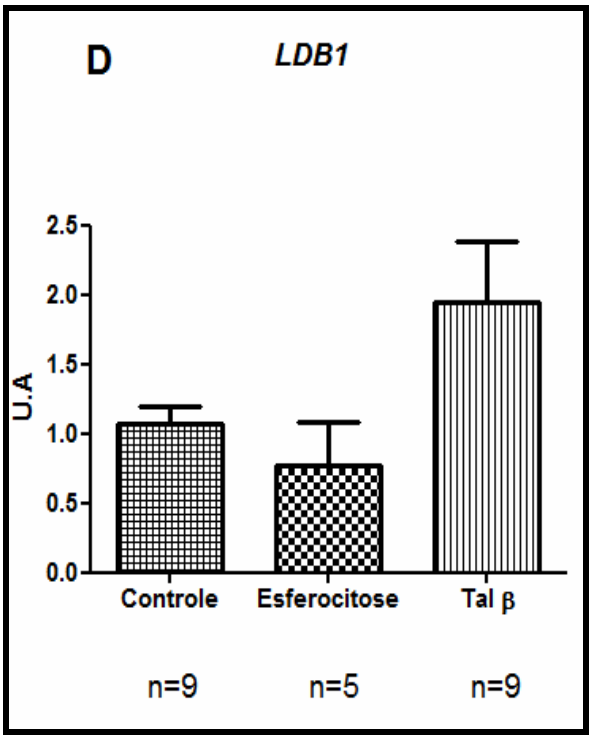
5.1.1-Perfil de expressão de FTs em reticulócitos de pacientes com TβI

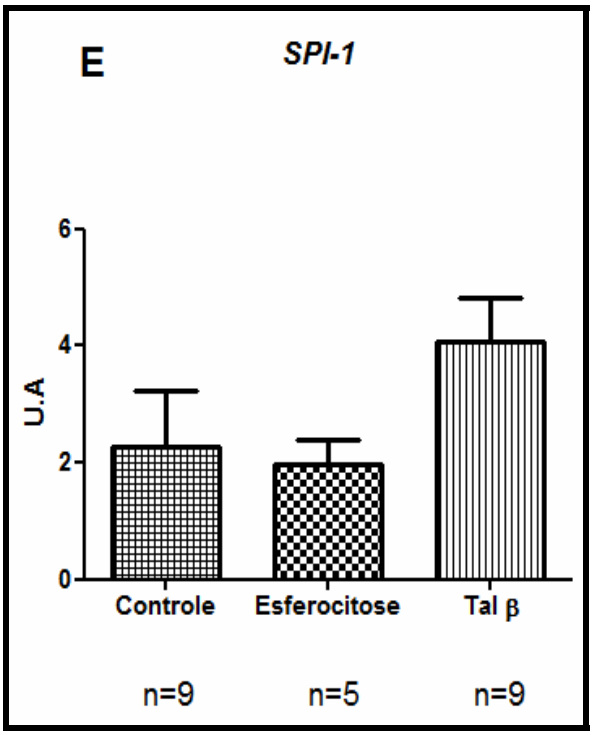
Os gráficos representando o perfil de expressão dos FTs estudados em reticulócitos de pacientes com TβI e dos grupos controle estão expostos abaixo:






C
NFE-2
*
**
10
8
6
4
2
0
U.A
Controle
Esferocitose
Tal β
n=9
n=5
n=9
*p<0,05
**p<0,01


D
LDB1
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
U.A
Controle
Esferocitose
Tal β
n=9
n=5
n=9


E
SPI-1
6
4
2
0
U.A
Controle
Esferocitose
Tal β
n=9
n=5
n=9

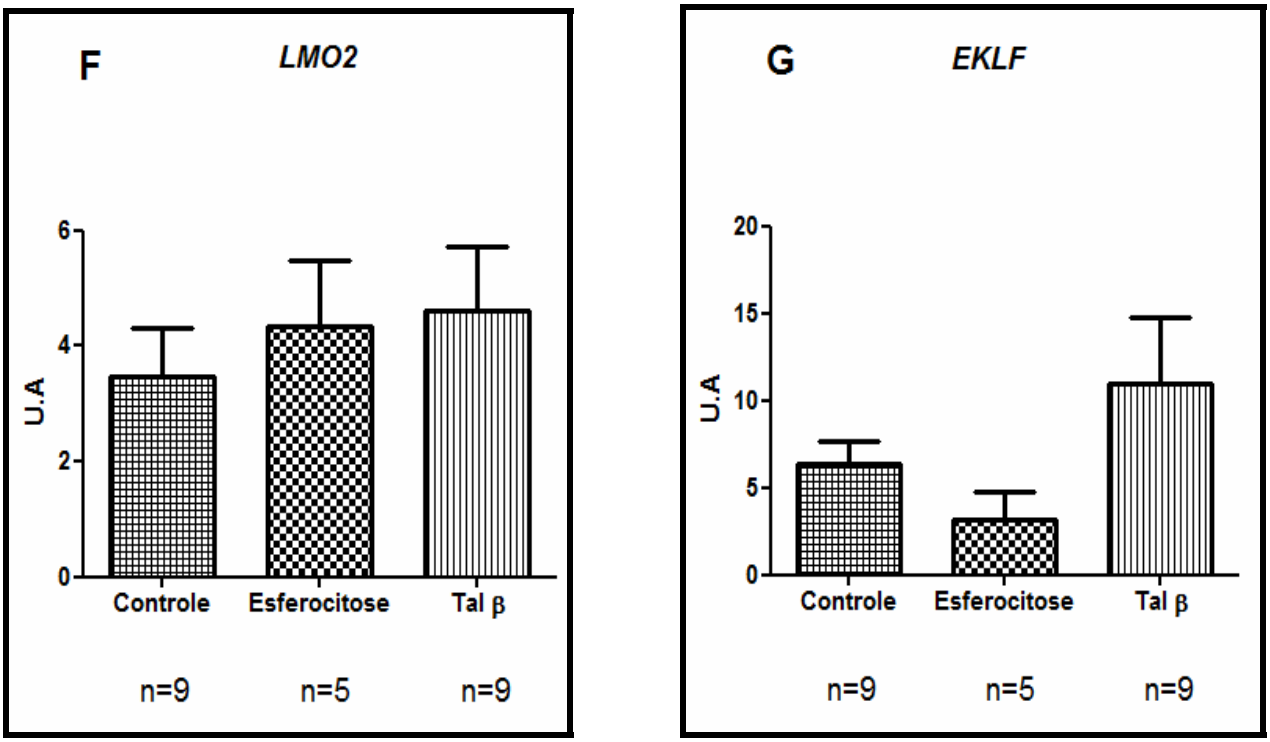


Figura 10: Perfil de expressão dos FTs em reticulócitos de pacientes com TβI. A: *GATA-1* (GATA *binding protein 1)*, **B:** *TAL1* (*T-cell acute lymphocytic leukemia*), **C:** NFE-2 *(nuclear factor - erythroid-derived 2)* **D:** *LDB1* (*Lim domain binding 1)* **E:** *SPI-1*, **F:** *LMO2* (*LIM-only protein 2*), **G:** *EKLF* (*erythroid-kruppel like factor*). Análises estatísticas realizadas pelo teste ANOVA complementado com pós-teste Bonferroni, considerando $p<0,05$.

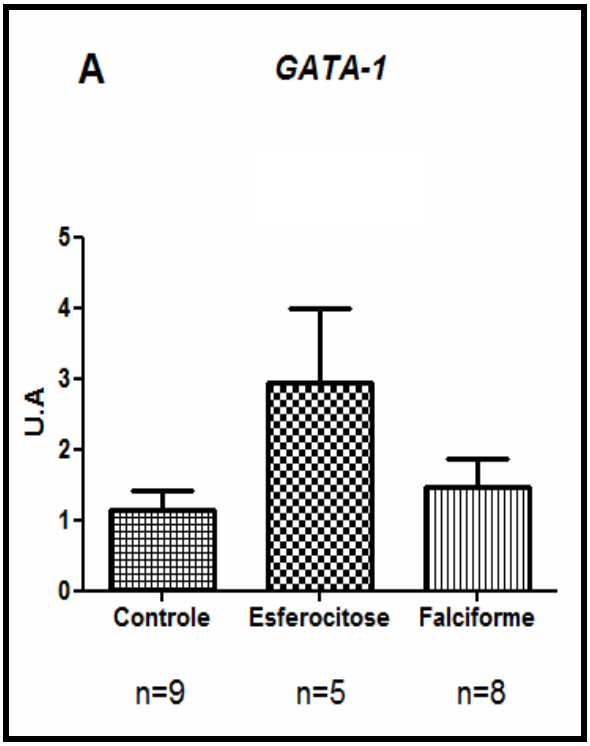
Os resultados descritos na figura 10 demonstraram aumento ou diminuição na expressão dos FTs em reticulócitos de pacientes TβI e três deles exibiram perfil de expressão aumentado estatisticamente significativo:

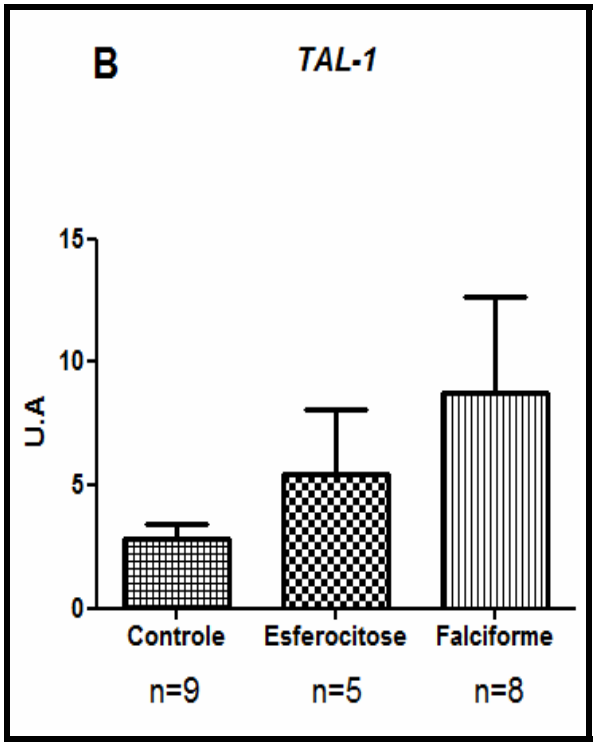
- ***GATA-1*:** perfil de expressão aumentado ($p<0,05$) no grupo com TβI em relação ao grupo controle 1;
- ***TAL1*:** perfil de expressão aumentado ($p<0,05$) no grupo com TβI em relação ao grupo controle 1;
- ***NFE-2*:** perfil de expressão aumentado ($p<0,05$) no grupo com TβI em relação ao grupo controle 1. Em relação ao grupo controle 2, o perfil de expressão exibiu aumento ainda mais significativo ($p<0,01$).

