

TÂNIA REGINA ZACCARIOTTO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DAS PIP QUINASES
DURANTE A DIFERENCIAÇÃO ERITRÓIDE
HUMANA *IN VITRO***

CAMPINAS

2009

TÂNIA REGINA ZACCARIOTTO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DAS PIP QUINASES DURANTE A
DIFERENCIAÇÃO ERITRÓIDE HUMANA *IN VITRO***

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, na Área de Concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Coorientadora: Profa.Dra. Carolina Lanaro

CAMPINAS

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

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

Z11p Zaccariotto, Tânia Regina
 Perfil de expressão das PIP quinases durante a diferenciação
 eritróide humana *in vitro* / Tânia Regina Zaccariotto. Campinas, SP :
 [s.n.], 2009.

Orientadores : Maria de Fátima Sonatti, Carolina Lanaro
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Proteína quinase. 2. Eritropoese. 3. Expressão gênica. 4.
Hemoglobinopatia. I. Sonatti, Maria de Fátima. II. Lanaro,
Carolina. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “PIPK expression profile during in vitro differentiation of human erythroid cell”

Keywords: • Kinases proteins
• Erythropoiesis
• Gene expression
• Hemoglobinopathies

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Profa. Dra. Carmen Sílvia Passos Lima

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

Profa. Dra. Márcia Regina de Souza Cossa Wenning

Data da defesa: 10-12-2009

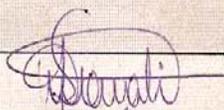
Banca examinadora da tese de Doutorado

Tânia Regina Zaccariotto

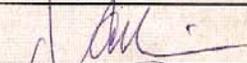
Orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Membros:

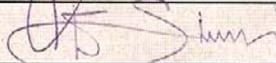
1. Prof(a). Dr(a). Maria de Fátima Sonati



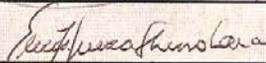
2. Prof(a). Dr(a). Anderson Ferreira da Cunha



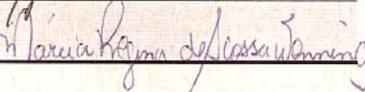
3. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Passos Lima



4. Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara



5. Prof(a). Dr(a). Márcia Regina de Souza Cossa Wenning



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/12/2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Isael e Maria Lúcia, e a
minha irmã Sandra, pelo apoio, incentivo,
confiança, compreensão e todo amor que sempre
me deram.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha luz e fortaleza, por todas as bênçãos derramadas em minha vida e por mais essa conquista.

Aos meus pais e a minha irmã, pessoas mais importantes da minha vida, por todo apoio, incentivo, amor, carinho e por sempre estarem ao meu lado, torcendo por mim.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, minha orientadora e amiga, por toda sua dedicação, paciência, incentivo, competência e profissionalismo. Agradeço pelos valiosos ensinamentos acadêmicos, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e por toda a confiança depositada em mim durante todos esses anos. Muito obrigada por tudo.

À Profa. Dra. Carolina Lanaro, pela coorientação deste trabalho, pela competência, dedicação, por estar sempre pronta a me ajudar, por tudo que me ensinou e ainda continua me ensinando sobre a cultura de células e, pela amizade conquistada.

À Banca Examinadora deste trabalho, Profa. Dra. Elvira, Profa. Dra. Márcia, Profa. Dra. Carmen e Prof. Dr. Anderson, pela gentileza e disponibilidade para participar da minha banca e por dedicarem seu tempo à avaliação desta tese. Agradeço por todas as sugestões.

À Profa. Dra. Daniela Maria Ribeiro por todas as observações e sugestões.

À Dra. Dulcinéia Martins Albuquerque, com enorme reconhecimento, pela dedicação, pelos ensinamentos e por toda a ajuda para a realização deste trabalho e, pela amizade conquistada.

Aos meus amigos do coração, mais que especiais, Dani, Magnun e Fernanda, pela grande amizade firmada, pelos bons momentos que compartilhamos juntos e por toda a contribuição durante todos esses anos de trabalho.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias, amigos do coração, Denise, Elzinha, Dani, Magnun, Cintia, Susan, Polly, Felipe, Vânia e Márcia, pela amizade, por todo apoio, carinho, pelos bons momentos de descontração e por estarem sempre presentes nos momentos de alegria e tristeza. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Aos amigos do Hemocentro, Dul, Carol e Marcos e, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos dos Laboratórios do Prédio Vital Brasil, Fernanda, Isa, Sula, Rômulo, Anderson, Gustavo, Cris e Érika.

Aos pacientes e a todos os voluntários que contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Cleide Aparecida Moreira Silva, da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela assessoria e execução das análises estatísticas, e pelo profissionalismo.

À FAPESP, CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro destinado à realização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

	PÁG.
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 As Fosfatidilinositol-Fosfato Quinases.....	20
1.2 Eritropoese, Hemoglobinopatias e PIPKs.....	25
1.2.1 Eritropoese.....	25
1.2.2 As Hemoglobinas Humanas.....	26
1.2.3 Os Genes de Globinas.....	27
1.2.4 As Hemoglobinopatias.....	29
1.2.4.1 Hemoglobinopatias estruturais.....	29
1.2.4.2 As Talassemias.....	30
1.2.4.2.1 Talassemia β	30
1.2.4.2.2 Talassemia α	32
1.2.5 As PIPKs e as células eritróides.....	37
2. OBJETIVOS	39
3. SUJEITOS, MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Grupo Normal e Pacientes.....	42
3.2 Cultura de Células CD34+ Hematopoiéticas do Sangue Periférico...	44

3.2.1 Separação das Células Mononucleares.....	45
3.2.2 Isolamento das Células CD34+.....	45
3.2.3 Condições de Cultivo das Células CD34+.....	46
3.3 Citometria de Fluxo	48
3.4 Extração de RNA.....	51
3.5 Síntese de cDNA Através da Transcrição Reversa.....	52
3.6 Verificação da Síntese de cDNA.....	52
3.7 PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).....	54
3.7.1 Desenho dos <i>primers</i>	57
3.7.2 Padronização da concentração dos <i>primers</i>	59
3.7.3 Análise da eficiência da amplificação.....	59
3.7.4 Análise dos resultados da qRT-PCR.....	61
3.8 Análise Estatística.....	62
4. RESULTADOS.....	63
5. DISCUSSÃO.....	92
6. CONCLUSÃO.....	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Genótipos e aspectos laboratoriais da Talassemia α	33
Tabela 2: Dados dos pacientes com Doença da Hb H estudados por <i>Wenning et al</i>	36
Tabela 3: Dados dos pacientes com Doença da Hb H estudados no presente trabalho	43
Tabela 4: Dados dos pacientes com Talassemia β	43
Tabela 5: Dados dos pacientes com Anemia Falciforme.....	44
Tabela 6: Sequências, tamanhos dos fragmentos, concentrações utilizadas e eficiência dos <i>primers</i> empregados nas reações de qRT-PCR.....	58
Tabela 7: Análise descritiva e intervalo de confiança de 95% para a média dos resultados das Globinas no grupo normal.....	65
Tabela 8: Análise descritiva e intervalo de confiança de 95% para a média dos resultados das PIPKs no grupo normal.....	65

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Localização celular do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI4,5P ₂).....	21
Figura 2: Estrutura das PIP Quinases.....	23
Figura 3: As PIPKs, seus substratos e produtos.....	25
Figura 4: Cinética da eritropoese.....	26
Figura 5: <i>Cluster α</i>	28
Figura 6: <i>Cluster β</i>	28
Figura 7: Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....	30
Figura 8: Morfologia celular durante a diferenciação eritróide.....	48
Figura 9: Dot plots da citometria de fluxo.....	50
Figura 10: Gel de agarose a 1,5% com amostras de RNA.....	51
Figura 11: Amplificação do gene da β-actina (gel de agarose a 1,5%).....	53
Figura 12: Curva de amplificação de qRT-PCR.....	55
Figura 13: Curva de <i>melting</i> (ou de dissociação) para avaliar a qualidade da reação.....	56

Figura 14:	Curva de eficiência da amplificação.....	60
Figura 15:	Perfil de expressão da PIPKII α e perfil de expressão das globinas α , β e γ	67
Figura 16:	Perfil de expressão das PIPKs (I α , I β , I γ , II β , II γ e III) e perfil de expressão das globinas α , β e γ	69
Figura 17:	Perfil de expressão da PIPKII α durante a diferenciação eritróide <i>in vitro</i> nos pacientes α -talassêmicos.....	71
Figura 18:	Comparação da expressão da PIPKII α entre os pacientes α - talassêmicos.....	71
Figura 19:	Perfil de expressão das PIPKs I α , I β e I γ e II β , II γ e III do paciente JKW.....	73
Figura 20:	Perfil de expressão das PIPKs I α , I β e I γ e II β , II γ e III do paciente FMM.....	74
Figura 21:	Perfil de expressão da PIPKII α nos pacientes β -talassêmicos.....	76
Figura 22:	Comparação da expressão da PIPKII α entre os pacientes β - talassêmicos.....	76
Figura 23:	Perfil de expressão das PIPKs I α , I β e I γ e II β , II γ e III no paciente MAFL.....	78
Figura 24:	Perfil de expressão das PIPKs I α , I β e I γ e II β , II γ e III no paciente ELS.....	79
Figura 25:	Perfil de expressão da PIPKII α nos pacientes com Anemia Falciforme.....	81
Figura 26:	Comparação da expressão da PIPKII α entre os pacientes com Anemia Falciforme.....	81
Figura 27:	Perfil de expressão das PIPKs I α , I β e I γ e II β , II γ e III no paciente JSS.....	83

Figura 28:	Perfil de expressão das PIPKs $I\alpha$, $I\beta$ e $I\gamma$ e $II\beta$, $II\gamma$ e III no paciente JOS.....	84
Figura 29:	Perfis de expressão das globinas nos pacientes α -talassêmicos, β -talassêmicos e com Anemia Falciforme.....	88
Figura 30:	Comparação entre os perfis de expressão da PIPKII com os das globinas (α , β , γ) no paciente α -talassêmico JKW.....	89
Figura 31:	Cromatograma das cadeias globínicas do paciente JKW.....	91
Figura 32:	Via complexa do metabolismo do fosfatidilinositol.....	94
Figura 33:	Sistema de sinalização do fosfatidilinositol.....	95
Figura 34:	Sinalização do $PI4,5P_2$ no núcleo.....	96
Figura 35:	Comparação dos perfis de expressão da PIPKII α entre o grupo normal, os pacientes α -talassêmicos e os β -talassêmicos, com seus controles.....	101
Figura 36:	Comparação dos perfis de expressão da globina β e da PIPKII α entre os pacientes α -talassêmicos JKW e FMM	103
Figura 37:	Comparação dos perfis de expressão da PIPKII β da globina β entre os pacientes com Anemia Falciforme JJS e JOS.....	105

RESUMO

As fosfatidilinositol-fosfato quinases (PIP_Ks) são uma família de enzimas lipídio quinases responsáveis pela produção do segundo mensageiro PI_{4,5}P₂ (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato), que tem um importante papel regulatório em uma variedade de processos celulares, inclusive na expressão gênica. As PIP_Ks são classificadas em 3 subfamílias - PIP_K I (isoformas α , β e γ), PIP_K II (α , β e γ) e PIP_K III – que apresentam distintas funções e localização celular. Recentemente, em estudo desenvolvido em nosso laboratório, o gene da PIP_KII α apresentou-se diferencialmente expresso em reticulócitos de dois irmãos com Doença da Hb H. Sua maior expressão, bem como do gene da globina β , foi encontrada no paciente com concentração de Hb H mais elevada, sugerindo uma relação entre a PIP_KII α e a produção de globinas, particularmente da globina β . No presente trabalho, avaliamos, por PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR), os perfis de expressão dos genes das PIP_Ks (I e II, isoformas α , β , γ , e III) durante a eritropoese em cultura de células CD34⁺ do sangue periférico de 11 indivíduos sadios e de 6 pacientes com hemoglobinopatias (2 α -talassêmicos, 2 β -talassêmicos e 2 com Anemia Falciforme), comparando-os com os perfis de expressão dos genes das globinas α , β e γ , nos dias 7, 10 e 13 da cultura eritróide. Na cultura de células dos indivíduos controles, os resultados revelaram que a expressão de todos os genes PIP_Ks aumentam durante a diferenciação eritróide e que o perfil de expressão do gene da PIP_KII α coincide com o perfil dos genes de globinas. Nas culturas de células dos pacientes, a expressão do gene da PIP_KII α tornou-se maior durante a diferenciação, enquanto os genes das outras PIP_Ks apresentaram resultados heterogêneos. O gene PIP_KII α esteve altamente expresso na cultura de células de um dos pacientes α -talassêmicos, enquanto na cultura de um dos β -talassêmicos apresentou expressão reduzida em relação ao controle. Os resultados também foram diferentes entre as culturas de células dos pacientes falciformes. Este é o primeiro estudo sobre o perfil de expressão dos genes dessas PIP quinases durante a eritropoese humana *in vitro*. Um padrão de normalidade foi estabelecido. Embora os resultados tenham sido heterogêneos entre os pacientes, o que enfatiza a complexidade dos sistemas regulatórios

que atuam na formação da hemoglobina, eles fortalecem a hipótese da existência de uma relação entre PIPKII α e produção de globina β .

ABSTRACT

Phosphatidylinositol-phosphate-kinases (PIPKs), a family of lipid kinases, produce the second messenger PI4,5P2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), which regulates various cellular activities, including the gene expression. PIPKs are divided into three subfamilies [PIPK I (α , β , γ), PIPK II (α , β , γ) and PIPK III], which are functionally distinct and located in different subcellular compartments. In a recent study in our laboratory, the PIPKII α gene was differentially expressed in reticulocytes from two siblings with Hb H disease. Expression of both the PIPKII α and β globin genes were higher in the patient with the higher Hb H level, suggesting a relationship between PIPKII α and the production of globins, particularly β -globin. The aim of this study was to determine the gene expression profiles of PIPKs (I and II — with their isoforms — and III) during erythropoiesis in peripheral blood haematopoietic CD34+ cell culture from eleven healthy volunteers and six patients with haemoglobinopathies (2 with α -thalassemia, 2 with β -thalassemia and 2 with sickle cell anaemia) using quantitative real time PCR (qRT-PCR) and to compare these profiles with the gene expression profiles of α , β and γ globins on the 7th, 10th and 13th days of culture. The results for the cell cultures from healthy individuals showed that the expression of PIPKs increase during erythroid differentiation and that the PIPKII α and globin expression profiles are similar. Expression of the PIPKII α gene increased in the patients' cell cultures during erythroid differentiation, whereas expression of the other PIPK genes varied. PIPKII α was overexpressed in the cell culture of an α -thalassemic patient, while its expression was reduced in the culture of a β -thalassemic patient. The results also differed between the cultures from sickle cell patients. This is the first study of the gene expression profiles of PIPKs during in vitro human erythroid differentiation. We identified a standard pattern of gene expression in the healthy group. Although the results varied between patients, our findings strengthen the hypothesis of a relationship between PIPKII α and production of β -globin.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1) As Fosfatidilinositol-Fosfato Quinases (PIP2Ks)

As PIP2Ks são uma família única de enzimas lipídio quinases que participam de diversas vias de sinalização intracelular e transdução de sinal, cuja atividade foi identificada em 1964 (Hokin e Hokin, 1964; Anderson et al., 1999; Alberts et al., 2004). Na década de 90 foram isoladas de eritrócitos, cérebro, medula da adrenal, fígado, entre outras fontes (Bazenet et al., 1990; Carpenter e Cantley, 1990; Divecha et al., 1992; Loijens et al., 1996).