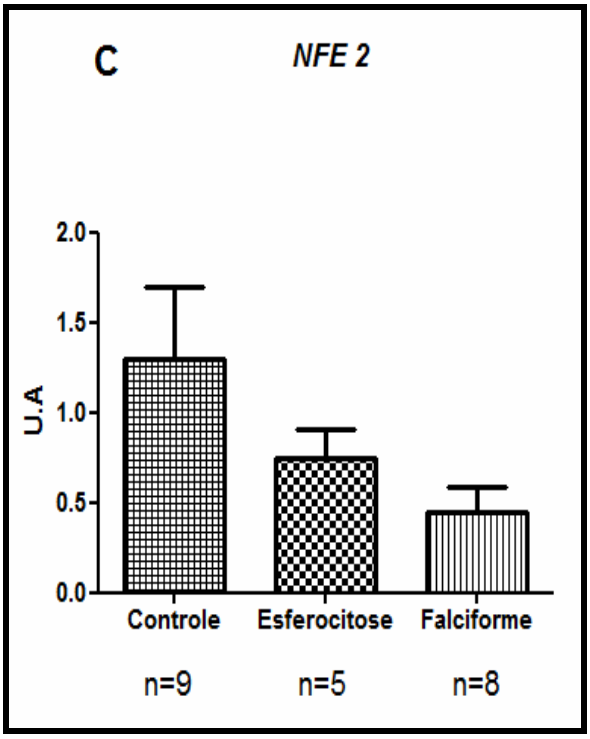
Os demais FTs *LDB1* e *EKLF* não demonstraram diferença estatisticamente significativa, porém observou-se tendência ao aumento de sua expressão em relação aos grupos controle.

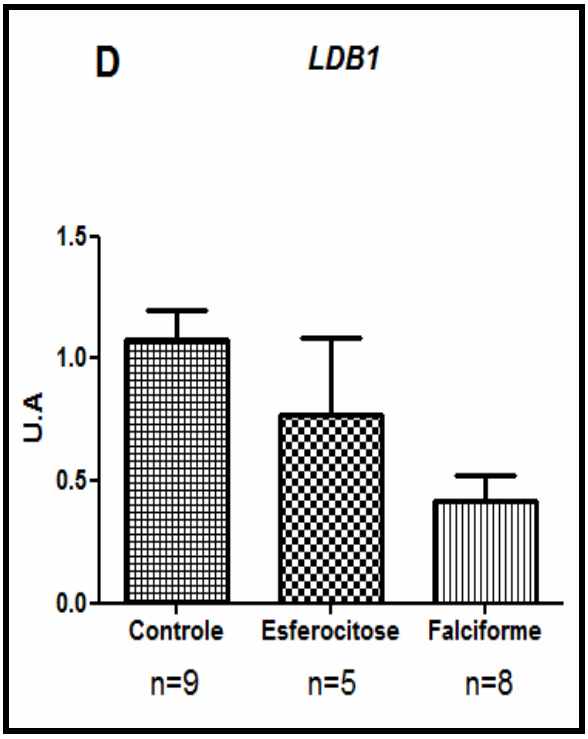
5.1.2-Perfil de expressão de FTs em reticulócitos de pacientes com AF

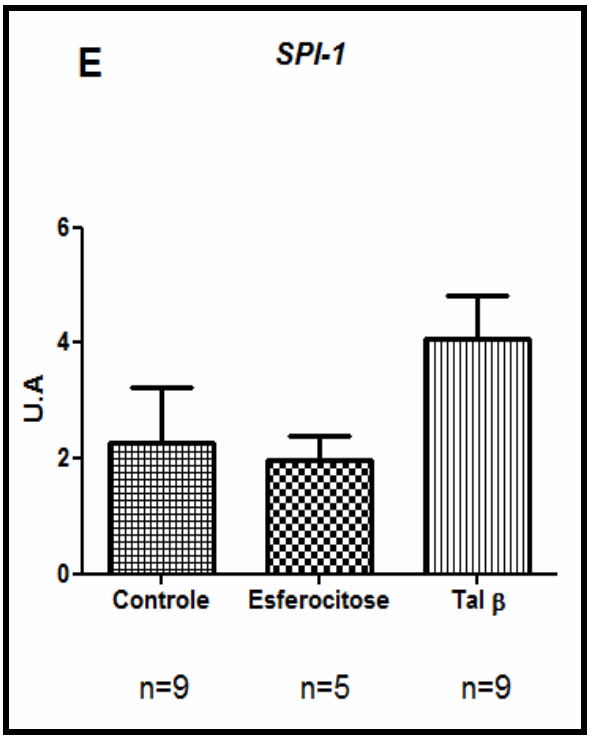
Os gráficos representando o perfil de expressão dos FTs estudados em reticulócitos de pacientes com AF e dos grupos controle estão expostos abaixo:






C
NFE 2
U.A
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Controle
Esferocitose
Falciforme
n=9
n=5
n=8


D
LDB1
U.A
1.5
1.0
0.5
0.0
Controle
Esferocitose
Falciforme
n=9
n=5
n=8


E
SPI-1
U.A
6
4
2
0
Controle
Esferocitose
Tal β
n=9
n=5
n=9

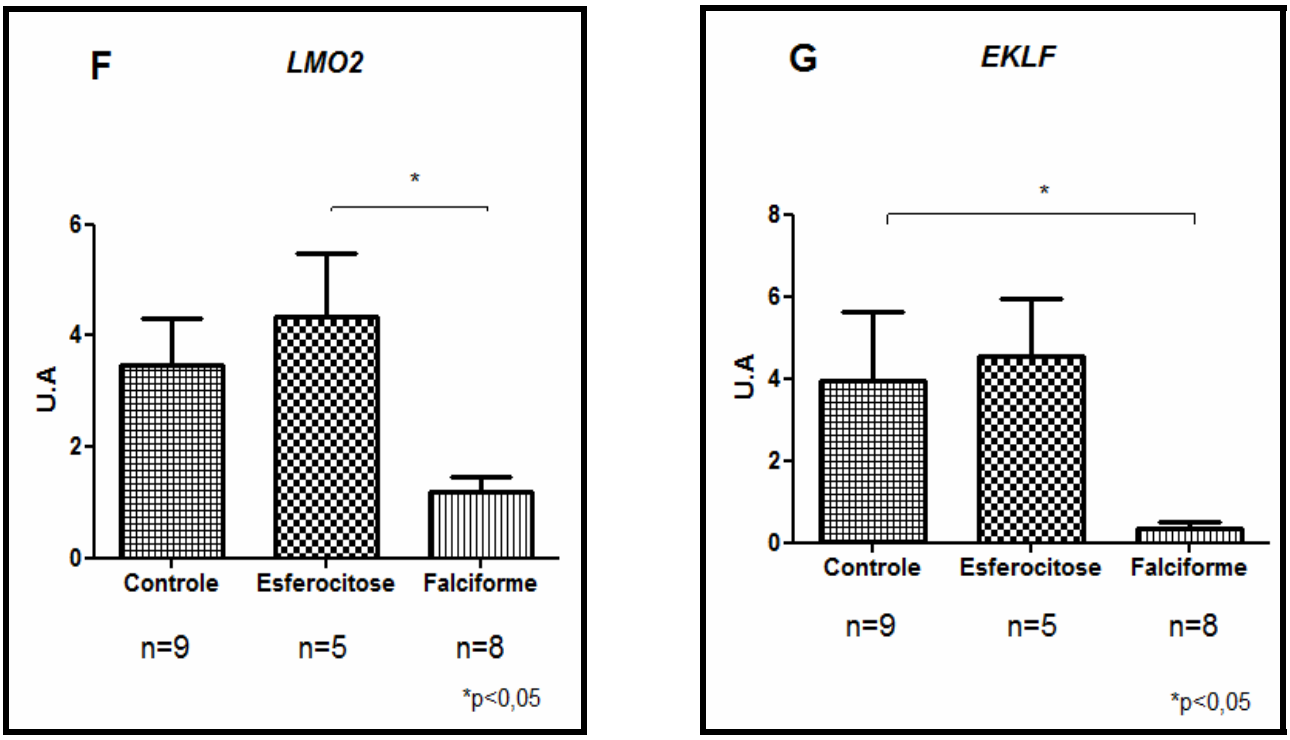


Figura 11: Perfil de expressão dos FTs em reticulócitos de pacientes com AF. A: *GATA-1* (GATA *binding protein 1)*, **B:** *TAL1* (*T-cell acute lymphocytic leukemia*), **C:** *NFE-2 (nuclear factor - erythroid-derived 2)* **D:** *LDB1* (*Lim domain binding 1)* **E:** *SPI-1*, **F:** *LMO2* (*LIM-only protein 2*), **G:** *EKLF* (*erythroid-kruppel like factor*). Análises estatísticas realizadas pelo teste ANOVA complementado com pós-teste Bonferroni, considerando $p<0,05$.