Estas enzimas são responsáveis pela produção de diversos fosfolipídios de inositol, funcionalmente importantes dentro das células, como por exemplo, o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI4,5P₂). O PI4,5P₂ é um importante segundo mensageiro que regula diversas atividades celulares, incluindo a proliferação e sobrevivência celular, a modulação do citoesqueleto de actina, o transporte de vesículas - entre membrana plasmática e compartimento endossomal não derivado de clatrina - (Brown et al., 2001; Bunce et al., 2006a), a formação de adesão focal - sítios de adesão para feixes de filamentos de actina - a endocitose, exocitose e a regulação de eventos nucleares como a expressão gênica (Toker, 1998; Brown et al., 2001; Doughman et al., 2003; Hinchliffe e Irvine, 2006; Di Paolo e De Camilli, 2006; Mellman et al., 2008, Mellman e Anderson, 2009). Está localizado em diversos compartimentos celulares, sendo mantido nesses locais pela regulação direta das PIP2Ks (Figura 1) (Doughman et al., 2003).

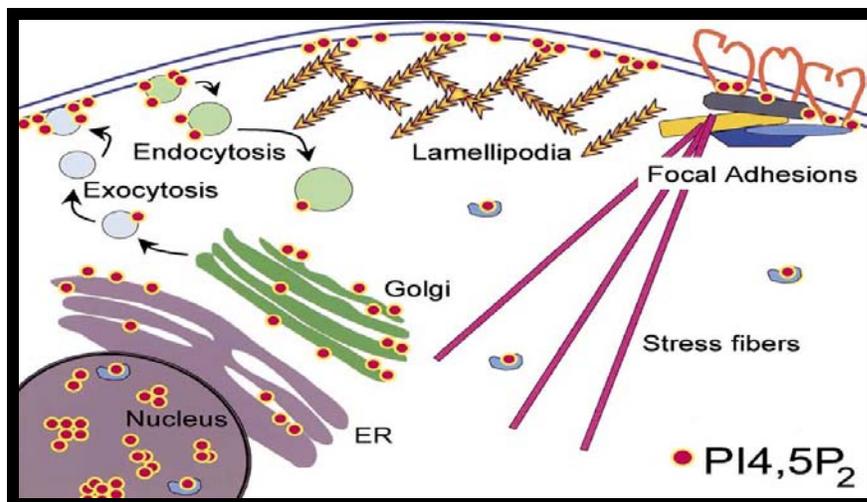


Figura 1: Localização celular do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI4,5P₂) (Doughman et al., 2003).

As PIPKs são classificadas em três subfamílias - PIPK tipo I, PIPK tipo II e PIPK tipo III - e parecem apresentar funções e localização distintas dentro das células (Doughman et al., 2003).

A PIPK Tipo I apresenta três isoformas (I α - 1q22; I β - 9q13; I γ - 19p13.3) e é encontrada na membrana plasmática, núcleo celular e no complexo de Golgi. Sua atividade é necessária para o remodelamento do citoesqueleto de actina, endocitose, secreção de neurotransmissores, regulação de canais iônicos e de pequenas proteínas G que agem como sinalizadoras (Ishihara et al., 1996; Ishihara et al., 1998; Doughman et al., 2003; Bunce et al., 2006a, Kanaho et al., 2007).

A PIPK Tipo II também apresenta três isoformas (II α - 10p12.2; II β - 17q12; II γ - 12q13.3) e é encontrada no citosol, núcleo celular e retículo endoplasmático, e suas funções biológicas ainda não estão completamente definidas. Entretanto, alguns estudos demonstraram que a PIPKII β é capaz de interagir com o receptor p55 do fator de necrose

tumoral (TNF) presente nas células dos mamíferos modulando a sua resposta (Castellino et al., 1997; Doughman et al., 2003; Bunce et al., 2006a; Bunce et al., 2006b). Outro estudo, realizado por Jones et al. (2006), demonstrou que o PI5P e a PIPKII β estão envolvidos na resposta ao estresse celular, por exemplo ao estresse oxidativo. Alguns trabalhos realizados em populações chinesas e irlandesas demonstraram que polimorfismos na PIPKII α estão associados com a esquizofrenia (He et al., 2007; Thiselton et al., 2009).

A PIPK Tipo III, mapeada no braço longo do cromossomo 2 (2q33.3), é encontrada na membrana interna da célula e está envolvida na manutenção da sua integridade (Anderson et al., 1999; Doughman et al., 2003).

Em relação às funções desempenhadas no núcleo, tanto a PIPK Tipo I como a Tipo II, especificamente I α e II β , parecem estar envolvidas com a regulação da expressão gênica, o processamento do pré-mRNA e a exportação do mRNA para o citoplasma, porém, os mecanismos pelo qual elas diretamente regulam essas funções permanecem desconhecidos (Anderson et al., 1999; Bunce et al., 2006a; Mellman et al., 2008). Há controvérsias sobre a presença da PIPKII α no núcleo (Bunce et al., 2006a); alguns autores demonstraram sua presença no envelope nuclear (Boronenkov et al., 1998) em contradição aos resultados encontrados no trabalho de Ciruela et al.(2000), onde foi demonstrado que longas transfecções resultam em quantidades significantes dessa isoforma também no núcleo. Isto foi interpretado como um artefato resultante de níveis muito altos de expressão.

Uma característica dessa família de enzimas é a especificidade de sinalização única de cada subfamília (Anderson et al., 1999). Todas as PIPKs possuem um domínio central, denominado de domínio Quinase, que é conservado entre as famílias e, um *loop* de ativação na região C-terminal da proteína que consiste de 20 a 25 aminoácidos, que é específico e conservado em cada subfamília (Figura 2) (Rao et al., 1998; Kunz et al., 2000; Doughman

et al., 2003). Elas exercem a função de catalisar uma reação similar a fosforilação, mas é a especificidade da estrutura em forma de *loop* que determina a preferência por um substrato específico, agindo, desta maneira, em distintos alvos subcelulares (Doughman et al., 2003; Heck et al., 2007).

Análises bioquímicas e moleculares demonstraram que cada subfamília é responsável pela produção de distintos segundos mensageiros lipídicos e o mecanismo molecular pelo qual elas reconhecem seu substrato específico e seu alvo celular é regulado por esse *loop* de ativação (Doughman et al., 2003; Heck et al., 2007).

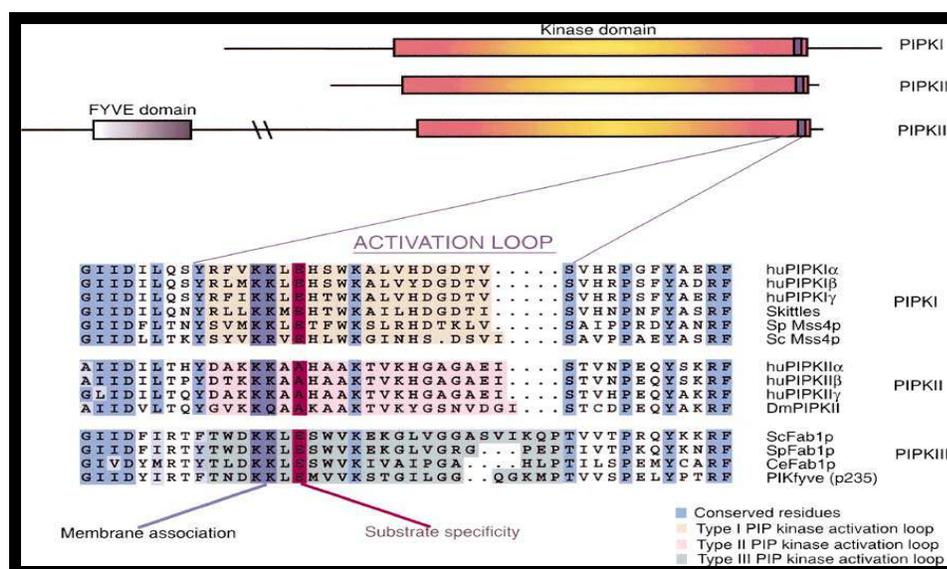


Figura 2: Estrutura das PIP Quinases (Doughman et al., 2003).

O fosfatidilinositol é um componente da membrana celular eucariótica e representa somente uma pequena porcentagem dos fosfolipídios celulares totais, mas tem um papel muito importante na transdução de sinal como precursor de diversas moléculas de segundos mensageiros. Ele é o único dentre os fosfolipídios de membrana que pode ser fosforilado

em várias posições do anel de inositol (Alberts et al., 2004; Fruman et al., 1998). O inositol possui cinco hidroxilas livres e pode, então, ser fosforilado nas hidroxilas das posições 3, 4 e 5 para gerar uma variedade de fosfoinosítídeos distintos que funcionam como segundos mensageiros para regular eventos e funções específicas nos eucariotos, como o fosfatidilinositol (PI) 3-fosfato(P) - PI3P, o PI4P e o PI5P (Fruman et al., 1998; Gardocki et al, 2005; Heck et al., 2007).

A PIPK tipo I utiliza o PI4P, o fosfoinosítídeo mais conhecido e mais abundante dentro da célula, como substrato para gerar o segundo mensageiro lipídico PI4,5P₂, dessa forma é conhecida como PI4P5K (fosfatidilinositol-4-fosfato-5-kinase). Essa é a via clássica do ciclo do fosfatidilinositol, porém, alternativamente, o PI4,5P₂ é também produzido pela PIPK tipo II através da fosforilação do substrato PI5P, mecanismo descoberto mais recentemente (Rameh et al., 1997). Dessa forma, a PIPK tipo II é conhecida também como PI5P4K (fosfatidilinositol-5-fosfato-4-kinase). O PI4,5P₂, pode ainda ser hidrolisado por uma enzima, a fosfolipase C, resultando na formação de outros segundos mensageiros, como o diacilglicerol (DAG), que ativa membros da família da proteína quinase C, e o inositol trifosfato (IP₃), responsável pela sinalização para a liberação de Ca⁺⁺ das reservas celulares (Rameh et al., 1997, Homma et al., 1998; Anderson et al, 1999; Doughman et al., 2003). A PIPK tipo III utiliza o PI3P como substrato para a produção do PI3,5P₂ (Figura 3). Existem evidências, obtidas de estudos *in vitro*, que cada uma dessas PIPKs pode usar o substrato da outra para gerar outros segundos mensageiros lipídicos em reações menos específicas. Mas, assim como as funções dessas enzimas não estão completamente elucidadas, não se sabe também se processo similar ocorre *in vivo* (Hinchliffe et al., 2002; Doughman et al., 2003).

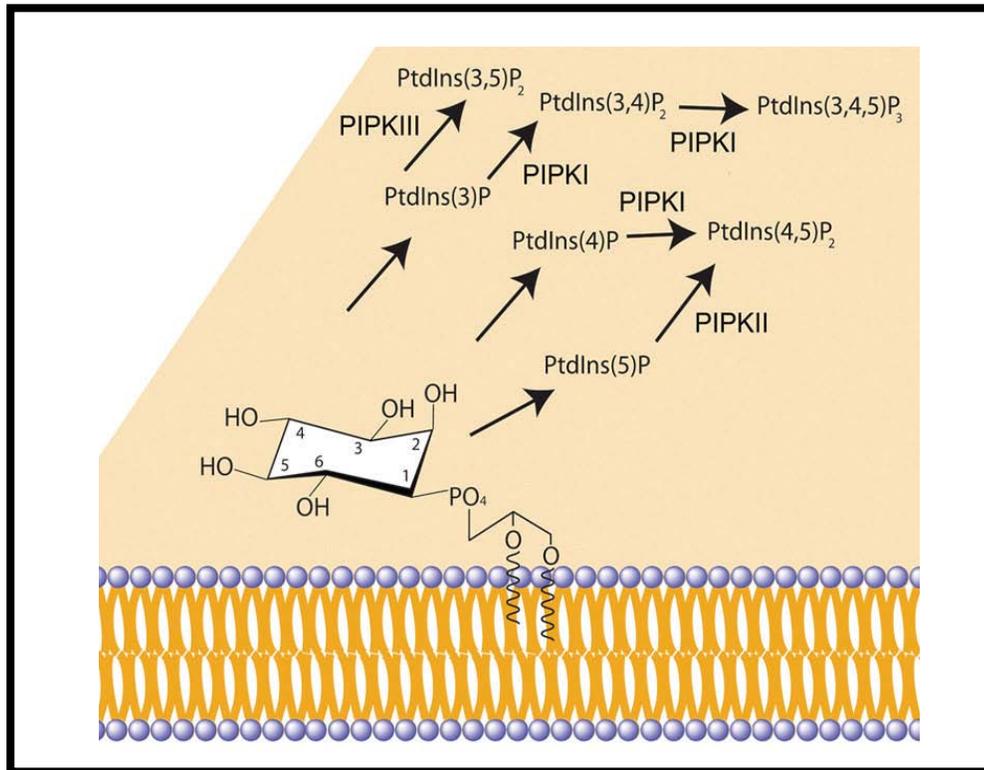


Figura 3: As PIPKs, seus substratos e produtos (Herck et al., 2007).

1.2) Eritropoese, Hemoglobinopatas e PIPKs

1.2.1) Eritropoese

A eritropoese é o processo de formação das células eritróides na medula óssea a partir das células-tronco hematopoéticas. Este processo é regulado por efeitos combinados do microambiente e de fatores de crescimento que promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação dos progenitores eritróides, e de fatores nucleares que regulam a transcrição dos genes envolvidos no estabelecimento do fenótipo eritróide (Hermine e Roméo, 2006).

A diferenciação dessas células é dada pela crescente sensibilidade dos precursores eritróides a um fator de crescimento produzido pelo tecido renal, a eritropoetina (Zago et al., 2004; Fried, 2009).

O precursor medular mais imaturo reconhecido morfológicamente na medula óssea é o proeritroblasto, que se diferencia, sucessivamente, em eritroblastos basofílico, policromático e ortocromático, que é a última célula nucleada da linhagem eritróide. A perda do núcleo do eritroblasto ortocromático dá origem aos reticulócitos, que finalmente amadurecem formando o eritrócito (Figura 4). Simultaneamente a esse processo de proliferação e maturação celular ocorre a síntese da hemoglobina (Hb) (Zago et al., 2004; Hermine e Roméo, 2006).

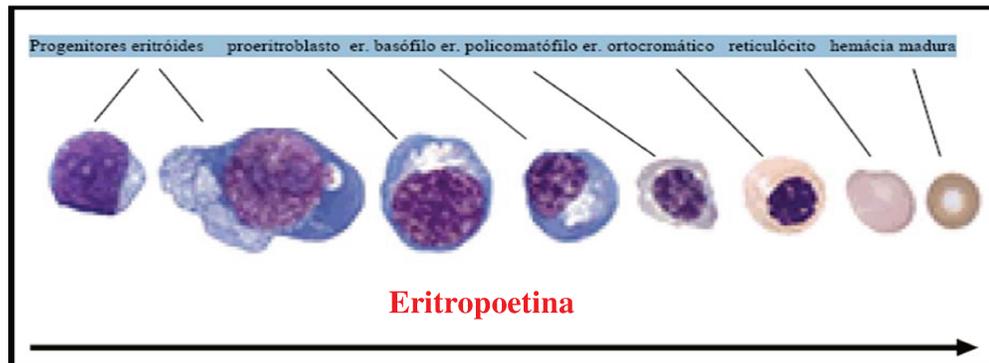


Figura 4: Cinética da eritropoese (adaptado do *site* <http://hembase.niddk.nih>).

1.2.2) As Hemoglobinas Humanas

As hemoglobinas (Hbs) humanas são proteínas tetraméricas compostas por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias globínicas do “tipo alfa” [alfa (α) ou zeta (ζ)] e duas do “tipo beta” [beta (β), delta (δ), gama (γ) ou épsilon (ϵ)]. Cada uma dessas cadeias

está associada a um grupo prostético heme, que possui um átomo central de ferro (Fe^{+2}) capaz de se ligar de forma reversível à molécula de O_2 , transportando-a dos pulmões para os tecidos e permitindo que a Hb cumpra assim sua função primordial de pigmento respiratório (Perutz et al., 1960; Bunn e Forget, 1986; Stamatoyannopoulos et al., 1994; Steinberg et al., 2001; Costa e Sonati, 2007; Ribeiro e Sonati, 2008).

A produção de Hbs varia durante o desenvolvimento. Na fase embrionária, são produzidas as Hbs Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$); no período fetal, a produção dessas Hbs dá lugar à síntese de Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), que, posteriormente, é substituída pelas Hbs A ($\alpha_2\beta_2$) e A₂ ($\alpha_2\delta_2$) na fase adulta (Bunn e Forget, 1986; Stamatoyannopoulos et al., 1994; Steinberg et al., 2001).

1.2.3) Os Genes de Globinas

Os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas apresentam cerca de 1 a 2 Kb de DNA, são formados por 3 éxons e 2 introns e estão organizados em dois agrupamentos gênicos, ou *clusters*, denominados α e β (Higgs et al., 1989).

O *cluster* α está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e é composto pelo gene embrionário ζ , por 3 pseudogenes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$ e $\psi\rho$), pelo gene μ , pelos genes da globina α duplicados (α_2 e α_1) e pelo gene θ (Figura 5) (Higgs et al., 1989; Higgs, 1993; Forget, 2001; Steinberg et al., 2001; Hughes et al., 2005; Voon e Vadolas, 2008).

O *cluster* β é composto pelo gene embrionário ϵ , por dois genes da Hb F (γ^G e γ^A), por um pseudogene ($\psi\beta$) e por dois genes de globinas adultas (δ e β) e, encontra-se

localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) (Figura 6) (Fritsch et al., 1980; Bunn e Forget, 1986; Forget, 2001; Steinberg et al., 2001).

Esses genes são expressos em diferentes fases do desenvolvimento dos indivíduos e, embora estejam localizados em cromossomos distintos, é necessário que a expressão dos mesmos ocorra de forma balanceada e equilibrada, para que a Hb seja adequadamente formada (Higgs et al., 1990; Jarman et al., 1991; Ribeiro e Sonati, 2008).

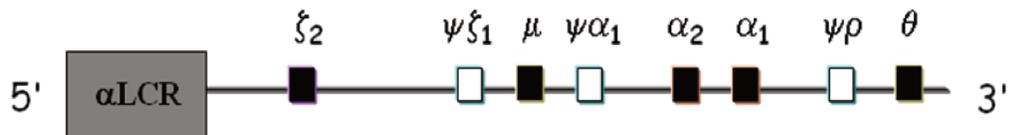


Figura 5: *Cluster alpha*. Os quadrados pretos representam os genes funcionais e os brancos os pseudogenes. α LCR (Região Regulatória do *Cluster alpha*). (figura adaptada de Voon e Vadolas, 2008).

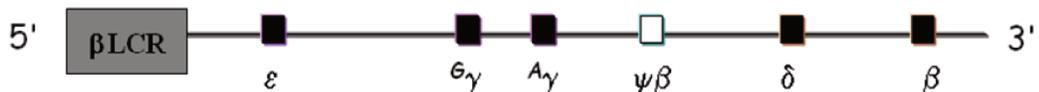


Figura 6: *Cluster beta*. Os quadrados pretos representam os genes funcionais e os brancos os pseudogenes. β LCR (Região Regulatória do *Cluster beta*) (figura adaptada de Beutler et al., 2001).

1.2.4) As Hemoglobinopatias

Alterações nos genes que sintetizam as cadeias globínicas resultam na produção de proteínas anômalas (hemoglobinopatias estruturais) ou em alterações no ritmo de síntese de um ou mais tipos de globinas (talassemias), constituindo, dessa forma, as Hemoglobinopatias Hereditárias (Bunn & Forget, 1986; Forget, 2001; Steinberg et al., 2001; Sonati e Costa, 2008).

1.2.4.1) Hemoglobinopatias estruturais

As hemoglobinopatias estruturais são, geralmente, causadas por mutações de ponto ou por pequenas inserções/deleções de bases, afetando a região codificadora do gene e, muitas vezes, causando a substituição de aminoácidos na cadeia protéica (Bunn & Forget, 1986; Zago et al., 2004).

Dentre as alterações estruturais mais importantes está a Hb S, originada por uma mutação de ponto (GAG→GTG) no gene da globina β . Esta mutação resulta na substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia β ($\beta^{\text{glu} \rightarrow \text{val}}$) da Hb. Quando em homozigose, é responsável pela Anemia Falciforme, uma condição herdada e conhecida pela gravidade e frequência, particularmente entre os povos africanos ou afro-descendentes. A Hb S quando desoxigenada sofre polimerização, formando estruturas filamentosas que se depositam nos eritrócitos, modificando sua forma e tornando-os células em forma de foice (Figura 7). Essas células são rígidas e inflexíveis, e contribuem para o processo de oclusão vascular, com conseqüentes episódios de dor e lesão de órgãos alvos que representam os fenômenos principais dessa doença (Smith et al., 1981; Costa, 2001; Steinberg, 2006; Vekilov, 2007).

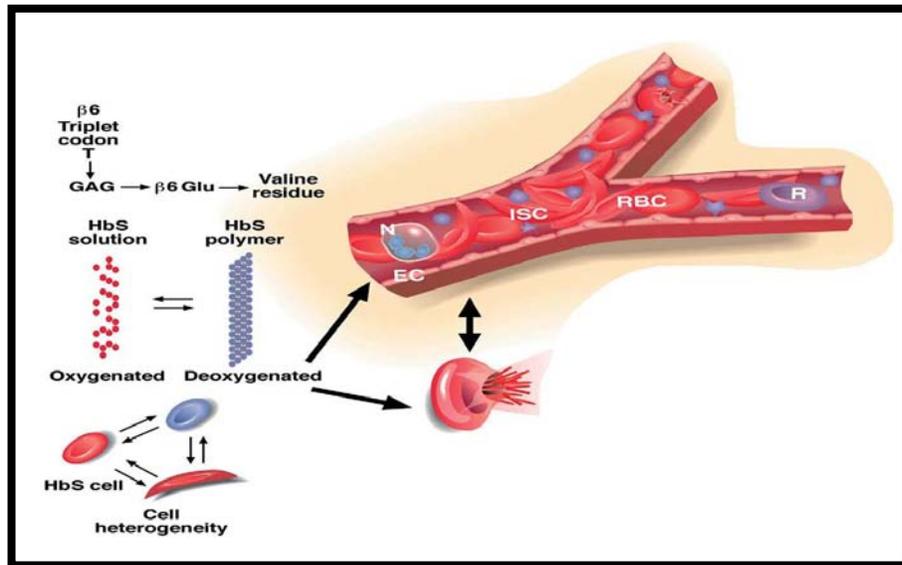


Figura 7: Fisiopatologia da Anemia Falciforme (Steinberg, 2006).

1.2.4.2) As Talassemias

As Talassemias são alterações causadas por mutações que afetam os genes das globinas, levando à redução ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias globínicas e, conseqüentemente, ao acúmulo da outra cadeia cuja produção está preservada. As Talassemias mais freqüentes e conhecidas são as β e α (Higgs, 1993; Weatherall, 1990; Weatherall e Clegg, 2001; Ribeiro e Sonati, 2008; Sonati e Costa, 2008).

1.2.4.2.1) Talassemia β

A Talassemia β resulta de alterações moleculares que levam à redução parcial ou completa da síntese de globina β . O excesso de cadeias α , extremamente instável, sofre precipitação nos precursores eritróides, leva à oxidação de suas membranas celulares e causa a destruição dessas células ainda na medula óssea (eritropoese ineficaz) ou na

circulação periférica (hemólise, predominantemente extra-vascular). Por outro lado, como a produção de Hb está reduzida, as hemácias apresentam hipocromia e microcitose (Weatherall, 1990; Weatherall e Clegg, 2001; Sonati e Costa, 2008).

As maiores prevalências da Talassemia β são observadas entre as populações da Região Mediterrânea e do Sudeste Asiático (Bunn e Forget, 1986; Stamatoyannopoulos et al., 1994; Weatherall e Clegg, 2001; Steinberg et al., 2001; Birgens e Ljung, 2007). Ela pode ser classificada em β^0 , quando as alterações suprimem totalmente a síntese da cadeia β , e em β^+ , quando há uma síntese reduzida da mesma (Weatherall, 1990; Thein, 1998).

O diagnóstico da β -talassemia é realizado a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares, e baseia-se, fundamentalmente, na gravidade da anemia, que se apresenta microcítica e hipocrômica (Cao et al., 1997).

Do ponto de vista clínico, elas são classificadas em: **Talassemia β menor** (traço talassêmico), heterozigotos assintomáticos que habitualmente não necessitam de tratamento, apesar de apresentarem microcitose, hipocromia e níveis de Hb levemente abaixo do normal (Zago, 2004); **Talassemia β intermediária**: geralmente casos sintomáticos, revela-se como uma anemia crônica moderada com níveis de hemoglobina entre 6 e 9g/dl, que se mantém espontaneamente sem necessidade transfusional contínua (Zago, 2004); **Talassemia β maior**: é resultante de homozigose ou heterozigose composta para os genes da globina β e corresponde à forma mais grave da doença, dependente de transfusão, com quadro clínico composto de anemia intensa, esplenomegalia, deformidades ósseas e graves alterações no crescimento, no desenvolvimento e na reprodução (Thein, 1998; Wenning e Sonati, 2007; Birgens e Ljung, 2007).

A definição entre talassemia maior ou intermediária é fundamental na prática clínica, pois define o tipo de tratamento que o paciente receberá. No entanto, essa distinção

nem sempre é fácil, uma vez que o quadro clínico pode ser resultante de grande número de combinações moleculares (Weatherall, 1990; Sonati e Costa, 2008).

1.2.4.2.2) Talassemia α

A Talassemia α é um distúrbio hereditário causado por mutações que afetam os genes α (α_2 e α_1), levando à redução ou ausência de síntese das globinas α . Consequentemente ocorre a tetramerização das cadeias γ e β , cuja síntese está preservada, levando à formação das Hbs Bart's e H, na vida fetal e adulta, respectivamente (Bunn e Forget, 1986; Higgs, 1993; Higgs et al., 2005; Higgs e Weatherall, 2009).

Esta alteração genética ocorre com incidência elevada entre os povos da África, Ásia, Oceania, Oriente Médio e Região do Mediterrâneo (Folayann-Esan, 1970; Heni et al., 1987; Fucharoen et al., 1988; Ozsoylu e Malik., 1982; Galanello et al., 1984; Kanavakis et al., 1986; Di Renzo et al., 1986). Na América foi descrita em vários países, como Estados Unidos, Canadá, México, Cuba, Costa Rica, Jamaica, Colômbia, Peru e Brasil (Echavarria et al., 1976; Martinez e Colombo, 1976; Higgs et al., 1981; Sonati e Costa., 1990; Sonati et al., 1991).

A Talassemia α é classificada em α^+ (genótipo $-\alpha$) e α^0 (genótipo $--$), conforme um ou ambos os genes do genoma haplóide estejam afetados (Higgs, 1993). A heterozigose, a homozigose ou a interação dessas formas levam a diferentes quadros hematológicos (Tabela 1).

Tabela 1: Genótipos e aspectos laboratoriais da Talassemia α .

TIPOS	GENÓTIPOS	ASPECTOS LABORATORIAIS
Talassemia α^+ Heterozigótica	$-\alpha/\alpha\alpha$ (ou $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$)	0 - 3% de Hb Bart's ao nascimento; alterações hematológicas mínimas ou ausentes no adulto.
Talassemia α^+ Homozigótica	$-\alpha/-\alpha$ (ou $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$)	5 - 10% de Hb Bart's ao nascimento; discretas microcitose e hipocromia no adulto.
Talassemia α^0 Heterozigótica	$--/\alpha\alpha$	5 - 10% de Hb Bart's ao nascimento; discretas microcitose e hipocromia no adulto.
Talassemia α^0 Homozigótica	$--/--$	cerca de 80% de Hb Bart's; traços de Hb H e Hbs Portland I e II; Hidropisia Fetal por Hb Bart's.
Interação α^+/α^0	$--/-\alpha$ (ou $--/\alpha^T\alpha$)	25 - 50% de Hb Bart's ao nascimento; 5 - 30% de Hb H na vida adulta; Doença da Hb H

As principais causas moleculares da Talassemia α são as deleções (Kattamis et al., 1996). A Talassemia α^+ é mais frequentemente causada pela deleção de um fragmento de 3,7 Kb de DNA (deleção $-\alpha^{3,7}$) envolvendo a região 3' do gene α_2 e 5' do gene α_1 , resultando em um único gene α híbrido (α_2/α_1), com frequências elevadas na região do Mediterrâneo e na África. Já as deleções mais comuns relacionadas à Talassemia α^0 são a ($--^{MED}$), freqüente na Bacia do Mediterrâneo (Nicholls et al., 1985; Kattamis et al., 1996), e

a (--^{SEA}), no Sudeste Asiático (Fucharoen e Winichagoon, 1987). Além disso, mutações não-delecionais, como substituições de bases e remoções/inserções de um ou poucos nucleotídeos ($\alpha^T\alpha$ ou $\alpha\alpha^T$) podem ocorrer, porém com menores frequências (Traeger-Synodinos et al., 1993; Chui et al., 2003).

A expressão dos genes do *cluster* da globina α é regulada pelo α -MRE (*α -Major Regulatory Element*), um elemento localizado 40 Kb à montante do respectivo *cluster* (Zhang et al., 2002). Mutações nessa região também causam Talassemia α^0 , apesar dos genes α permanecerem estruturalmente intactos (Higgs, 1993; Wenning et al., 2002; Ribeiro e Sonati, 2008).

A inativação ou ausência de três dos quatro genes α do genoma diplóide leva à Doença da Hb H, uma anemia hemolítica crônica de intensidade variável, que pode ser agravada por infecções, febre, ingestão de drogas oxidantes, hiperesplenismo e gravidez (Weatherall e Clegg, 2001; Chui et al., 2003). A Hb H é instável e precipita nas hemácias com o seu envelhecimento, formando corpos de inclusão e levando à lise pelo sistema retículo-endotelial, principalmente do baço. Esta condição é prevalente na Ásia (China, Tailândia, Índia) e no Mediterrâneo, sendo mais raros os casos no Brasil (Embury et al., 1980; Zago et al., 1984; Zago e Costa, 1985; Sonati e Costa., 1990; Sonati et al., 1991).