Os resultados descritos na figura 11 demonstram aumento ou diminuição na expressão dos FTs em reticulócitos de pacientes com AF.

Dois FTs exibiram perfil de expressão diminuído estatisticamente significativo:

- ***LMO2:*** exibiu perfil de expressão diminuído ($p<0,05$) em relação ao grupo controle 2;
- ***NFE-2:*** exibiu perfil diminuído ($p<0,05$) em relação ao grupo controle 2.

Os demais FTs não exibiram diferença no perfil de expressão em relação aos grupos controle.

5.1.3-Análise do perfil de expressão de FTs em reticulócitos de pacientes com TβI e com AF

A regulação gênica mediada por FTs exerce função essencial para o desenvolvimento de células eritroides. Algumas dessas moléculas foram caracterizadas por atuarem de modo importante na eritropoese, promovendo a diferenciação, proliferação, maturação e síntese de cadeias globínicas.

A tabela 2 demonstra as principais funções e características dos FTs avaliados em nosso estudo e resume os resultados obtidos a partir da análise do perfil de expressão em reticulócitos dos pacientes com TβI e com AF.

Tabela 3: Características dos FTs e resultados obtidos a partir da análise do perfil de expressão em reticulocitos de pacientes com TβI e com AF

Fator de Transcrição	Cromossomo	Função	Expressão em relação ao controle 1 (qRT-PCR)	
			TβI	AF
GATA-1	X	Promove o desenvolvimento eritroide através da regulação do *switch* de hemoglobina fetal para hemoglobina adulta	↑ *p<0,05	↓
TAL1	1	Atua como regulador positivo na diferenciação de células da linhagem eritroides	↑ *p<0,05	↑
NFE-2	12	Atua nas sínteses de globina e heme para recrutamento de ferro. Liga-se ao sítio 2 hipersensível da região controladora do gene beta globina	↑ *p<0,05	↓
LDB1	10	Atua com *LMO2* na regulação do desenvolvimento eritroide – mantém precursores eritroides em estágios imaturos	↑	↓
SPI-1	11	Bloqueia a atividade transcricional do fator de transcrição *GATA-1*	↑	↑
LMO2	11	Atua em conjunto com *TAL1* para regular o desenvolvimento eritroide e com LDB1 para manter precursores em um estágio imaturo	↑	↓ *p<0,05
EKLF	19	Atua na síntese de globina β adulta a partir da ligação à sequência CCACACCCT localizada no promotor da β globina	↑	↑ *p<0,05

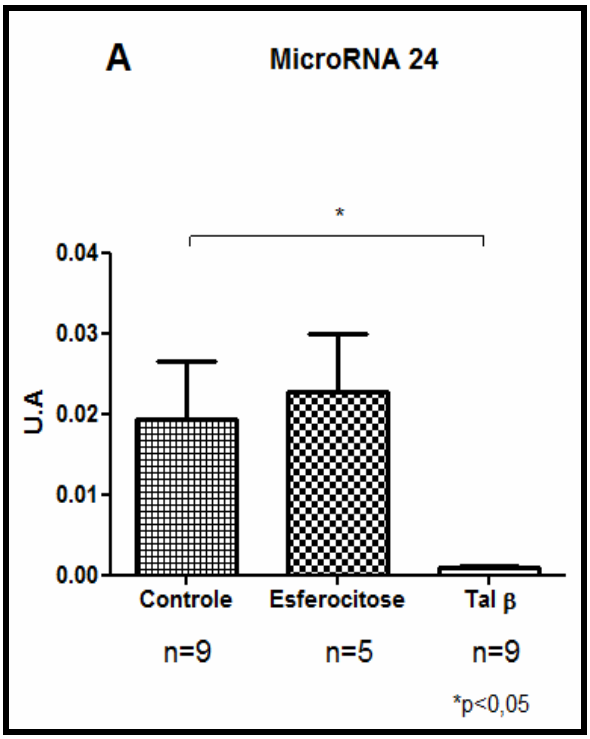
A análise estatística foi realizada através dos testes ANOVA e pós-teste de Bonferroni que considerou significativos os valores de $p<0,05$.

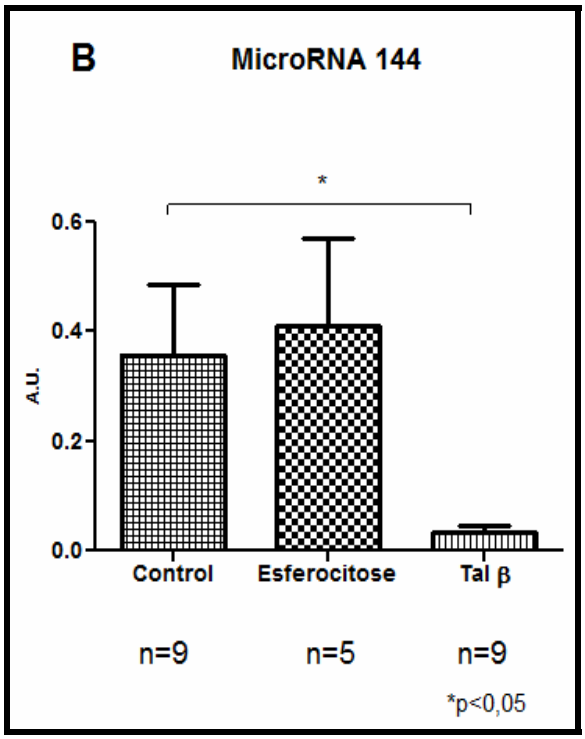
As características sobre localização genômica e função dos FTs foram extraídas dos sites: www.genecards.org e www.ncbi.nlm.nih.gov

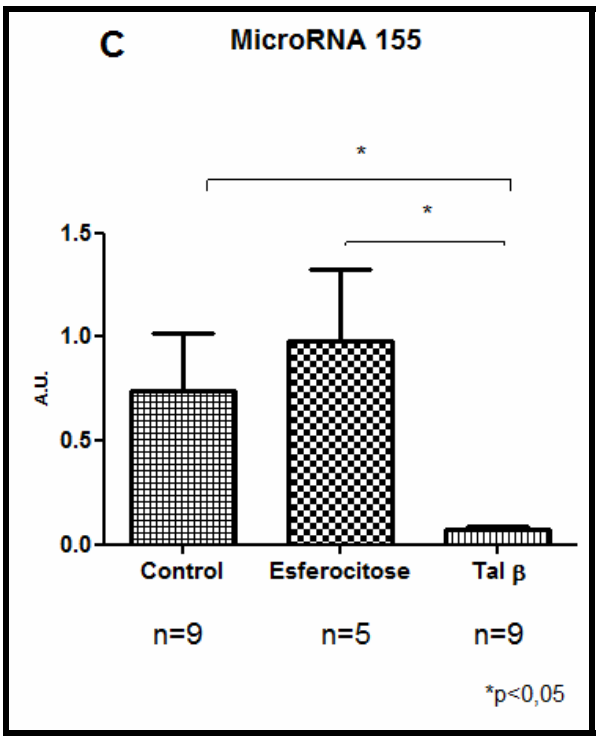
5.2- Estudos com miRNAs

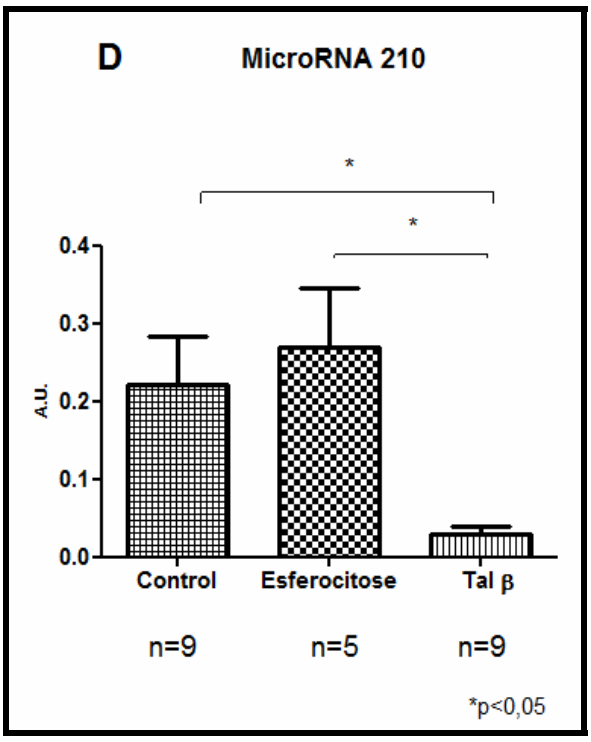
5.2.1- Perfil de expressão de miRNAs em reticulócitos de pacientes com TβI

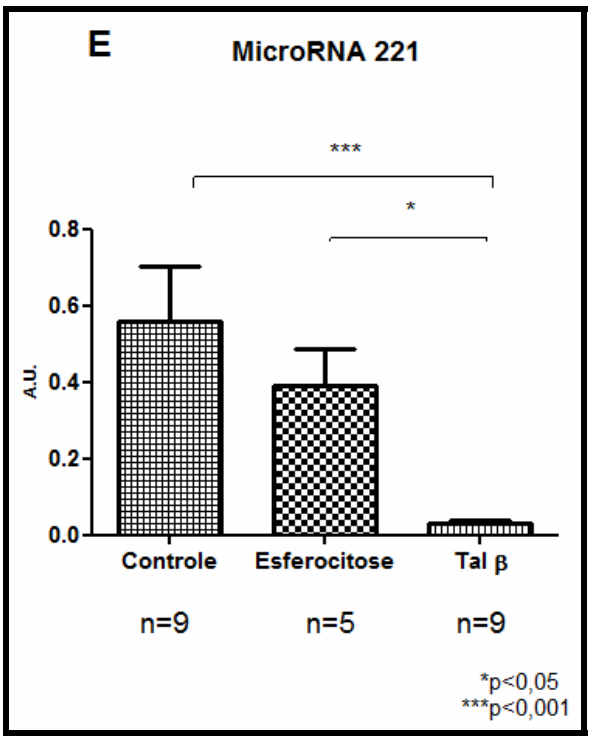
Os gráficos representando o perfil de expressão dos miRNAs estudados em reticulócitos de pacientes com TβI e dos grupos controle estão expostos abaixo:

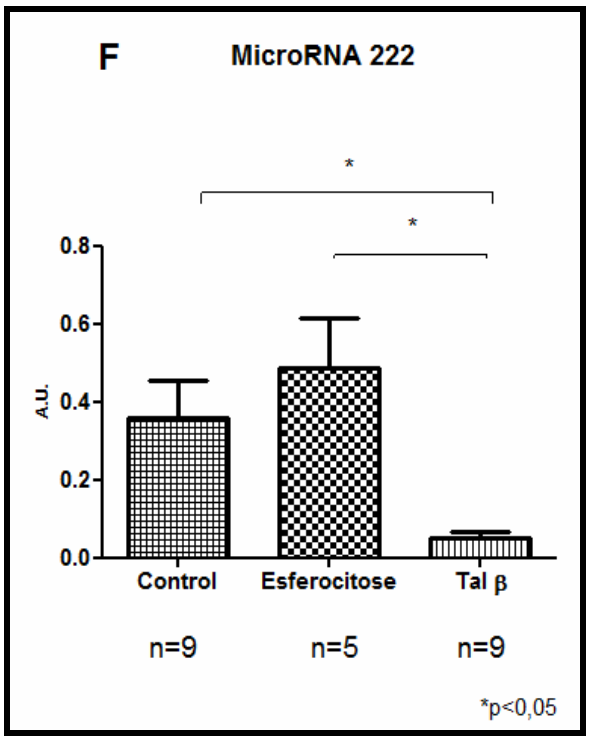





C
MicroRNA 155
*
*
1.5
1.0
0.5
0.0
A.U.
Control
Esferocitose
Tal β
n=9
n=5
n=9
*p<0,05


D
MicroRNA 210
*
*
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
A.U.
Control
Esferocitose
Tal β
n=9
n=5
n=9
*p<0,05


E
MicroRNA 221
***
*
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
A.U.
Controle
Esferocitose
Tal β
n=9
n=5
n=9
*p<0,05
***p<0,001


F
MicroRNA 222
*
*
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
A.U.
Control
Esferocitose
Tal β
n=9
n=5
n=9
*p<0,05

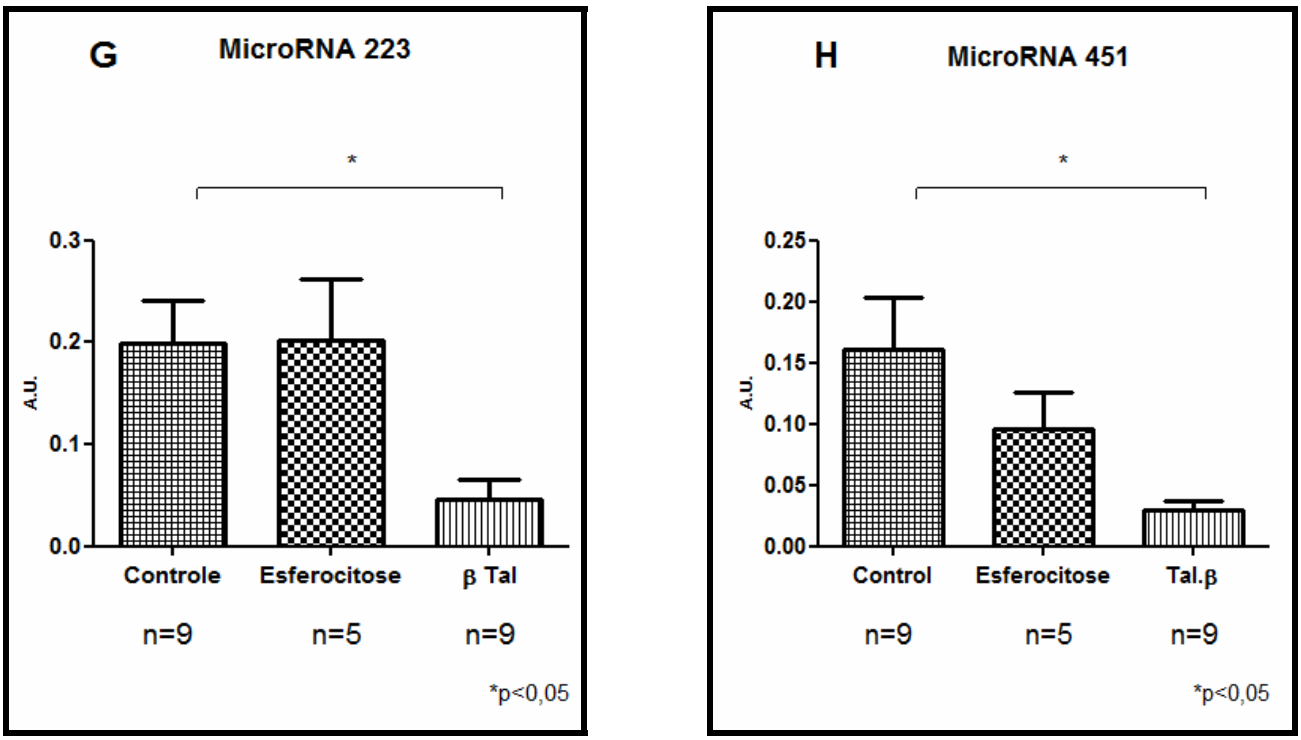


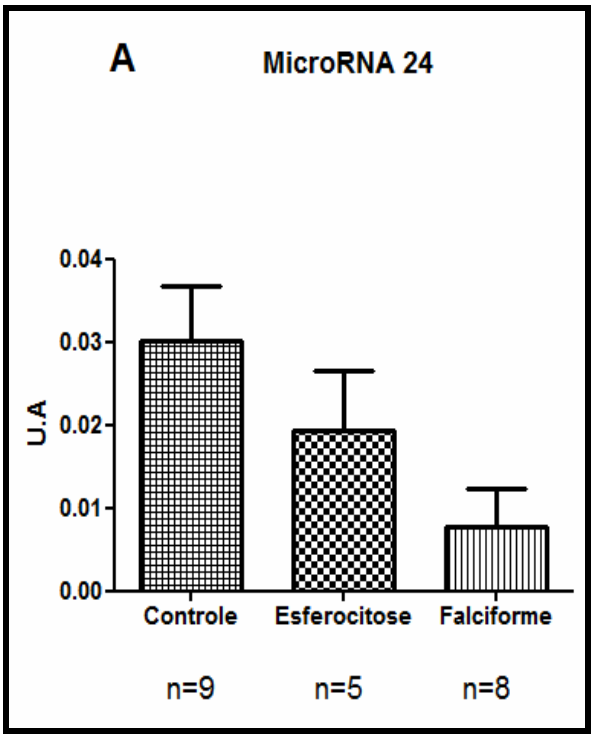
Figura 12: Perfil de expressão dos miRNAs em pacientes com TβI. A: miRNA 24. **B:** miRNA 144. **C:** miRNA 155 **D:** miRNA 210 **E:** miRNA 221 **F:** miRNA 222 **G:** miRNA 223 **H:** miRNA 451. Análises estatísticas por ANOVA e pós-teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$.

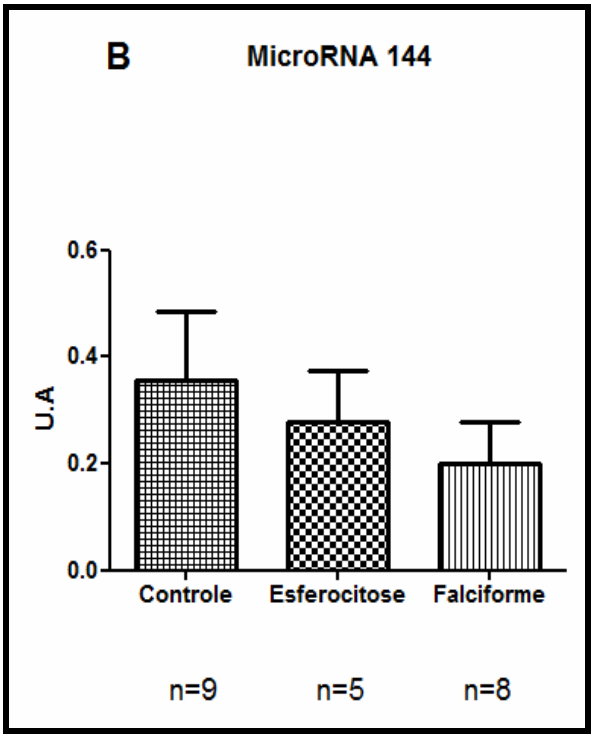
Os resultados descritos na figura 11 demonstram diminuição significativa na expressão de todos os miRNAs estudados em reticulócitos de pacientes com TβI em relação ao grupo controle 1. Quatro deles também demonstraram diferença estatística em relação ao grupo controle 2.