A doença manifesta-se com um quadro clínico que guarda relação com a quantidade de Hb H produzida (Higgs, 1993). A variabilidade nos níveis dessa Hb está, por sua vez, relacionada às diferentes bases moleculares da doença (deleções gênicas *versus* mutações não delecionais e genes α_2 , que têm maior nível de expressão, *versus* genes α_1 , menos expressos); essa diversidade tem, no entanto, sido frequentemente observada também em pacientes com genótipos α idênticos, o que sugere o envolvimento de outros fatores,

genéticos e ambientais na modulação da gravidade desse tipo de talassemia (Kanavakis et al., 1996; Chui et al., 2003).

Wenning et al. (2009), em estudo realizado recentemente no Laboratório de Hemoglobinopatias do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, analisou a expressão gênica diferencial, através das técnicas de DDRT-PCR (*Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) (Liang e Pardee, 1992) e de Hibridização Subtrativa Supressiva (*SSH*) (Diatchenko et al., 1996), em reticulócitos de dois irmãos com Doença de Hb H (genótipo $-\alpha^{3,7}/--^{SEA}$), um do sexo masculino e outro do sexo feminino, de origem étnica mista (pai chinês e mãe afro-descendente), cujos níveis de Hb H eram, ao diagnóstico, de 18,7% e de 5,0%, respectivamente (Tabela 2) (Wenning, 2007; Wenning et al., 2009).

Tabela 2: Dados dos pacientes com Doença da Hb H estudados por Wenning et al., 2009.

	MKS	FKS
GV ($10^6/\mu\text{l}$)	4,45	4,55
Hb (g/dl)	9,4	7,6
Ht (%)	35,5	26,5
VCM (fl)	79,8	58,2
HCM (pg)	21,1	16,7
RDW – CV (%)	20,2	28,1
RET (%)	3,9	1,87
Perfil Hb	HbA ₂ +HbA+Hb H	HbA ₂ +HbA+Hb H (+Hb Bart's)
HbA ₂ (%)	1,23	1,27
HbF (%)	1,53	1,74
Hb H (%)	18,7	5,0
Genótipo	$-\alpha^{3,7}/--^{SEA}$	$-\alpha^{3,7}/--^{SEA}$

MKS = paciente masculino; **FKS** = paciente feminino

GV = glóbulos vermelhos; **Hb** = hemoglobina; **Ht** = hematócrito; **VCM** = volume corpuscular médio; **HCM** = hemoglobina corpuscular média; **RDW** = amplitude de distribuição dos eritrócitos; **RET** = reticulócitos

Dentre os vários transcritos diferencialmente expressos isolados neste estudo, dois chamaram a atenção por terem sido detectados por ambas as técnicas, o da própria globina β e o correspondente ao gene da enzima PIPKII α . Esses dois genes apresentaram expressão proporcionalmente aumentada no paciente que tinha os maiores níveis de Hb H, sugerindo a hipótese de que a proporção mais elevada de Hb anômala dever-se-ia a uma taxa maior de transcrição do gene da globina β , e que, de alguma forma, sua expressão seria influenciada pela enzima PIPKII α (Wenning, 2007; Wenning et al., 2009). Complementarmente, Wenning et al. compararam, por PCR em Tempo Real, as taxas de expressão do gene

PIP2II α em reticulócitos de dois outros irmãos com Talassemia α , um com 5% e o outro com 12,4% de Hb H, e de três pacientes com Talassemia β intermediária (dados não publicados). De forma similar, o gene da PIP2II α apresentou-se mais expresso nos pacientes com Doença da Hb H, sendo a taxa de expressão do paciente com o maior nível da variante a mais elevada. Já nos pacientes com talassemia β os resultados foram opostos: a expressão desse gene encontrou-se diminuída, dados que reforçam a hipótese de relação entre os genes PIP2II α e da globina β .

1.2.5) As PIPKs e as células eritróides

Em 1989, Ling et al. purificaram a PIPK da membrana dos eritrócitos, revelando algumas das propriedades bioquímicas desta enzima. Em 1990, Bazenet et al. caracterizaram duas formas da PIPK nos eritrócitos: a PIPK tipo I e a PIPK tipo II. Eles demonstraram que a PIPK tipo I é uma proteína da membrana do eritrócito com um peso molecular de 68 kDa, enquanto que a PIPK tipo II é citosólica com 53 kDa (Bazenet et al., 1990). Este mesmo estudo demonstrou que a PIPK Tipo II está presente em grandes quantidades em células provenientes da medula óssea, o que poderia influenciar, através da produção do PI4,5P₂, as células precursoras eritróides (Bazenet et al., 1990). Além disso, evidências indicam que a fosforilação de proteínas exerce um efeito na maturação dos eritrócitos e na manutenção do seu formato discóide (Backman, 1988).

A PIP2II α , cujo gene se encontra localizado no braço curto do cromossomo 10 (10p12), foi a primeira PIPK a ser clonada dos eritrócitos (Boronenkov e Anderson, 1995).

O trabalho de Wenning et al. (2009) foi o primeiro a demonstrar que sua expressão pode estar aumentada em pacientes com Doença da Hb H. Esta enzima não havia sido previamente encontrada em reticulócitos e sua relação com a produção de globinas e com as hemoglobinopatias ainda não está definida (Wenning et al., 2009).

Como não há, de nosso conhecimento, nenhum trabalho na literatura avaliando a expressão dessas quinases em células eritróides, estudos que busquem elucidar o papel da PIPK tipo II α e das outras subfamílias nestas células e determinar sua relação com a expressão dos genes de globinas podem auxiliar na obtenção de uma maior compreensão sobre os mecanismos regulatórios envolvidos na síntese de Hb.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- I. Avaliar o perfil de expressão do gene da PIPKII α durante a diferenciação eritróide humana em cultura de células CD34⁺ de indivíduos saudáveis;
- II. Avaliar o perfil de expressão dos genes das demais PIPKs durante a diferenciação eritróide desses indivíduos;
- III. Comparar os perfis de expressão gênica das PIPKs com os dos genes das globinas humanas durante a diferenciação eritróide;
- IV. Adicionalmente, avaliar o perfil de expressão dos genes das PIPKs durante a diferenciação eritróide humana em cultura de células CD34⁺ de pacientes com hemoglobinopatias (Talassemia α , Talassemia β e Anemia Falciforme).

3. SUJEITOS, MATERIAIS E MÉTODOS

3. SUJEITOS, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Grupo Normal e Pacientes

Para esse estudo foram coletadas amostras de sangue periférico (36 a 54 ml) em tubos de heparina lítica de 11 indivíduos saudáveis (alunos e funcionários da UNICAMP e do Hemocentro de Pernambuco), que apresentaram valores hematimétricos e padrões de Hb normais.

Adicionalmente, amostras de sangue periférico (36 a 54ml) de seis pacientes com hemoglobinopatias também foram coletadas para esse estudo, sendo dois com Talassemia α (Doença da Hb H), dois com Talassemia intermedária β $^{+\beta+}$ e dois com Anemia Falciforme. Dois dos pacientes foram provenientes do Hemocentro da UNICAMP (um com Anemia Falciforme e outro com talassemia α), enquanto que os outros quatro foram provenientes do Hemocentro de Pernambuco (Hemope) (um α -talassêmico, os dois pacientes β -talassêmicos e um com Anemia Falciforme). Os dados hematológicos dos pacientes encontram-se nas Tabelas 3, 4 e 5.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer CEP nº 098/2008) e pela Comissão de Ética em Pesquisa (CONEP), em 07/04/2008.

O material biológico foi obtido após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos pacientes e pelos indivíduos saudáveis (grupo normal).

Tabela 3: Dados dos pacientes com Doença da Hb H estudados no presente trabalho.

	JKW (F)	FMM (M)
GV (10 ⁶ /μl)	4,1	6,45
Hb (g/dl)	8,3	11,7
Ht (%)	30,3	44,4
VCM (fl)	73,9	68,8
HCM (pg)	20,2	18,1
RDW – CV (%)	23,8	23,7
RET (%)	4,23	1,93
Perfil Hb	HbA ₂ +HbA+Hb H+HbBart's	HbA ₂ +HbA+Hb H+Hb Bart's
HbA ₂ (%)	1,1	1,5
HbF (%)	0,9	0,2
Hb H (%)	16,8	10
Genótipo	- - SEA/ α ^{HpH} α	- α ^{3,7} /- -

F = feminino; **M** = masculino; **GV** = glóbulos vermelhos; **Hb** = hemoglobina; **Ht** = hematócrito; **VCM** = volume corpuscular médio; **HCM** = hemoglobina corpuscular média; **RDW** = amplitude de distribuição dos eritrócitos; **RET** = reticulócito.

Tabela 4: Dados dos pacientes com Talassemia β.

	MAFL (F)	ELS (M)
GV (10 ⁶ /μl)	2,95	4,17
Hb (g/dl)	6,0	7,0
Ht (%)	20,4	24,3
VCM (fl)	69,2	58,3
HCM (pg)	20,3	16,8
RDW – CV (%)	-	-
RET (%)	3,2	5,3
Perfil Hb	HbA ₂ +HbA+HbF	HbA ₂ +HbA+HbF
HbA ₂ (%)	7,1	7
HbF (%)	14,1	14,3
Genótipo	IVS-I6 (T-C)/IVS-I6(T-C)	IVS-I6(T-C)/IVS-I6(T-C)

F = feminino; **M** = masculino; **GV** = glóbulos vermelhos; **Hb** = hemoglobina; **Ht** = hematócrito; **VCM** = volume corpuscular médio; **HCM** = hemoglobina corpuscular média; **RDW** = amplitude de distribuição dos eritrócitos; **RET** = reticulócito.

Tabela 5: Dados dos pacientes com Anemia Falciforme.

	JOS (M)	JJS (F)
GV (10 ⁶ /μl)	3,19	3,31
Hb (g/dl)	9,0	8,4
Ht (%)	25,7	27,2
VCM (fl)	80,6	82,2
HCM (pg)	28,2	25,4
RDW – CV (%)	22	-
RET (%)	-	10,3
Perfil Hb	HbA ₂ +HbS+HbF	HbA ₂ +HbS+HbF
HbA ₂ (%)	3,4	3,3
HbF (%)	13,1	6,8
Hb S (%)	81,3	89,9
Genótipo	β^S/β^S	β^S/β^S

F = feminino; **M** = masculino; **GV** = glóbulos vermelhos; **Hb** = hemoglobina; **Ht** = hematócrito; **VCM** = volume corpuscular médio; **HCM** = hemoglobina corpuscular média; **RDW** = amplitude de distribuição dos eritrócitos; **RET** = reticulócito.

3.2) Cultura de células CD34⁺ hematopoiéticas de sangue periférico

Todas as células sanguíneas maduras originam-se de uma pequena população de células tronco hematopoiéticas na medula óssea que são caracterizadas por uma extensa capacidade de proliferação e diferenciação. A identificação e purificação dessas células têm sido focadas em antígenos presentes na superfície celular. O marcador mais usado para isolamento, purificação e manipulação das células-tronco e progenitoras é o antígeno CD34. O antígeno CD34⁺ é uma glicoproteína de membrana expressa em células progenitoras hematopoiéticas humanas, células progenitoras endoteliais, células endoteliais vasculares e em algumas células do tecido fetal. As células progenitoras hematopoiéticas

apresentam uma frequência de aproximadamente 0,05-0,2% no sangue periférico, de 0,1-0,5% no cordão umbilical e de 0,5-3% na medula óssea (De Wynter et al., 1998).

3.2.1) Separação das Células Mononucleares

Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram diluídas em solução de tampão fosfato/salina (PBS), suplementado com ACD (ácido citrato dextrose) e BSA (albumina sérica bovina) - PBS+BSA+ACD - e colocadas em gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden) por 30 minutos a 1500 rpm, em temperatura ambiente, para isolamento das células mononucleares. A camada formada na interface foi coletada, as células foram lavadas com PBS+BSA+ACD e, em seguida, as hemácias foram lisadas em tampão apropriado por 15 minutos em gelo, para se evitar qualquer contaminação por essas células na cultura (Malik et al., 1998).

3.2.2) Isolamento das Células CD34⁺

Após a lise, as células foram lavadas, novamente, com PBS e ressuspensas em 300 µl do mesmo para início da marcação com os anticorpos para isolamento das células CD34⁺. Essas células foram separadas através da utilização de *beads* imunomagnéticas associadas a anticorpos anti-CD34⁺ (Indirect CD34 Micro Bead Kit Human, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), seguindo-se as orientações do fabricante. Após o tempo de incubação com os anticorpos, as células foram passadas por uma coluna LS (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) presa a um suporte magnético, onde as células CD34⁺ ficaram retidas na coluna, enquanto as outras (monócitos e

linfócitos) foram coletadas em um tubo tipo “falcon”. Para isolarmos as CD34⁺ da coluna, retiramos a mesma do suporte magnético e com uma leve pressão por meio de um êmbolo, as células marcadas se soltaram da coluna e foram coletadas em um novo tubo.

Após essa separação, as células CD34⁺ foram lavadas com PBS+BSA+ACD por 10 minutos a 1200 rpm e ressuspendidas em 1 ml da mesma solução para contagem em câmara de Neubauer.

Para se verificar a pureza das células obtidas, 2 x 10⁴ células foram separadas e marcadas com Monoclonal mouse anti-human CD34 Class III/RPE, Clone BIRMA-K3 (Dako Cytomation) para citometria de fluxo (citômetro FACSCalibur, BD). Além disso, verificou-se a viabilidade celular por meio do corante azul de trypan e a morfologia celular foi acompanhada por meio de lâminas de *citospin* coradas com Leishman.

3.2.3) Condições de Cultivo das Células CD34⁺

Após a separação, as células CD34⁺ foram cultivadas em 5% de CO₂ a 37°C por um período de 13 dias em meio líquido *Iscoves's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM; GIBCO™, Invitrogen Corporation, USA) preparado com bicarbonato de sódio (Merck, Germany), glutamina (GIBCO™, Invitrogen Corporation, USA), alfa-tioglicerol (Sigma Aldrich, USA), penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich, USA), fungizone (Sigma Aldrich, USA) e suplementado com BSA Culture Grade (USBiological, Swampscott, MA, USA), bicarbonato de sódio 7,5% (Sigma Aldrich, USA), uma solução de lipossomos (colesterol, ácido oléico e fosfatidilcolina dipalmitol – Sigma Aldrich, USA), apo-transferrina (Sigma Aldrich, USA), Soro Fetal Bovino (SFB; 10% - dias 0 a 7 e 30% - dias 7 a 13; GIBCO, Invitrogen Corporation, USA), 50ng/ml de *Stem Cell Factor* (SCF; PreproTech, Inc, Rocky

Hill, NJ, USA), 5ng/ml de Interleucina 3 (IL-3; PrepoTech, Inc, Rocky Hill, NJ, USA) e 1U/ml de Eritropoetina (Epo; Eprex3000, Vetter Pharma, Ravensburg, Germany), apropriado para sua proliferação e diferenciação (Ugo et al., 2004).

A partir do 7º dia da cultura, as células foram contadas em câmara de Neubauer para acréscimo de mais meio de cultura e de fatores de crescimento se necessário, mantendo-se a densidade de 1×10^5 células/ml.

As células foram coletadas nos dias 7, 10 e 13 da cultura para acompanhamento da diferenciação eritróide através da citometria de fluxo e da morfologia celular por citospin (Figura 8) e, para extração das amostras de RNA que foram utilizadas na análise da expressão gênica.

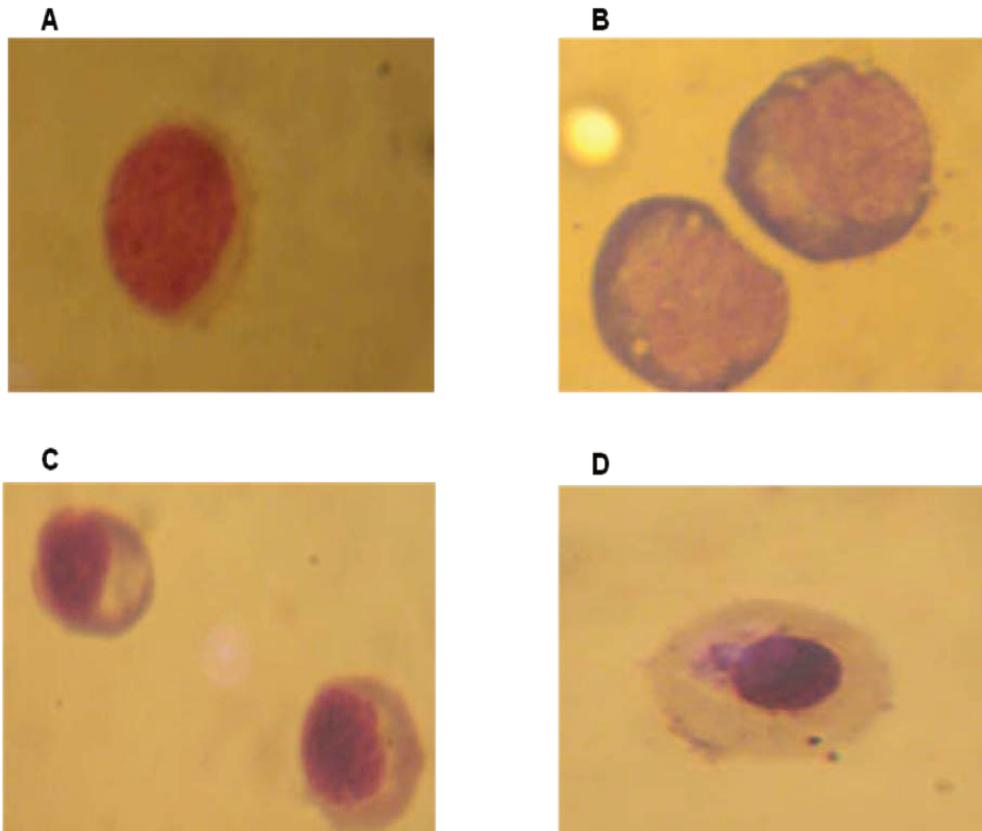


Figura 8: Morfologia celular durante a diferenciação eritróide. Lâminas coradas com Leishman: **A** (célula CD34+ isolada do sangue periférico), **B** (7º dia da cultura predomínio de proeritroblastos), **C** (10º dia – predomínio de eritroblastos basofílicos) e **D** (13º dia – predomínio de eritroblastos ortocromáticos).

3.3) Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para a análise qualitativa ou quantitativa de células ou partículas (uma a uma) em suspensão através de um fluxo. O reconhecimento dessas células é feito por meio de anticorpos marcados com fluorocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocianato (FITC), que ao serem

estimulados por um feixe de laser emitem um fóton que é captado por sensores do equipamento (Shapiro, 2003).

O processo de diferenciação eritróide foi acompanhado através dessa técnica utilizando-se anticorpos de superfície celular (anti-CD71 e anti-glicoforina A) e citoplasmática (anti-hemoglobina fetal) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA):

- Anti-receptor de transferrina (conjugado com FITC) – CD71: marcador de células eritróides jovens;
- Anti-glicoforina A (conjugado com PE) - GPA: marcador de células eritróides maduras;
- Anti-Hemoglobina Fetal (conjugado com FITC): para acompanhar a produção de hemoglobina fetal (Hb F) durante o processo de diferenciação celular;
- IgG: controle negativo (isotipo controle não relacionado).

A concentração de células utilizadas para a realização da citometria variou de 2×10^4 a 1×10^5 por tubo, num volume final de 100 μ l de PBS.

A marcação com o anticorpo anti-Hb F foi realizada após a permeabilização das membranas citoplasmáticas das células com o kit Fix & Perm (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA). As células foram incubadas por 15 minutos com 50 μ l da solução A (fixadora), lavadas com PBS e, em seguida, incubadas com 50 μ l da solução B (permeabilizante) e com 3 μ l do anticorpo anti-Hb F por 30 minutos a 4°C, sem a presença de luz.

Ao mesmo tempo, as células foram também incubadas, separadamente, com 3µl dos anticorpos CD71/GPA e IgG por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz.

Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com 500µl de PBS e centrifugadas a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 500µl de PBS e conservadas a 4°C (no escuro) até o momento da aquisição pelo citômetro (FACSCalibur Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Na figura 9, podemos observar a diferenciação eritróide durante os 13 dias da cultura.

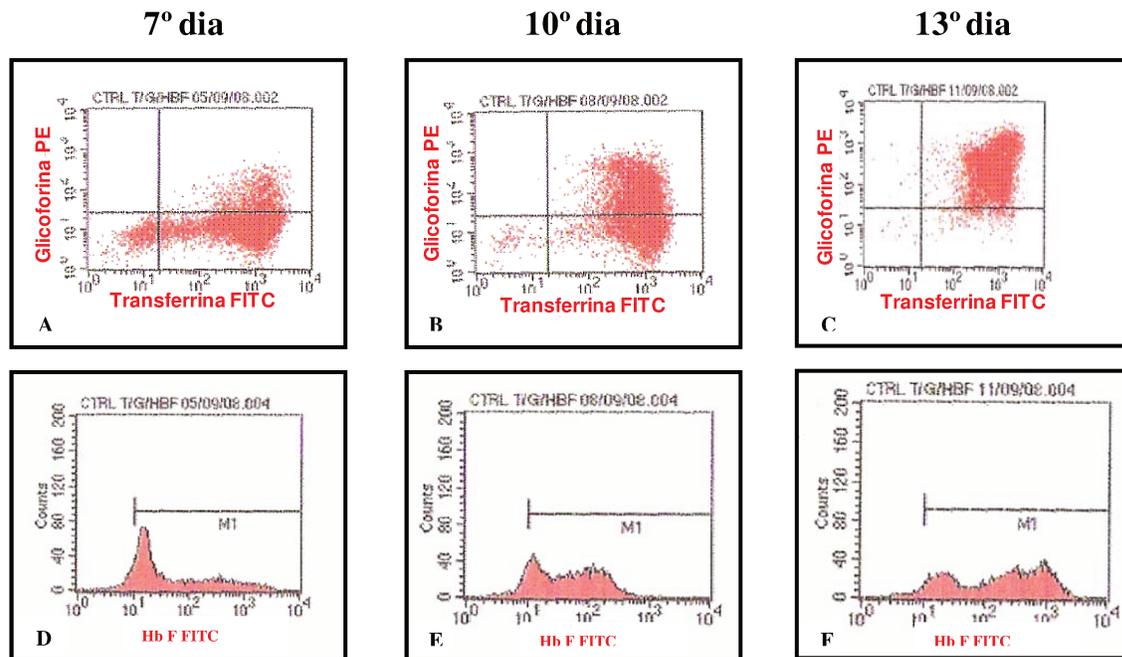


Figura 9: Dot plots da citometria de fluxo. As figuras A, B e C representam a marcação anti-receptor de transferrina (eixo x) e anti-glicoforina A (eixo y) nos dias 7, 10 e 13 da cultura. O quadrante superior direito indica a marcação dupla (ambos os anticorpos), indicando a maturação celular. As figuras D, E e F representam o aumento da produção de Hb Fetal durante a diferenciação eritróide.

3.4) Extração de RNA

A extração das amostras de RNA foi realizada utilizando-se os kits comerciais RNeasy Mini e Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), segundo protocolo do fabricante. Pelo fato da quantidade de células não ser tão abundante, optamos pelo uso dos kits comerciais que nos forneceram um RNA de melhor qualidade e pureza, que são essenciais para uma boa transcrição.

A determinação da concentração e da pureza do material foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, DE, USA). A integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 10). Após esses procedimentos, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C e, posteriormente, submetidas à transcrição.

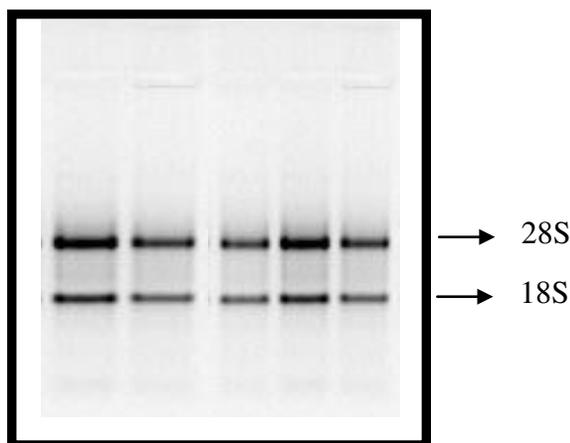


Figura 10: Gel de agarose a 1,5% com amostras de RNA das células das culturas de pacientes e de indivíduos saudáveis. As subunidades 28S e 18S correspondem ao RNA ribossomal, indicando a integridade da amostra.

3.5) Síntese de cDNA (DNA complementar) Através de Transcrição Reversa

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript IIITM Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, USA). Foram utilizados 2µg de cada amostra de RNA para a transcrição. Inicialmente, as amostras foram tratadas com 1U da enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies, USA), por 15 minutos, à temperatura ambiente, para remoção de DNA contaminante que, posteriormente, foi inativada pela adição de 25 mM de EDTA sob incubação a 65°C por 5 minutos. Após essa etapa, foram adicionados 1µl de 50uM de um primer 3' ancorador (oligonucleotídeo de desoxitimidina - oligo [dT]) que se associa à cauda Poli A, atuando como iniciador para a transcriptase reversa e 1µl de tampão de anelamento, com incubação a 65°C por 5 minutos e a 4°C por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados para cada amostra 10µl de tampão (contém 10mM de MgCl₂ e 1mM de cada dNTP) e 2µl da enzima SuperScript III. A reação foi colocada em termociclador (Eppendorf) por 50 minutos a 50°C, seguida por 5 minutos a 85°C. Após esse procedimento, as amostras foram quantificadas e estocadas a -20°C (ou -80°C).

3.6) Verificação da Síntese de cDNA

Após a reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA foram utilizadas como molde da reação de PCR para amplificação de parte do gene da beta-actina (β -actina), correspondente a um fragmento de 640 pb, para verificar a qualidade do cDNA transcrito. As reações foram realizadas com 1µl do cDNA obtido, 5,0µl de tampão de amplificação

10x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCL 50 mM, Invitrogen), 1,5µl de MgCl₂ 50Mm, 1,5µl de dNTP 10 mM, 1µl de cada *primer* para o gene da beta actina: BAC_F (5'-AGGCCAACCGCGAGAAG-3') e BAC_R (5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA - 3'), ambos na concentração de 10 µM, 0,3µl de Taq Polimerase 5U/µl (Invitrogen) e água para um volume final de 50µl de reação. A amplificação foi feita a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C - 30 segundos, 58°C - 30 segundos e 72°C - 1 minuto, com extensão final de 72°C por 7 minutos em termociclador (Eppendorf). Os produtos da PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 11).

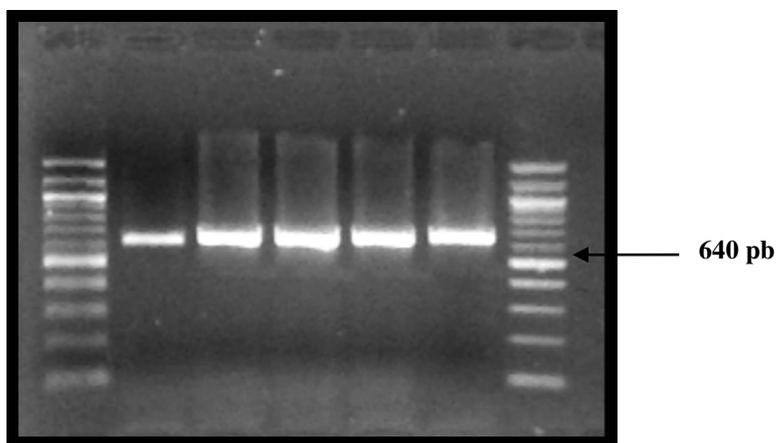


Figura 11: Amplificação do gene β -actina (gel de agarose a 1,5%) de amostras de cDNA das células de pacientes e de indivíduos saudáveis. As bandas correspondem a um fragmento de 640 pb.

3.7) PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT- PCR)

A qRT-PCR tem sido, frequentemente, utilizada para a quantificação de transcritos, sendo a inovação mais promissora aplicada à RT-PCR convencional (Vanguilder et al., 2008). O método é baseado no aumento da intensidade da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda ou de um agente fluorescente intercalante de DNA de dupla fita, como é o caso do SyBR Green (Higushi et al., 1993; Gachon et al., 2004).

O equipamento de qRT-PCR faz a leitura da fluorescência emitida pela formação de novas moléculas durante a reação e faz a coleta de dados a cada ciclo de amplificação, permitindo a visualização em tempo real de todas as fases da cinética (geométrica ou exponencial, linear e platô) da reação.

Foi utilizado como sistema de detecção o reagente Platinum SyBR Green qPCR Supermix-UDG with ROX (Invitrogen), que contém todos os reagentes necessários para a PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, Taq polimerase) além do corante SyBR Green.

A detecção da amplificação foi realizada no equipamento Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Primeiramente, um limiar de detecção denominado *threshold* é estabelecido. À medida que a quantidade de produto amplificado em determinada amostra produz uma curva de amplificação que ultrapassa esse limiar, esse ponto de cruzamento é denominado Ct (*threshold cycle*) e se refere à fase exponencial da reação. Quanto menor o Ct da reação, maior a expressão do gene, isto é, quanto mais cópias

houver no início da reação, mais precocemente ele será amplificado. A Figura 12 mostra o monitoramento das curvas de amplificação do (qRT-PCR).