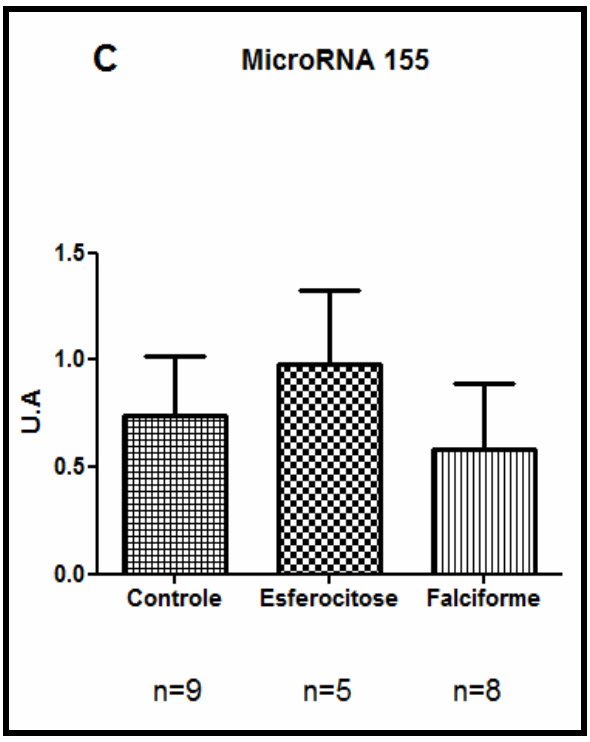
Três miRNAs demonstraram perfil diminuído estatisticamente significativo em relação ao grupo com esferocitose hereditária. Incluem-se: miR155, miR210, miR222 e miR221, sendo esse último destacado por exibir diminuição extremamente significativa em seu perfil de expressão quando comparado com o grupo controle 1 ($p<0,001$).

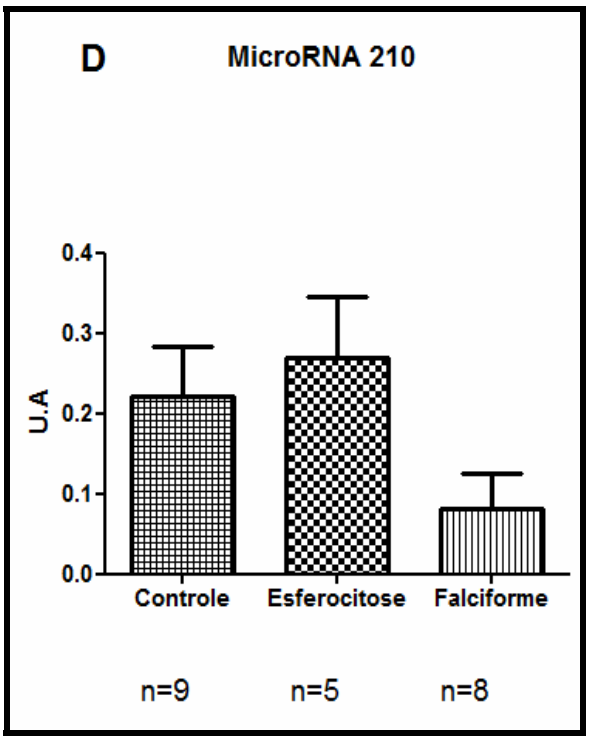
5.2.2 - Perfil de expressão de miRNAs envolvidos em reticulócitos de pacientes com AF

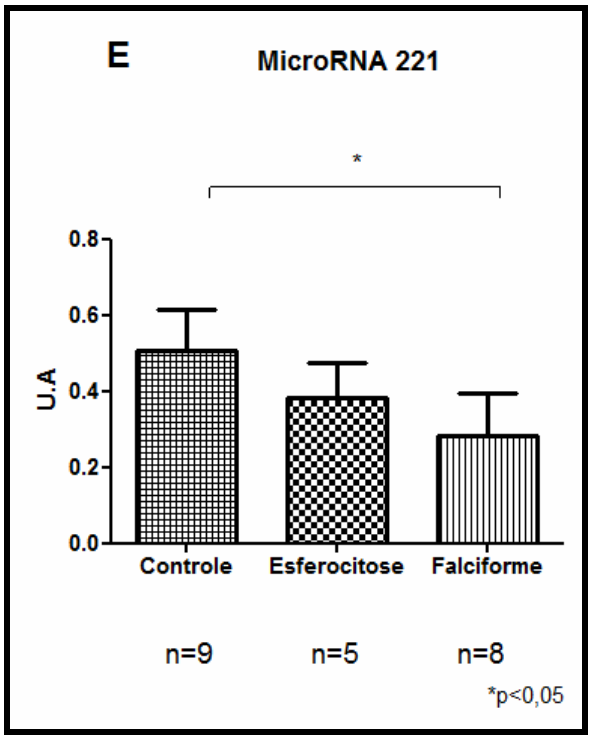
O perfil de expressão dos miRNAs em reticulócitos de pacientes com AF (n=8) está demonstrado na figura 13.

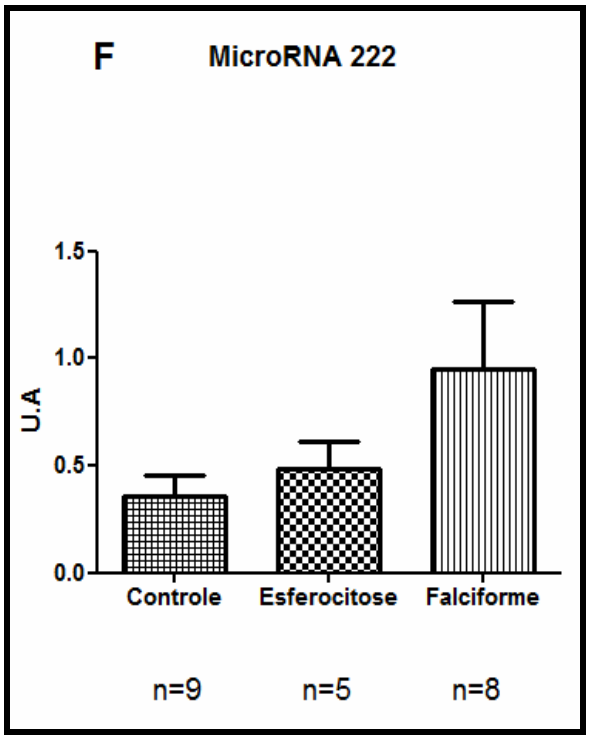





C
MicroRNA 155
U.A
1.5
1.0
0.5
0.0
Controle
Esferocitose
Falciforme
n=9
n=5
n=8


D
MicroRNA 210
U.A
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Controle
Esferocitose
Falciforme
n=9
n=5
n=8


E
MicroRNA 221
*
U.A
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Controle
Esferocitose
Falciforme
n=9
n=5
n=8
*p<0,05


F
MicroRNA 222
U.A
1.5
1.0
0.5
0.0
Controle
Esferocitose
Falciforme
n=9
n=5
n=8

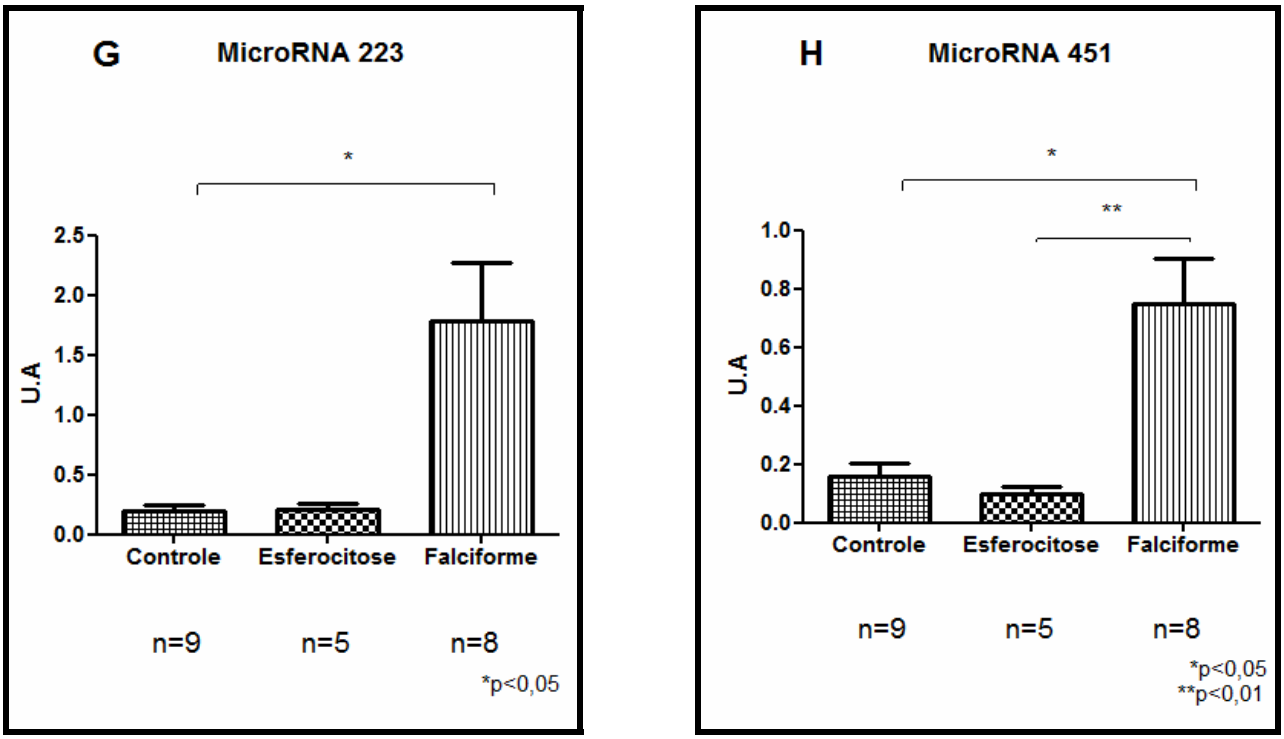


Figura 13: Perfil de expressão de miRNAs em pacientes com AF. A: miRNA 24. **B:** miRNA 144 **C:** miRNA 155 **D:** miRNA 210. **E:** miRNA 221. **F:** miRNA 222. **G:** miRNA 223, **H:** miRNA 451. Análises estatísticas por ANOVA e pós-teste de Bonferroni, considerando $p<0,05$.