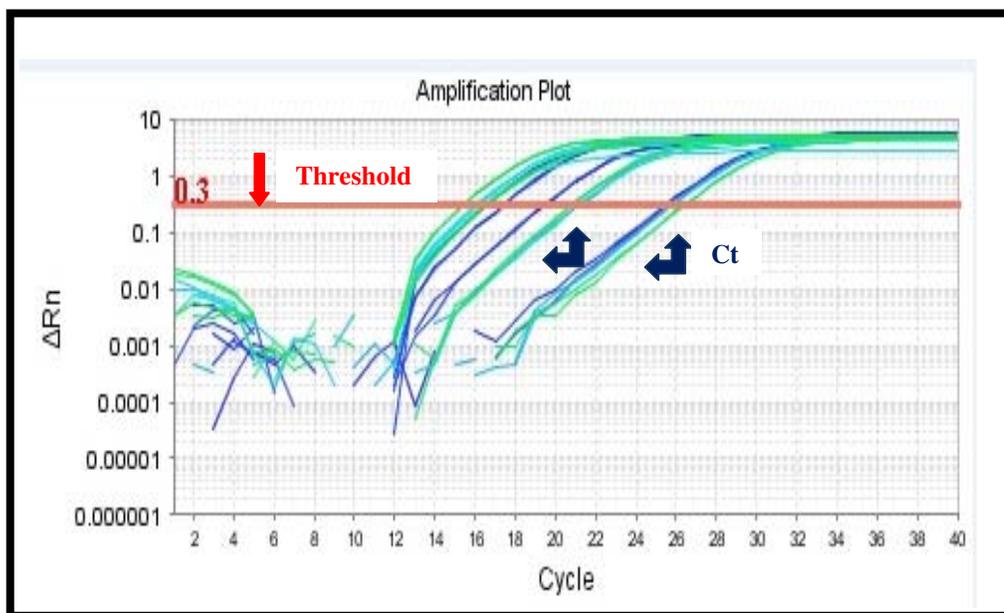


Figura 12: Curva de amplificação de qRT-PCR. O traço horizontal vermelho representa o limiar de detecção da fluorescência (*threshold*). A quantidade de produto amplificado em uma reação produz uma curva de amplificação que ultrapassa o limiar de detecção, denominada Ct (*threshold cycle*), representado aqui pelas setas azuis.

As reações foram realizadas em duplicata, em placas de 96 poços com tampas óticas que permitem a passagem da luz e ensaiadas em um volume total de 12 μ l, sendo 6 μ l de SyBR Green e 6 μ l de reagentes específicos (3 μ l de *primers* + 3 μ l da amostra de cDNA). A cada conjunto de *primers* foram adicionadas reações controles, sem o cDNA (*NTC – no template controls*). Esse procedimento garantiu que a fluorescência emitida não estava

sendo gerada por ampliações inespecíficas. Os parâmetros de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e nos 20 minutos finais do procedimento, a temperatura foi elevada de forma gradual de 60°C para 95°C. Neste momento ocorre a desnaturação do produto da PCR, com redução repentina da emissão de fluorescência pelo SyBR Green (curva de *melting* ou curva de dissociação), onde podemos analisar a qualidade da reação (ausência de contaminantes ou produtos inespecíficos) (Figura 13).

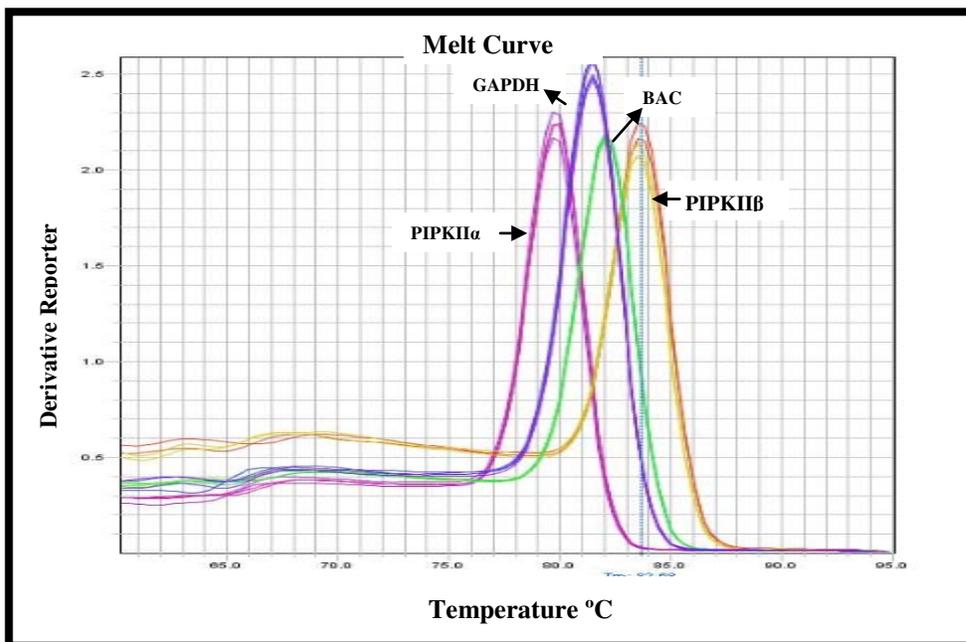


Figura 13: Curva de *melting* (ou de dissociação) para avaliar a qualidade da reação.

3.7.1 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados através do software *Primer Express* (Applied Biosystems, USA) e submetidos ao programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar a homologia com o gene de interesse. A formação de estruturas como *dimers* e *hairpins*, ou de qualquer outra estrutura que pudesse comprometer a qualidade das reações, foi avaliada através do programa *Gene Runner*. Para garantir a confiabilidade dos resultados, alguns itens foram cuidadosamente considerados para o desenho dos *primers*: os iniciadores foram desenhados, quando possível, em *exons* diferentes; o tamanho dos produtos gerados por cada conjunto de iniciadores esteve, como preconizado, entre 50 e 150 pb; o tamanho dos fragmentos obtidos na reação e a detecção de eventuais produtos inespecíficos foram aferidos por PCR, utilizando-se os iniciadores selecionados e a própria amostra de cDNA como molde da reação; os produtos gerados foram observados em gel de agarose a 1,5% e comparados ao marcador de tamanho molecular. Os *primers* desenhados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Sequências, tamanhos dos fragmentos, concentrações utilizadas e eficiência dos *primers* empregados na amplificação dos genes avaliados pela qRT-PCR.

Gene	Sequência dos <i>Primers</i>	Tamanho do fragmento	Concentração utilizada (nM)	Eficiência do <i>Primer</i>
GAPDH_RT-F	5' GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC 3'	89 pb	300	100%
GAPDH_RT-R	5' CCA CTT GAT TTT GGA GG GAT CT 3'			
Beta Actina_RT-F	5' AGG CCA ACC GCG AGA AG 3'	79 pb	300	100%
Beta Actina_RT-R	5' ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A 3'			
Gama_Globina_RT_F	5' TGT GGA AGA TGC TGG AGG AGA 3'	71 pb	150	100%
Gama_Globina_RT_R	5' CAA AGA ACC TCT GGG TCC ATG 3'			
Beta_Globina_RT_F	5' CAC TGT GAC AAG CTG CAC GTG 3'	67 pb	150	100%
Beta_Globina_RT_R	5' GCA CAC AGA CCA GCA CGT TG 3'			
Alfa_Globina_RT_F	5' GGC GAG TAT GGT GCG GAG 3'	71 pb	150	100%
Alfa_Globina_RT_R	5' TGC GGG AAG TAG GTC TTG GT 3'			
PIP5K1_Alfa_RT_F	5' GGG GAA CAC AAG GCA CAA GT 3'	75 pb	150	100%
PIP5K1_Alfa_RT_R	5' TAA AAC ATC AGG ACG ACC AAG G 3'			
PIP5K1_Beta_RT_F	5' GAT ACG GAA ACA TAC AAC GCG 3'	76 pb	150	100%
PIP5K1_Beta_RT_R	5' CCA TGA TCT TGA AGC TTT CTA GC 3'			
PIP5K1_Gama_RT_F	5' CTG TCG CCT TCC GCT ACT TC 3'	76 pb	150	100%
PIP5K1_Gama_RT_R	5' GGC TCA TTG CAC AGG GAG TAC 3'			
PIP4K2_Alfa_RT_F	5'CCA CCG TTT GTC TGT GTA TAG GA 3'	99pb	300	100%
PIP4K2_Alfa_RT_R	5' TTC AGA GTT GGC AGT TCT TTG G 3'			
PIP4K2_Beta_RT_F	5' TGC TGC CAA AAC GGT GAA A 3'	80 pb	150	99,5%
PIP4K2_Beta_RT_R	5' CGT TGA AGC GTT TGG AGT ACT G 3'			
PIP4K2_Gama_RT_F	5' CCA GTG AGG ACA TTG CTG ACA T 3'	83 pb	150	100%
PIP4K2_Gama_RT_R	5' CAG AAG CGT GTT GCC ATG G 3'			
PIP5K3_RT_F	5' ACT CTG AGC CAT CCT GGT TTA A 3'	114 pb	150	100%
PIP5K3_RT_R	5' ATG TGC GCT TGC TAG GAC TG 3'			

3.7.2 Padronização da concentração dos *primers*.

Em qRT-PCR a concentração ótima de *primer* a ser utilizada é aquela em que o gene de interesse apresenta o menor *Ct* (*Cycle threshold*), ou seja, o ciclo no qual tem início a amplificação sem a geração de produtos inespecíficos. Nesta etapa, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações utilizando cada um dos conjuntos de *primers* nas concentrações finais de 150 nM, 300 nM e 600 nM. As concentrações dos *primers* para cada gene analisado estão demonstradas na Tabela 6.

3.7.3 Análise da eficiência da amplificação

Depois de estabelecidas as concentrações ideais dos *primers*, analisamos a eficiência das reações de amplificação. Nesta etapa, utilizamos a concentração de *primer* determinada acima e variamos a concentração de amostra. Para que a qRT-PCR seja confiável e reprodutível, são necessárias condições ótimas de reação, ou seja, as amplificações devem apresentar 100% de eficiência a cada ciclo de reação. Essa eficiência é obtida por meio da fórmula $10^{(-1/\text{slope})}$, onde *slope* significa o coeficiente de inclinação da curva e deve ser próximo de 2; isto significa a duplicação do material genômico a cada ciclo de amplificação e corresponde a 100% de eficiência (Meijerink et al, 2001). A eficiência de amplificação de cada conjunto de *primers* obtida encontra-se na Tabela 6. Na figura 14 encontra-se a curva de eficiência de alguns dos *primers* utilizados neste trabalho.

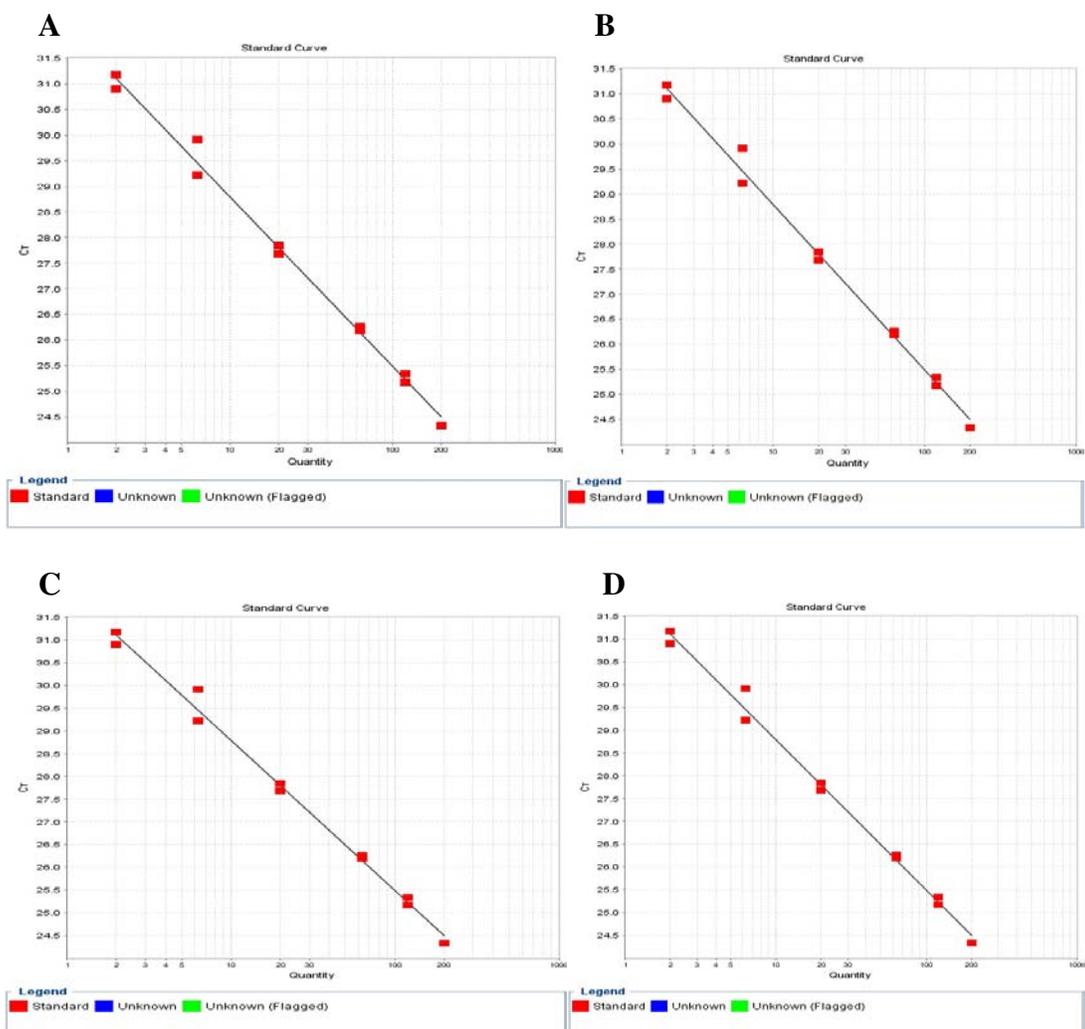


Figura 14: Curva de eficiência da amplificação. O eixo “x” representa a concentração de cDNA (escala logarítmica) e no eixo “y” encontram-se os *Cts*. **A** (*PIPK I α*), **B** (*PIPK I β*), **C** (*PIPK I γ*) e, **D** (*PIPK II β*).

3.7.4) Análise dos resultados da qRT-PCR

Há dois modos de análise para a quantificação da expressão: a absoluta e a relativa. Na quantificação absoluta obtêm-se valores numéricos com uma unidade de medida (nanogramas ou número de cópias), utilizando-se amostras padrões com concentrações conhecidas para comparação. A quantificação relativa descreve a expressão gênica de uma amostra em relação à outra, deste modo, os resultados deste tipo de quantificação representam ordens de grandeza, como por exemplo, três vezes mais expresso ou quatro vezes menos expresso (Livak e Schmittgen, 2001).

Neste trabalho, o nível de expressão de cada gene de interesse foi avaliado de forma relativa em relação a uma situação considerada de referência de expressão entre as diferentes amostras, ou seja, os controles endógenos, cuja expressão não deve variar significativamente na situação a ser estudada e em relação à sua contraparte normal. Todos os dados obtidos foram normalizados utilizando-se 2 controles endógenos: GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e a β -ACTINA, que são genes constitutivos, isto é, apresentam pouca variação entre várias condições (Vandesompele et al., 2002).

As análises de quantificação relativa foram calculadas pelo método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Esse método é determinado pela equação $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

A média dos Cts de cada amostra é calculada tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno e em seguida, determina-se o ΔCt ($X_{Ct_{alvo}} - X_{Ct_{endógeno}}$). Após, calcula-se o $\Delta\Delta Ct$ subtraindo-se o ΔCt da amostra pelo ΔCt do calibrador. O calibrador é a amostra escolhida pelo usuário como referência, que terá o valor de $RQ=1$ UA (Unidades

Arbitrárias). Calculado o $\Delta\Delta Ct$, esse valor é então utilizado para o cálculo de RQ (*Relative Quantification*) que expressa quantas vezes a amostra está mais ou menos expressa em relação ao calibrador (Livak e Scmittgen, 2001). Nós utilizamos como calibrador a amostra do 7º dia da nossa cultura.

3.8) Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas computacionais Microcal Origin, versão 5.0 (Microcal Software Inc, 1991-1997, Northampton, MA, USA) e SAS System for Windows, versão 9.1.3 (SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA). Foi realizada uma análise descritiva dos dados e os resultados foram expressos com a apresentação de medidas de posição e dispersão para as variáveis numéricas. Um cálculo de intervalo de confiança de 95% foi utilizado para a média das variáveis numéricas do grupo controle. Os dados foram apresentados graficamente.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Nós avaliamos os perfis de expressão dos genes das PIPKs (I e II, com suas isoformas α , β , γ , e III) e das globinas (α , β , γ) durante a diferenciação eritróide humana em cultura de células CD34⁺, ou seja, o comportamento da expressão dos mesmos à medida que as células se tornam mais diferenciadas. Os perfis de expressão dos genes foram comparados nos dias 10 e 13 da cultura eritróide, tanto no grupo normal quanto nos pacientes. Os dados obtidos foram normalizados utilizando-se a média de 2 controles endógenos, GAPDH e a β -actina, que se expressaram regularmente durante a diferenciação eritróide. A amostra do 7º dia foi utilizada como referência para o cálculo $\Delta\Delta Ct$, dessa forma o RQ da mesma foi sempre igual a 1 UA.

Para o grupo normal foram calculadas as médias das variáveis em estudo e o intervalo de confiança de 95% para as mesmas (Tabelas 7 e 8); entretanto, para o grupo de pacientes, não foi possível realizar esses cálculos pelo fato do número desses indivíduos em cada grupo estar aquém do tamanho amostral necessário. De acordo com os cálculos estatísticos, o número de pacientes em cada grupo deveria ser maior ou igual a cinco. Dessa forma, os pacientes foram avaliados individualmente.

Tabela 7: Análise descritiva e intervalo de confiança de 95% para a média dos resultados das Globinas no grupo normal.

Grupo	Variável	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Limite do IC95% (Inferior)	Limite do IC95% (Superior)
Normal	ALFAdia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	ALFAdia10	11	5.097	3.309	1.165	4.004	13.009	2.874	7.320
	ALFAdia13	11	23.632	23.083	3.650	17.278	85.078	8.124	39.140
	BETAdia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	BETAdia10	11	3.515	1.144	1.216	3.510	5.205	2.746	4.283
	BETAdia13	11	11.329	5.710	3.285	9.107	20.806	7.493	15.165
	GAMAdia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	GAMAdia10	11	2.355	0.587	1.215	2.418	3.332	1.961	2.749
	GAMAdia13	11	3.766	1.430	1.934	4.135	6.290	2.805	4.727

Tabela 8: Análise descritiva e intervalo de confiança de 95% para a média dos resultados das PIPKs no grupo normal.

Grupo	Variável	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Limite do IC 95% (Inferior)	Limite do IC 95% (Superior)
Normal	K1Adia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	K1Adia10	11	1.318	0.741	0.476	1.137	2.368	0.821	1.816
	K1Adia13	11	1.993	1.016	0.668	1.783	4.041	1.310	2.676
	K1Bdia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	K1Bdia10	11	1.749	0.374	1.000	1.722	2.349	1.498	2.001
	K1Bdia13	11	3.366	0.914	2.310	3.472	5.035	2.752	3.980
	K1Cdia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	K1Cdia10	11	1.131	0.627	0.261	1.000	1.954	0.710	1.552
	K1Cdia13	11	2.610	1.463	0.481	2.290	5.137	1.627	3.594
	K2Adia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	K2Adia10	11	2.032	1.317	0.712	1.668	4.251	1.147	2.917
	K2Adia13	11	7.018	6.056	1.431	5.795	23.664	2.949	11.087
	K2Bdia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	K2Bdia10	11	1.038	0.627	0.262	1.000	2.183	0.617	1.459
	K2Bdia13	11	1.360	0.576	0.418	1.493	2.115	0.974	1.747
	K2Cdia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	K2Cdia10	11	1.268	0.842	0.240	1.105	3.074	0.702	1.833
	K2Cdia13	11	1.829	0.935	0.883	1.478	3.732	1.201	2.457
	K3dia7	11	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	.	.
	K3dia10	11	1.465	0.638	0.397	1.616	2.473	1.036	1.894
	K3dia13	11	2.379	1.001	0.990	2.228	4.041	1.706	3.052

3.1) Grupo Normal

4.1.1) Perfil de expressão do gene da PIPKII α durante a diferenciação eritróide *in vitro* no grupo normal e comparação entre os genes das globinas humanas.

O primeiro objetivo do trabalho foi avaliar o perfil de expressão da PIPKII α durante a diferenciação eritróide *in vitro* e compará-lo ao perfil de expressão das globinas humanas no grupo normal (11 indivíduos).

Na figura 15, podemos observar que a expressão do gene da PIPKII α (A) aumentou à medida que as células se tornaram mais diferenciadas coincidindo com o perfil de expressão dos genes das globinas (B), particularmente, com as globinas α e β .

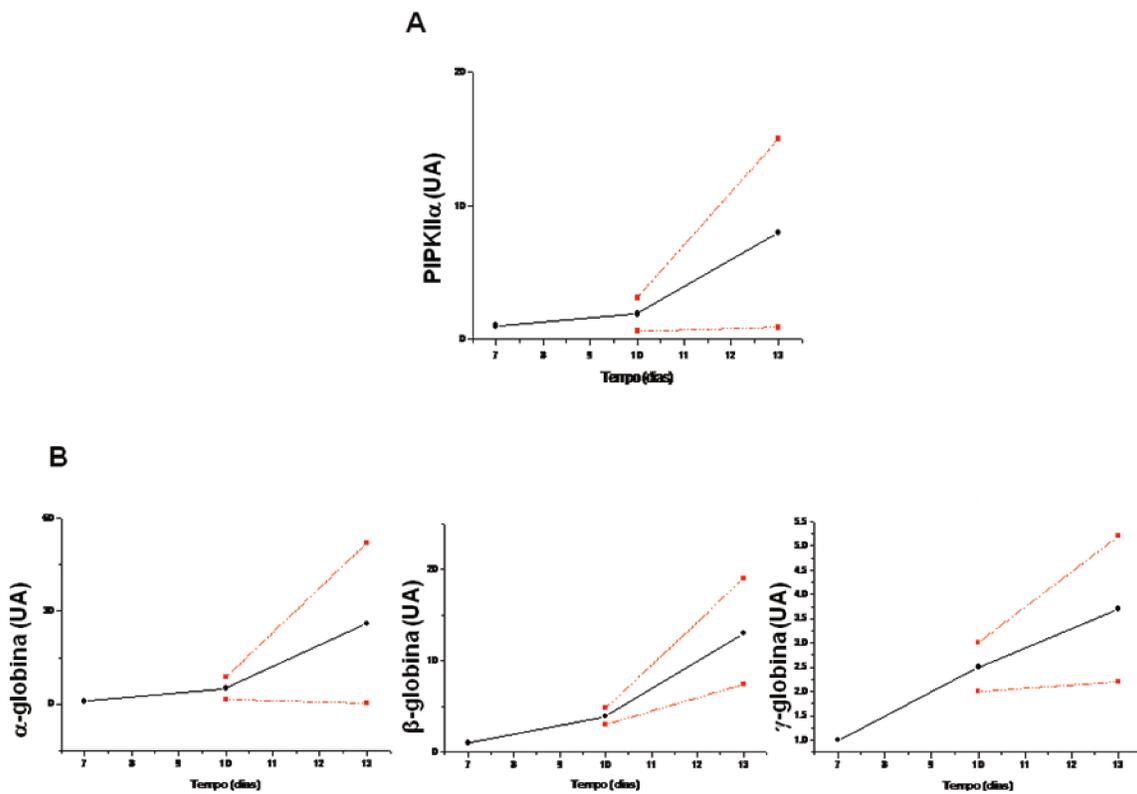


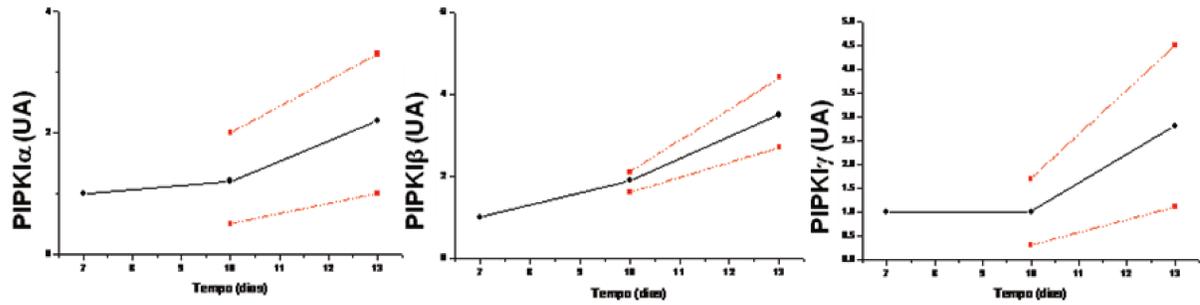
Figura 15: Perfil de expressão da PIPKI α (**A**) e perfil de expressão das globinas α , β e γ (**B**). As linhas em vermelho e preto correspondem, respectivamente, ao intervalo de confiança de 95% e a média do grupo controle. Os eixos **x** e **y** correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e às unidades arbitrárias (UA) da expressão.

4.1.2) Perfil de expressão dos genes de todas as outras PIPKs durante a diferenciação eritróide *in vitro* no grupo normal e comparação entre os mesmos e as globinas humanas.

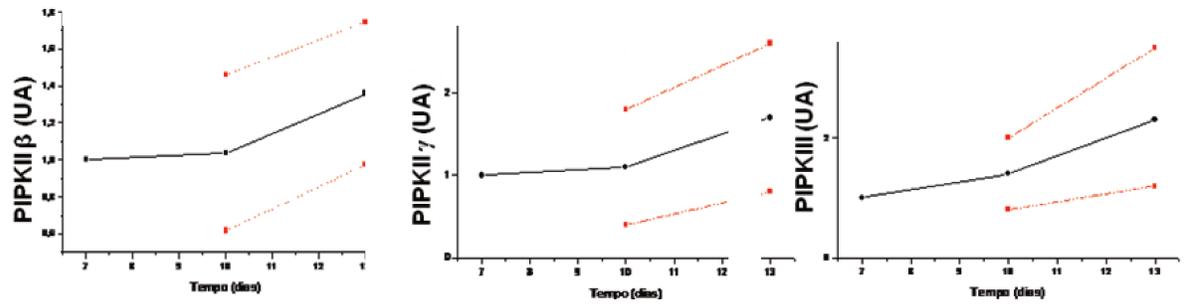
Avaliamos também o perfil de expressão dos genes de todas as outras PIPKs (I α , I β , I γ , II β , II γ e III) durante a diferenciação eritróide *in vitro* e comparamos ao perfil de expressão dos genes de globinas no grupo normal.

Na figura 16, podemos observar que todas as PIPKs (A e B), como a PIPKII α , apresentaram aumento gradativo de expressão ao longo da diferenciação. Ao compararmos o perfil de expressão dos genes das PIPKs com o de globinas, observamos que as PIPKs I α , I β , II γ e III também apresentaram um perfil semelhante ao das globinas α e β (C).

A



B



C

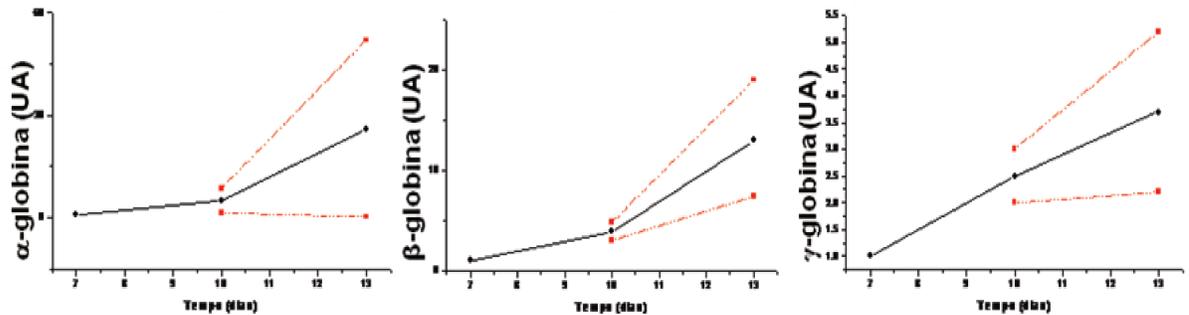


Figura 16: Perfil de expressão das PIPKs α , β , γ , $\text{II}\beta$, $\text{II}\gamma$ e III – A e B) e perfil de expressão das globinas α , β e γ (C). As linhas em vermelho e preto correspondem, respectivamente, ao intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos genes em unidades arbitrárias (UA).

3.2) Pacientes

Os perfis de expressão da PIPKII α , bem como, dos genes das outras PIPKs e das globinas, foram avaliados também em diferentes etapas (dias 10 e 13) da diferenciação eritróide em cultura de células CD34⁺ de pacientes com hemoglobinopatias, sendo dois com Talassemia α (Doenças da Hb H), dois com Talassefina e dois com Anemia Falciforme. As culturas desses pacientes foram realizadas sempre em paralelo com um controle.

4.2.1) Perfil de expressão dos genes da PIPKII α e de todas as outras PIPKs durante a diferenciação eritróide *in vitro* nos pacientes com hemoglobinopatias.

4.2.1.1) Pacientes α -Talassêmicos

4.2.1.1a) Pacientes JKW e FMM

Avaliando os pacientes JKW e FMM, observamos que o perfil de expressão do gene da PIPKII α aumentou ao longo da diferenciação eritróide de nos dois indivíduos (Figura 17). No paciente JKW, os níveis de expressão desse gene encontraram-se bastante elevados em relação ao seu respectivo controle (\cong 12 vezes a expressão do controle no 13º dia), corroborando o resultado encontrado no trabalho de Wenning et al., 2009, entretanto, em FMM, sua expressão foi muito próxima àquela do controle, que chegou a ser ligeiramente maior (5,8 UA no controle e 4,6 UA no paciente) (Figura 18).

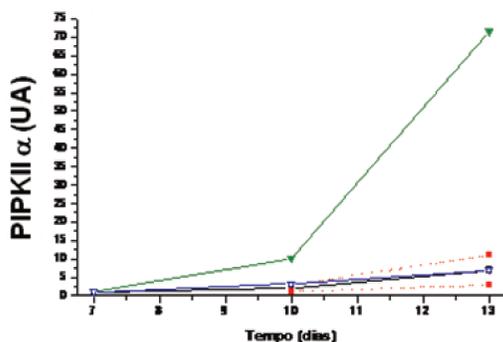
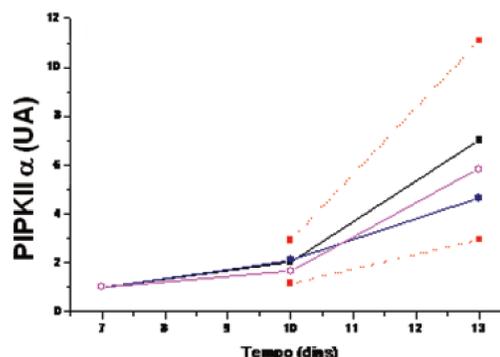
A (JKW)**B (FMM)**

Figura 17: Perfil de expressão da PIPKII durante a diferenciação eritróide *in vitro* nos pacientes α -talassêmicos. **(A)** paciente JKW e **(B)** paciente FMM. Em **(A)** a linha verde representa o paciente JKW, a linha azul seu respectivo controle e em **(B)** as linhas azul e rosa representam, respectivamente, o paciente FMM e o seu controle. As linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão do gene em unidades arbitrárias (UA).