A maioria dos miRNAs apresentou expressão diminuída em pacientes com AF em relação aos grupos controle. Porém, dois deles demonstraram perfil aumentado. São eles:

- **miRNA 221:** exibiu perfil diminuído significativo ($p<0,05$) em reticulócitos de pacientes com AF comparado com o grupo controle 1;
- **miRNA 223:** exibiu expressão aumenta significativa ($p<0,05$) em reticulócitos de pacientes com AF com relação ao grupo controle 1;
- **miRNA 451:** a expressão desse miRNA encontra-se aumentada em reticulócitos de pacientes com AF tanto em relação ao grupo controle 1 ($p<0,05$) quanto em relação ao grupo 2 ($p<0,01$).

5.2.3 Análise do perfil de expressão de miRNAs em reticulócitos de pacientes com TβI e com AF

Os miRNAs podem atuar em conjunto com FTs e, dessa maneira, regularem a eritropoese a nível transcricional e pós transcricional. Pouco se conhece sobre a atuação desses pequenos RNAs durante a diferenciação eritroide e sabe-se ainda menos sobre sua influência nas hemoglobinopatias.

A tabela 3 demonstra dados sobre funções dos miRNAs avaliados em nosso estudo e resume os resultados obtidos a partir da análise do seu perfil de expressão em reticulócitos dos pacientes com TβI e com AF.

Tabela 4: Características dos miRNAs e resultados obtidos a partir da análise do perfil de expressão em reticulócitos de pacientes com TβI e com AF

miRNA	Cromossomo	Função	Expressão em relação ao controle 1 (qRT-PCR)	
			TβI	AF
miRNA 24	19	A baixa expressão deste miRNA nos estágios mais tardios da eritropoese irá promover a maturação.	↓ *p<0,05	↓
miRNA 144	17	Pode estar envolvido na síntese de alfa globina	↓ *p<0,05	↓
miRNA 155	21	Atua de maneira antagônica ao miR451 e promove a diferenciação em estágios mais tardios da eritropoese	↓ *p<0,05	↓
miRNA 210	11	Pode atuar como inibidor da apoptose. O aumento de sua expressão promove a síntese de gama globina	↓ *p>0,05	↓
miRNA 221	X	Quando superexpresso, pode interferir na sobrevivência de eritrócitos	↓ **p<0,001	↓ *p>0,05
miRNA 222	X	Quando subexpresso, promove a diferenciação e proliferação eritroide. Atua em conjunto com o miR221	↓ *p<0,05	↑
miRNA 223	X	Promove a diferenciação eritroide quando subexpresso e induz a expressão do fator de transcrição *LMO2*	↓ *p<0,05	↑ *p>0,05
miRNA 451	17	Atua na síntese de hemoglobina em conjunto com o fator de transcrição *GATA-1* e os miR155 e miR144	↓ *p<0,05	↑ *p>0,05

A análise estatística foi realizada através dos testes ANOVA e pós-teste de Bonferroni que consideraram significativos os valores de $p<0,05$.

As características sobre localização genômica e função dos FTs foram extraídas da literatura através do site www.ncbi.nlm.nih.gov

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

A descoberta de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na eritropoese é essencial para o entendimento de patogenias e para o planejamento terapêutico das doenças que acometem a linhagem vermelha. Estudos comprovam o envolvimento de algumas proteínas e genes, entre eles os que codificam os FTs, na proliferação e diferenciação de progenitores eritroides e no controle homeostático da eritropoese. Ainda, especula-se o envolvimento de mecanismos transcricionais e pós transcricionais na expressão de genes relacionados à variabilidade fenotípica característica das Talassemias e da AF.

A análise do perfil de expressão gênica dos FTs avaliados em reticulócitos de 9 pacientes com TβI, homozigotos para a mutação IVSI-6 (C→T), revelou aumento significativo na expressão de todos os FTs que fazem parte do complexo de pentamérico de *GATA-1*, especialmente *TAL1, NFE-2* e *GATA-1.* Ainda, nesse grupo de pacientes, todos os miRNAs analisados apresentaram perfil de expressão diminuído estatisticamente significativo. Pode-se pensar que a baixa expressão dos miRNAs envolvidos na eritropoese em reticulócitos de pacientes com TβI seja resultante de processos oxidativos nos quais os eritrócitos talassêmicos estão sujeitos, uma vez que o desequilíbrio na síntese das cadeias α e β, com consequente diminuição na produção da Hb, promove o acúmulo de ferro livre o que contribui para a lipoperoxidação da membrana e hemólise. Diante desse processo, sugere-se que miRNAs podem sofrer degradação promovida pelo microambiente tóxico dos eritrócitos talassêmicos e dessa maneira influenciar na atuação dos fatores de transcrição aos quais interagem.

O complexo pentamérico *GATA-1 é* composto por *TAL1* ligado ao motivo CAGGTG, *GATA-1*, ligado ao motivo GATA e por *LMO2 e LDB1*, responsáveis pela conexão entre *TAL1* e *GATA-1*. *GATA-1* promove o *switch* de HbF para HbA (Anderson, 1998) e *TAL1* possui perfil de expressão relativamente alto nos precursores eritroides. Além disso, os FTs *EKLF*, *SPI-1, GATA-1* e *FOG1* juntamente com o *LDB1* formam um complexo que é requerido para estabelecer a proximidade espacial entre o LCR e o gene da globina β. *NFE2* regula a transcrição do gene da globina β e é um elemento regulatório importante no controle da síntese do heme e de globina, promovendo o equilíbrio na produção desses 2 componentes (Hasson et al., 2007).

De acordo com Rekhtman e colaboradores (1999), há uma interação antagônica direta entre *PU.1* (*SPI-1*) e *GATA-1*, e sua expressão reprime a ativação transcricional mediada por *GATA-1*. Nossos resultados revelam a expressão aumentada de todos os FTs integrantes desse complexo no grupo de pacientes com TβI. Em contrapartida, no grupo de pacientes com AF a expressão dos FTs do complexo *GATA-1* foi diminuída, inclusive a de *LMO2*, que está sujeito à degradação na ausência de *LDB1*. Além disso, observamos expressão inversa, não significativa de *SPI-1* em relação ao *GATA-1*, corroborando os achados de Rekhtman e colaboradores (1999).

Estudos sugeriram que a interação de FTs e miRNAs pode interferir efetivamente na eritropoese. Dore e colaboradores (2007) demonstraram que o FT *GATA-1* é essencial para ativar a transcrição dos miRNAs policistrônicos miR144 e miR451. Este mesmo estudo demonstrou que o bloqueio da expressão do miR451 causou anemia grave em *Danio rerio (zebrafish)* além de interferir na produção da Hb, reduzindo seus níveis (Pase et al., 2009).

A análise dos miRNAs miR144 e miR451 em TβI demonstrou diminuição nos níveis de expressão, em contrapartida, a expressão do fator de transcrição *GATA-1* foi aumentada. Esses resultados, em conjunto, corroboram os dados publicados por Dore e colaboradores (2007) e estão de acordo com os dados publicados recentemente por Rasmussen (2010), no qual foi demonstrado que camundongos que tem o *cluster* dos miRNAs miR144 e miR451 depletados apresentam insuficiência na maturação tardia dos eritroblastos e resulta em hiperplasia eritroide, esplenomegalia e anemia moderada.

Masaki e colaboradores (2007), analisaram o perfil de expressão dos miRNAs 451 e 155 em cultura de progenitores eritroides e demonstraram que estes miRNAs podem atuar de maneira conjunta e antagônica já que durante a diferenciação eritroide normal, o nível de expressão do miR155 diminui proporcionalmente ao aumento da expressão do miR451. Não observamos, em reticulócitos de pacientes com TβI, a expressão antagônica entre estes miRNAs, porém dados preliminares de cultura de células de progenitores eritroides (n=2, resultados não apresentados) corroboram os dados expostos por Masaki e indicam uma possível atuação diferenciada dos miRNAs *in vitro*.

Felli e colaboradores demonstraram em 2009 que o miR223 depende da expressão do fator de transcrição *LMO2* e juntos regulam a eritropoese normal. Os resultados deste estudo mostraram que a expressão deste miRNA interfere de maneira antagônica na

expressão do FT *LMO2* que, quando em altos níveis, pode promover a diferenciação eritroide. Nossos resultados confirmam os dados apresentados por Felli uma vez que o miRNA 223 está aumentado em pacientes com AF em contraste com a expressão diminuída do FT *LMO2*. Ainda em 2009, Yuan e colaboradores analisaram a expressão deste miRNA em células sanguíneas e leucêmicas, especialmente na linhagem k562 e descreveram que o aumento da expressão do miR223 resulta no declínio significativo de RNA mensageiro da globina γ e consequentemente afeta os índices de HbF, promovendo o estado clínico mais grave para a AF. Além disso, também foi exposto que a expressão do FT *LMO2* estava diminuída em contraste com o aumento da expressão do miRNA 223, comprovando a atuação antagônica entre eles. Nossos resultados demonstraram o aumento da expressão do miR223 e diminuição do nível de expressão do FT *LMO2* no grupo de pacientes com AF. Dessa forma, sugerimos que a atuação do miRNA223 e do FT *LMO2* na eritropoese desses pacientes pode ser um mecanismo importante para promover métodos terapêuticos nessa hemoglobinopatia, uma vez que modulam a síntese de globina γ.

Recentemente, Zhou e colaboradores (2010) demonstraram que o bloqueio da expressão do FT *EKLF* promoveu a redução acentuada dos níveis de BCL11A e aumentou a razão entre a expressão do gene da globina γ/β. Entretanto, sugere que o *EKLF* controla o *switching* da globina pela ativação direta do gene da globina β e reprime, indiretamente, a expressão do gene da globina γ. Em estudo realizado por Fu e colaboradores (2009), o *EKLF* foi considerado um alvo fisiológico do miR144, além disso, concluiu que o complexo formado por eles está envolvido na regulação da expressão da globina α adulta. Em 2008, Wang e colaboradores observaram que o miR144 promoveu a diferenciação nos estágios iniciais da eritropoese e que a inibição da atividade endógena deste miRNA auxiliou a síntese de Hb. Nossos resultados exibiram perfil de expressão significativamente diminuída do miR144 no grupo de pacientes TβI e em contrapartida, o EKLF apresentou expressão aumentada. No grupo composto por pacientes AF, este miRNA também demonstrou nível de expressão reduzido porém não significativo.

Finalmente, o miR24 regula a diferenciação eritroide através da influência da expressão do receptor *ALK4* (Wang et al., 2008). Este miRNA reduz os níveis de RNAm e proteína do receptor ao se ligar à região 3´ não traduzida do RNAm de *ALK4* e interfere na atividade de fosforilação de Smad2 além de diminuir a formação de CFU-E e BFU-E em

células progenitoras hematopoéticas $CD34^{+}$. A expressão de ALK4 está inversamente correlacionada com a expressão do miRNA 24 durante os estágios iniciais da diferenciação eritroide. A superexpressão do miRNA 24 acarreta um atraso na maturação induzida pela proteína activina em células progenitoras hematopoéticas numa cultura líquida. No entanto, nossos dados demonstram perfil de expressão diminuído em reticulócitos de pacientes com TβI.

Após traçarmos o perfil de expressão dos fatores de transcrição e miRNAs em reticulócitos de pacientes com TβI e com AF, sugerimos, contudo, que os mecanismos regulatórios transcricionais e pós transcricionais mediados especialmente pelas moléculas avaliadas neste estudo e que exibiram diferença significativa de expressão, possam interferir na eritropoese desses pacientes. Vários estudos demonstraram a importância dos FTs para a linhagem eritroide, porém, a função de miRNAs nessa linhagem e sua atuação conjunta a esses FTs ainda não estão estabelecidos. Dessa forma, especulamos que os miRNAs e os FTs estudados neste trabalho e que apresentaram alterações importantes em seus índices de expressão, possam atuar como moduladores genéticos nessas hemoglobinopatias e, ainda, sugerimos a associação dos miRNAs com os FTs durante a regulação da eritropoese dos pacientes com TβI e AF.

A compreensão de mecanismos de ação dos miRNAs e FTs envolvidos na eritropoese, pode abrir novas perspectivas para o tratamento das hemoglobinopatias e para o melhor entendimento da fisiopatologia dessas alterações hematológicas.

Trata-se do primeiro estudo que avaliou o perfil de expressão de miRNAs e FTs relacionados à eritropoese em reticulócitos de pacientes com AF e TβI no Brasil

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

• Observamos os níveis de expressão dos miRNAs diminuídos, estatisticamente significativos, no grupo de pacientes com TβI;

• De maneira contrária, os fatores de transcrição analisados estavam aumentados nesse grupo de pacientes; enfatizamos os FTs *GATA-1, TAL1 e NFE-2* que exibiram aumento significativo de expressão;

• No grupo de pacientes com Anemia Falciforme encontramos um perfil variado de expressão para os miRNAs, destacando-se os miRNAs miR221, miR223 e miR451 que revelaram aumento significativo nos níveis de expressão;

• No grupo de pacientes com AF, destacamos os fatores de transcrição *LMO2* e *EKLF*, cujo perfil de expressão mostrou-se significativamente diminuído;

• O microambiente celular característico para essas hemoglobinopatias, pode influenciar a expressão de miRNAs e consequentemente a dos FTs avaliados nesse trabalho;

• Os achados desse estudo podem sugerir a interação desses reguladores gênicos que participam da eritropoese e que eles podem atuar, de maneira significativa, como moduladores genéticos e clínicos nas hemoglobinopatias;

Referêcias Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, K.P., Crable, S.C., Lingrel, J.B.. Multiple proteins binding to a GATA-E box – GATA motif regulate the erythroid Kruppel-like factor (EKLF) gene. **J. Biol. Chem.** 1998, 273: 14347-14354

Araújo AS, Silva WA, Leão SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, Zago MA. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. **Hemoglobin**. 2003, 27(4):211-7.

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, et al.. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. **Cell.** 2005,122:553–63

Bank, A. (1978). The thalassemia syndromes. **Blood**, 51:369-384

Begley CG, Aplan PD, Davey MP, Nakahara K, Tchorz K, Kurtzberg J, Hershfield MS, Haynes BF, Cohen DI, Waldmann TA, Kirsch IR . Chromosomal translocation in a human leukemic stemcell line disrupts the T-cell antigen receptor d-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. **Proc Natl Acad Sci** USA. 1989, 86:2031

Bezerra MAC. Aspectos Clínicos, Bioquímicos e Moleculares das Síndromes Talassêmicas em População do Estado de Pernambuco. **Dissertação de Mestrado** Apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas. 2007.

Bianchi, N,; Zuccato, C.; Lampronti I.; Borgatti, M.; Gambari, T. Expression of miR-210 durig differentiation and induction of gama-globin gene expression. **BMB reports**, 2009, 42(8):493-9

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of premiRNAs. **RNA.** 2004,10:185–91

Brandelise, S.; Pinheiro, V,; Gabetta, C.S.; Hambleton, I,; Serjeant, B.; Serjeant, G. (). Newborn screeening for sickle cell disease in Brasil: the Campinas exprerience. **Clin.Lab.Haematolo** 2004, 26:15-19

Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. **Haematologica** 2008; 93:1009–1016.

Bunn HF, Forget BG. Molecular, genetic and clinical aspects. In: Hemoglobin. 1. ed. W.B. Saunders Company, 1986, p.690

Cantor, A.B.; Orkin, S.H. Coregulation of GATA factors by the friend of GATA (FOG) family of mulitype zinc finger proteins. **Sem in Cell&Devel Biol.**, 2005,16:117-128

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

Cappellini, N,; Cohen, A.; Elefherious, A.; Piga, A.; Porter, J.; Guidelines for the clinical management of thalassemia. **Thalassaemia International Federation (TIF)**, 2000, 111p.

Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. **Semin Immunol.**, 2005, 17(2):155-65

Conran, N.; Fattori, A.; Saad, M.A.; Costa, F.F. Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasm of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. **Am.J.Hematol.,** 2004, 343-347.

Costa F.F. Anemia Falciforme. *In*: **Hematologia-fundamentos e práticas**. Edited by Zago M.A. & Falcão R.P. São Paulo, 2001, 289-328

De Franceschi, L.; Corrocher, R. Estabilished and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica.** 2004, 89: 348-56

Dore, L.C.; Amigo, J.D.; dos Santos, C.O.; Zhang, Z.; Gai, X.W.; Tobias, J.W.; Yu, D.N.; Klein, A.M.; Dorman, C.; Wu, W.S.; Hardison, R.C.; Paw, B.H.; Weiss, M.J. A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. **PNAS**, 2008, 105 (9):3333-3338

Evans T, Felsenfeld G. The erythroid-specific transcription factor eryfl: A new finger protein. **Cell.** 1998, 58:877

Fadlon, E.; Vordermeier, S.; Pearson, T.C.; Mire-Sluis, A.R.; Dumonde, D.C.; Phillips, J.; et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. **Blood.** 1998, 91(1): 266-74

Felli N, Pedini F, Romania P, Biffoni M, Morsilli O, Castelli G, Santoro S, Chicarella S, Sorrentino A, Peschle C, Marziali G. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. **Haematologica**. 2009, 94(4):479-86

Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C. **Proc Natl Acad Sci** U S A. 2005, Dec 13;102(50):18081-6. Epub 2005 Dec 5.

Finger LR, Kagan J, Christopher G, Kurtzberg J, Hershfield MS, Nowell PC, Croce CM (1989) Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989, 865039

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. **Nature** 1998, 391:806–11

Freson, K.; Thys, C.; Wittewrongel, C.; Vermylen, J.; Hoylaerts, M.F.; Van Geet, C. Molecular cloning and characterization of the GATA1 cofactor human FOG1 and assessment of its binding to GATA1 proteins carrying D218 substitutions. **Hum Genet.**, 2003, 112(1):42-49

Fu, TF.; Du, TT.; Dong, M.; Zhu, KY, Jing, CB.; Zhang, Y.; Wang, L.; Fan, HB.; Chen, Y.; Jin, Y.; Yue GP,; Chen SJ.; Huang QH.; Jing, Q.; Deg M.; Liu Tx. Mir-144 selectively regulates embryonic alpha-hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. **Blood**. 2009, 113(6):1340-9

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. **Cell.** 2001, 106:23–34

Hasson, A.; Zetterblad, J.; Van Duren, C.; Axelson, H.; Jonsson, J.I. The Lim-only protein LMO2 acts as a positive regulator of erythroid differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 2007, 364(3): 675-681

Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. Beta-thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? **Br J Haematol**. 1998;100(1):70-8.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science,** 2001, 293:834–38

Kasschau, M.R.; Barabino, G.A.; Bridges, K.R.; Golan, D.E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood.** 1996, 87: 771-80

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in evelopmental timing in *C. elegans*. **Genes Dev**. 2001, 15:2654–59

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat Rev Mol Cell** Biol., 2005, 6(5):376-85

Lawrie, C.H. MicroRNA and haematology: small molecules, big function. **BJH**, 2007**,** 137:503-512

Lee Y.; Ahn. C.; Hann, J.J.; Choi, H.; Kim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Radmark, O.; Kim, S.; Kim, V.N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, 2003, 425(6956):415-419

Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* **Science,** 2001 (5543):862-4

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, 2003, 115:787–98

Lobo C. L. C, Bueno L. M., Moura P. et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro. **Rev. Panam. Saude Publica**, 2003 v. 3, n. 2/3, p.154-159

Masaki, S.; Ohtsuka, R.; Abe, Y.; Muta, K.; Umemura, T. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. **BBRC**., 2007 364:509-514

Mouthon, M., A., Bernard, O., Mitjavila, M.,T., et al. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. **Blood**., 1993, 81: 647-655

Nagel, R.L.; The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Q.J.Biol.Med**. 1984, 53-62

Ohene-Frempong,; Steinberg, M.H. Clinical aspectas of sickle cell anemia in adults and children. In Steinberg, M.H.; Forgete, B.G.; Higgs, D.R.; Nagel, R. **Disorders of hemoglobin – genetics, pathophysiology and clinical management.** New Yoor: Cambridge University press, 2001. P611-670.

Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. **Blood** 1992, 80575

Pase L, Layton JE, Kloosterman WP, Carradice D, Waterhouse PM, Lieschke GJ. **Blood**. 2009 Feb 19;113(8):1794-804. Epub 2008 Oct 10.

Perutz MF, Rossman MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. Structure of hemoglobin. Nature 1960; 185: 416-22.

Perkins, A.C., Sharpe, A.H., Orkin, S.H. **Nature**. 1995, 375,318-321

Pinheiro L.S; Gonçalves R.P; Tome C.A.S, Alcantara, A.E.E, Marques, A.R.C, Silva, M.M. Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**. 2006, vol.28 no.2 Rio de Janeiro Feb.

Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Shivdasani RA, Alt FW, Orkin SHComplete block to hematopoiesis in the absence of the T-cell leukemia oncoprotein SCL/TAL- I. **Blood**, 1995, 86:253a, (abstr, suppl 1)

Rahgozar, S.; Poorfathollag A.A.; Moafi, A.R. & Old J.M. bs Gene in Central Iran is in linkage disequilibrium witg the Indian-Arab haplotype. **American Journal of hematology**. 2000, 192-195

Rasmussen, K.D.; Simmini, S.; Abreu-Goodger, C.; Bartonicek N.; Di Giacomo M.; Bilbao-Costes D.; Horos, R.; Von Lindern M.; Enright A.J, O´Carroll D. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. **Blood**, 2010, 207(7)?1351-8

Rekhtman, N. Choe KS.; Matushansky, I.; Murray, S.; Stopka, T.; Skoultchi, Al. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. **MCB**. 2003, 23(21):7460-74

Robb L, Lyons 1**,** Li R, Hartley L, Kontgen F, Harvey RP, Metcalf D, Begley CG (1995) Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. Proc **Natl Acad Sci** USA 92:7075

Rosse, W.F.; Mohandas, N.; Petz, L.D.; Steinberg, M.H. New views of sickle cell disease, pathophysiology and treatment. **Hematology** (Am Soc Hematol Educ Program): 2000, 2-17
Serjeant, G.R. Screening of sickle-cell disease in Brazil. **Lancenet,** 2000, 356:168-169

Shivdasani, RA; Rosenblatt, MF; Zucker-Francklin D et al. Transcription factor NFE-2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. **Cell**. 2005, 81: 695-702

Simon MC, Pevny L, Wiles MV, Keller G, Costantini F, Orkin SH (1992) Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1-mouse embryonic stem cells. **Nat Genet** 1:92

Steinberg, M.H.; Forget B.G.; Higgs, D.H., Nagel, R.L. Disorders of Hemoglobin. **Genetic, Pathophysiology and Clininal Manegement**. Cambridge University Press,2000, p 231-356

Steinberg MH, Adewoye AH. Modifier genes and sickle cell anemia. Current Opinion in Hematology 2006; 13: 131-36.

Steinberg, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. In: Sickle cell disease and thalassaemia. Edited by Rodgers GP. Published by **Balliere Tindall**, 1998, London

Stuart, M.J.; Nagel, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet**, 2004, 364(9442):1343-60

Sutton, M.; Bouhassi, E.E.; Nagel, R.L, Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the determination of b-like globin gene cluster haplotypes. **Am.J.Hematol.** 1989**,** 32: 66-69

Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited. **Blood Cells MolDis**. 2006;37(1):12-20

Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid linea through expression in mammalian cells. **Nature**, 1989, 339:446

Tsang, A.P.; Visvader, J.E.; Turner, C.A.; Fujiwara, Y.; Yu, C.N.; Weiss, M.J.; Crossley, M.; Orkin, S.H. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. **Cell Press**, 1997, (90):109-119

Thein, S.L.. B-Thalassemia. *In*: Rodgers, G.P. **Ballière´s Clinical Haematology**. Balliere Tindall, 1998, (11): 91-96

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol** 2007; 9:654–659

Wang, Q.; Huang, Z.; Xue, H.; Jin, C.; Ju, X.L.; Han, J.D.; Chen., Y.G. MicroRNA miR-24 inhibts erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. **Blood**, 2008, 111: 588-595

Wang, C.W.; Lukens J.N. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In Lee, G.R,; Foerster, J.; Lukens, J.N.; Paraskevas, F.; Greer, J.P.; Rodgers, G.M. **Wintrole´s clinical hematogy**. Baltimore, 1998, cap 51, p. 1346-1404

Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. **Cell**. 1994;78:45–57

Weatherall, D.J.;Provan, A.B. Red cells In: inherited anaemias. **Lancenet.** 2000,1169-1175.

Weatherall DJ. The Thalassaemias In**:** Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Rundles RW. **Hematology**. 1990, 4th Ed. New York: McGraw Hill Book Company

Weatherall, D.J.; Clegg, J.B. The Thalassaemia Syndromes. 1981 3th Ed. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**

Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through ***in vitro*** differentiation of GATA- 1 - embryonic stem cells. **Genes Dev** 19958: 1184

Wickramasinghe, S.N., Hughes, M. Ultrastructural studiesmof erythropoiesis in b-thalassemia trait. **British Journal of haematology**, 1980(46): 401-407

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of premicroRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**.2003, 17:3011–16

Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. **PLoS One** 2009; 4:e4722.

Zhou, Y.; Ferguson, J.; Chang, J.T.; Kluger, Y. Inter.-and intra-combinatorial regulation by transcription factors and microRNAs. **BMC Genomics**, 2007, 8:396

Anexos

ANEXOS

15th Congress Barcelona, June 2010

15th Congress, June 10-13, Barcelona, Spain

POSTER PRESENTATION: EXPRESSION OF microRNAS IN RETICULOCYTES FROM BETA THALASSEMIA INTERMEDIA PATIENTS

Author:

Ferreira, R, Unicamp, Campinas, Brazil(P)

Co-author(s):

Bezerra, MA, UNICAMP, Campinas, Brazil

Araujo, A, Hematology and Hemotherapy Center of Pernambuco, Recife, Brazil

Albuquerque, D, UNICAMP, Campinas, Brazil

Ferreira, F, Unicamp, Campinas, Brazil

Topic:

25. Red blood cells and iron; functions and disorders, anemia

Keywords:

Beta thalassemia, erythropoieisis, expression profiling

……..

MicroRNAs (miRNAs) represent a novel class of endogenous non-coding RNAs of approximately 20-22 nucleotides. In mammalian cells, miRNAs negatively regulate gene expression by inhibiting translation of target RNAs or degrading messenger RNAs. In normal erythropoiesis, microRNAs play a very important role because they regulate differentiation in most stages. There is an increasing number of studies demonstrating the function of these non-coding RNAs in the pathogenesis and prognosis of erythropoietic disorders, including thalassemias. Beta-Thalassemia (BT) is an inherited hematologic disease caused by reduced or absent synthesis of beta globin chain, leading to a relative excess of alpha globin chains. This imbalance causes hemolysis and impair erythropoiesis. The aim of this study was to analyze the expression profile of miRNAs 24, 144, 155, 210,

221, 222, 223 and 451 in beta-thalassemia intermedia patients. Reticulocytes were separated from peripheral blood samples of control subjects (n≥9) and from untransfused BT IVS-I-6 (T C) homozygous patients without HU therapy (n≥9). Samples from spherocytosis patients with reticulocytosis and synthesis of normal globin chains were also included to confirm miRNA expression profile (data not show). Extraction of miRNA, transcription to cDNAs and Real Time PCR were performed to analyze miRNAs expression, using U47 and RNU6B as endogenous controls. The statistical analyzes showed that the expression levels of the miRNAs 24, 144, 155, 210, 221, 222, 223 and 451 were significantly lower in BT patients compared to control subjects (mean 0.0009 vs 0.193, p=0.030; 0.034 vs 0.357, p=0.04; 0.073 vs 0.736 , p=0.0106; 0.029 vs 0.222, p=0.0244; 0.029 vs 0.556, p=0.0001; 0.048 vs 0.358, p=0.0106; 0.045 vs 0.198, p=0.0056; 0.029 vs 0.169, p=0.0160, respectively). These miRNAs were previously described to act in different stages of normal erythropoiesis. When up-regulated, miRNAs 144 and 451 promotes erythroid maturation and synthesis of hemoglobin, while the miRNA 210 acts in erythroid differentiation. In this study, the low expression of these miRNAs suggests their involving at latest maturation in BT. The interaction between miRNAs 451 and 155 demonstrates that overexpression of miRNA 451 promotes decrease in expression of miRNA 155. However, the data presented in this report shows low expression of both microRNAs. Downregulation of miRNAs 24, 221, 222 and 223 results in erythroid maturation; although this study as shown that the expression profile of these miRNAs was lower in BT, the pathways from which they draw the erythroid differentiation is not clear. This is the first report of miRNAs expression involved in reticulocytes of beta-thalassemia intermedia patients. These results suggest the importance of miRNAs molecular pathways in the BT patient's erythropoiesis which may contribute to the understanding of this pathophysiology.