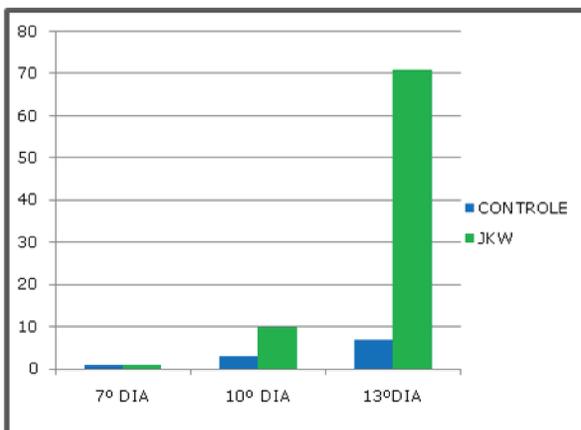
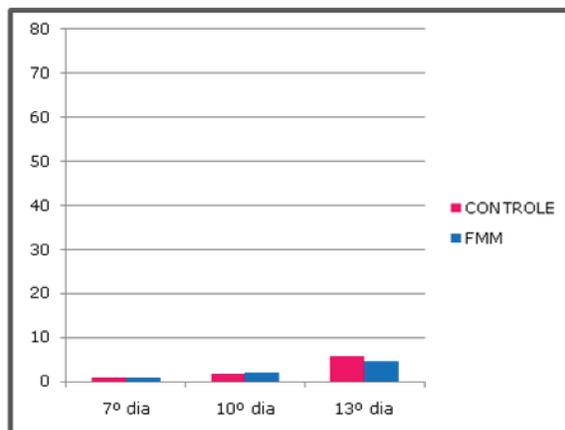
A**B**

Figura 18: Comparação da expressão do gene PIPKII α entre os pacientes α -talassêmicos e seus respectivos controles. **(A)** paciente JKW e **(B)** paciente FMM.

Em relação ao perfil de expressão dos genes de todas as outras PIPKs, podemos observar que no paciente JKW todos apresentaram sua expressão aumentando à medida que as células se tornaram mais diferenciadas, porém, cada uma com um perfil característico. A única exceção foi em relação à expressão do gene da PIPKI β que manteve, praticamente, a mesma expressão nos dias 10^o e 13^o da cultura. Observamos também que todos eles encontraram-se com expressão elevada em relação ao seu respectivo controle (Figura 19).

No paciente FMM, todos apresentaram aumento da expressão ao longo da diferenciação, com exceção da PI β que se mostraram aumentadas no 10^o e diminuídas no 13^o dia da cultura. Quanto ao nível de expressão, observamos que todas as PIPKs, exceto a I β , apresentaram-se diminuídas em relação ao controle, diferente do que ocorreu no paciente JKW (Figura 20).

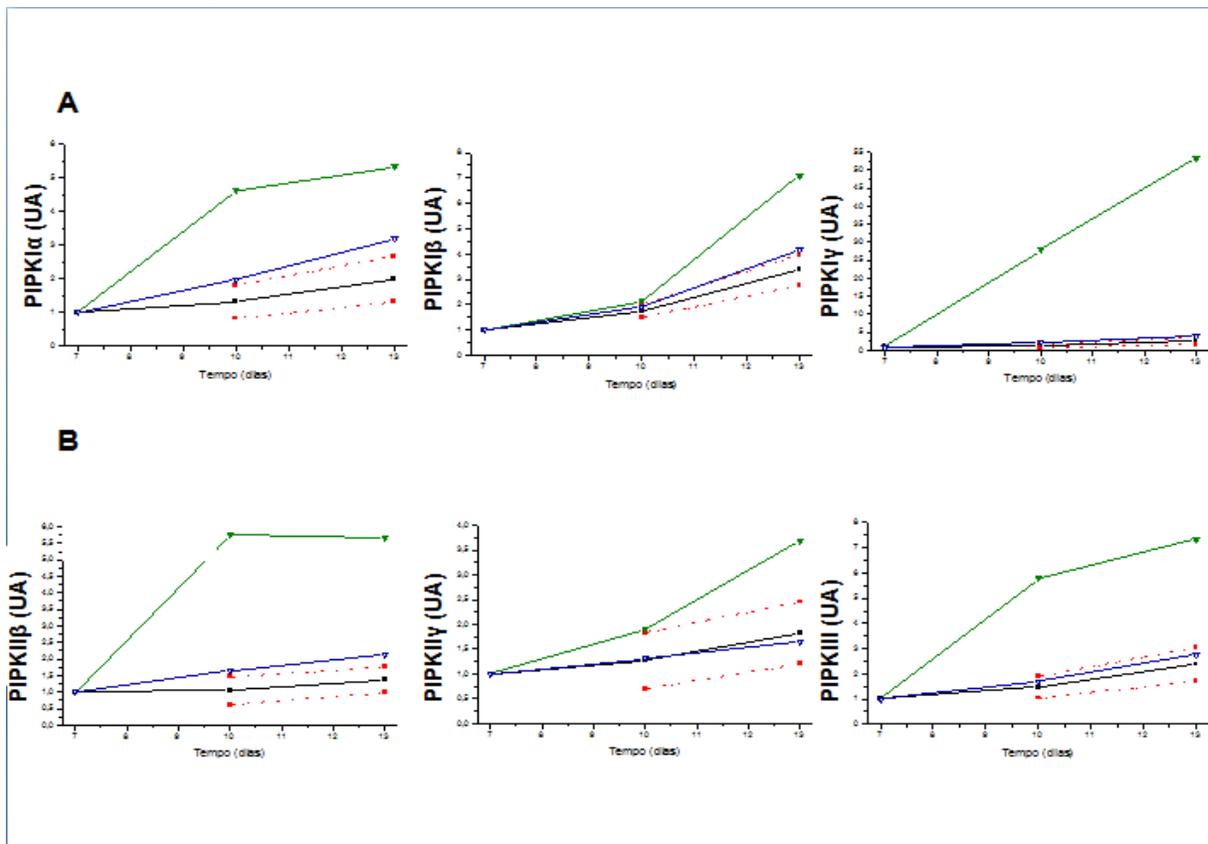


Figura 19: Perfil de expressão das PIPKs α , β e γ (**A**) e $\text{II}\beta$, $\text{II}\gamma$ e III (**B**) do paciente JKW. A linha verde representa o paciente, a linha azul seu respectivo controle e, as linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos genes em unidades arbitrárias (UA).

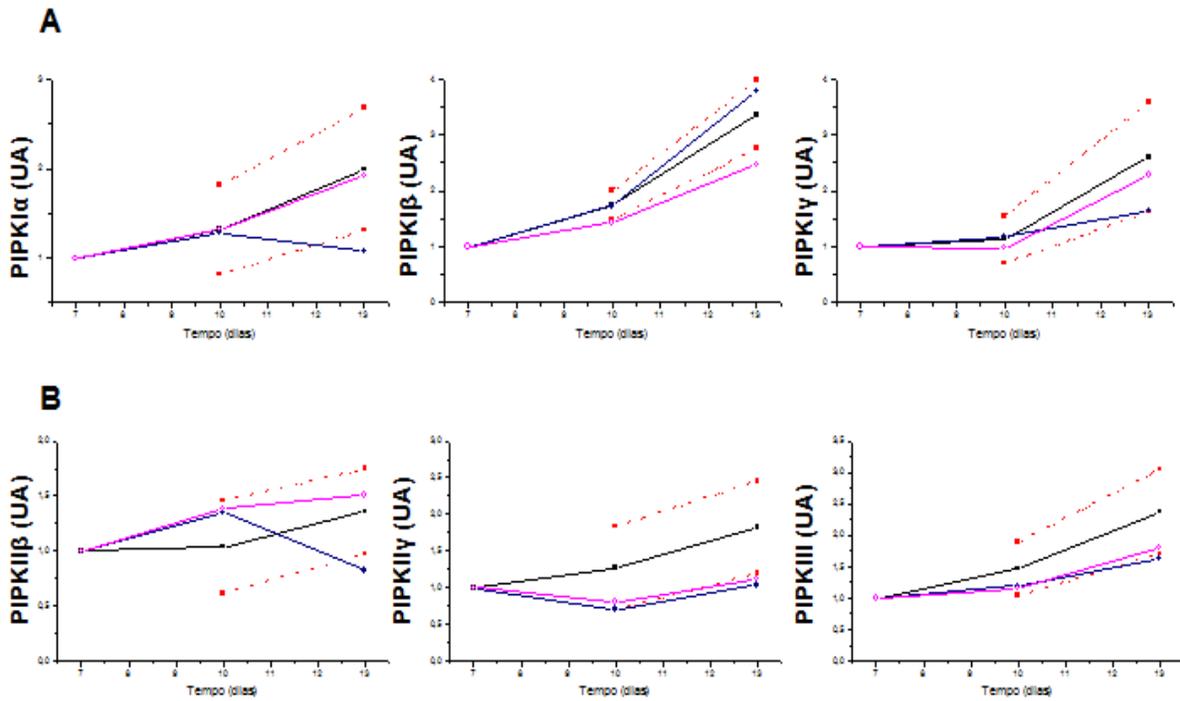


Figura 20: Perfil de expressão das PIPKs α , β e γ (**A**) e $\text{II}\beta$, $\text{II}\gamma$ e III (**B**) do paciente FMM. A linha azul representa o paciente, a linha rosa seu respectivo controle e, as linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos genes em unidades arbitrárias (UA).

4.2.1.2) Pacientes β -Talassêmicos

4.2.1.2a) Pacientes MAFL e ELS

O perfil de expressão do gene da PIPK α no paciente MAFL e no seu respectivo controle aumentou no decorrer da diferenciação eritróide, enquanto que no paciente ELS ela apresentou-se diminuída no 10º dia e voltou a aumentar no 13º dia da cultura, assim como seu respectivo controle (Figura 21).

Quanto ao nível de expressão deste gene, observamos que no paciente MAFL sua expressão foi praticamente igual a do seu controle no 13º dia da cultura (4,67 UA no controle e 4,86 UA no paciente), enquanto que no paciente ELS apresentou-se quase três vezes menos expresso que no seu respectivo controle (10,6 UA no controle e 3,6 UA no paciente) (Figura 22).

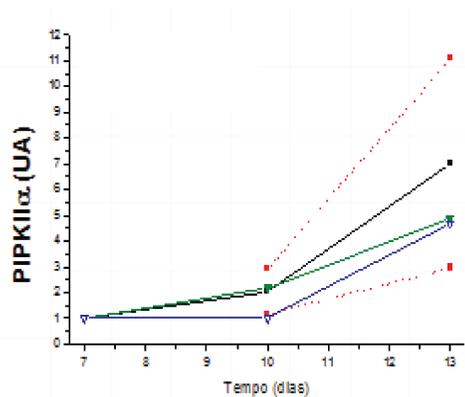
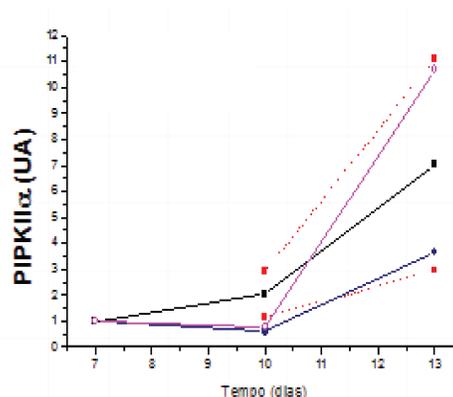
A (MFLS)**B (S)**

Figura 21: Perfil de expressão da PIPKI α em pacientes β -talassêmicos. **(A)** paciente MFLS e **(B)** paciente ELS. Em **(A)** a linha verde representa o paciente MAFL, a linha azul seu respectivo controle e em **(B)** as linhas azul e rosa representam, respectivamente, o paciente ELS e seu controle. As linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo controle. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão do gene em unidades arbitrárias (UA).

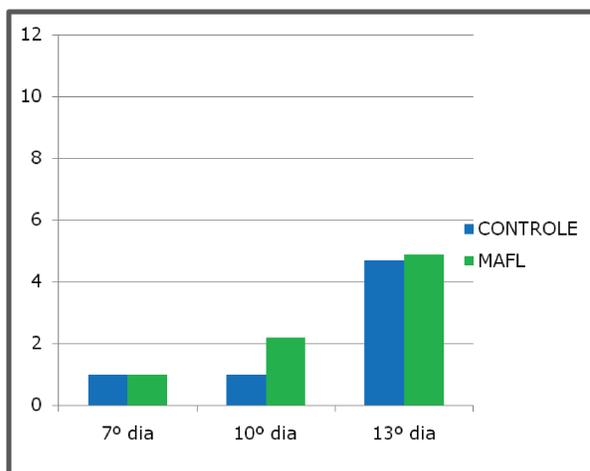
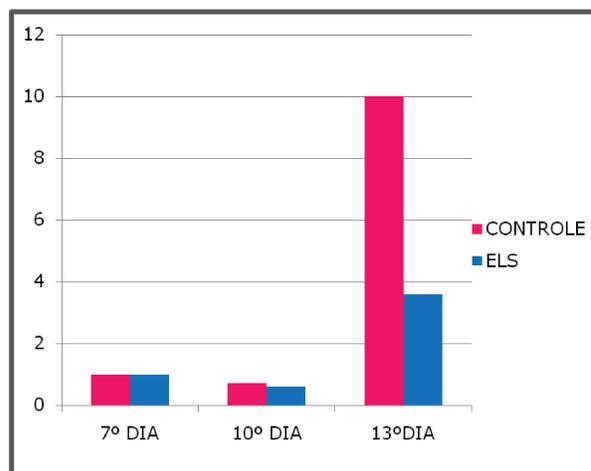
A**B**

Figura 22: Comparação da expressão do gene PIPKI α entre os pacientes β -talassêmicos e seus respectivos controles. **(A)** paciente MAFL e **(B)** paciente ELS.

Em relação às outras PIPKs ($I\beta$, $I\gamma$, $II\beta$, $II\gamma$ e III), no paciente MAFL todas tiveram sua expressão gênica aumentando ao longo da diferenciação, exceto a $II\beta$ que se apresentou diminuída no 13º dia da cultura. O nível de expressão dos genes das PIPKs, $I\beta$, $I\gamma$, $II\beta$, $II\gamma$ e III mostrou-se mais elevado no paciente quando comparado ao seu respectivo controle (Figura 23).

No paciente ELS, bem como no seu respectivo controle, todas as PIPKs estão diminuídas no 10º dia e voltam a aumentar sua expressão gênica no 13º dia, com exceção das $I\beta$ e $II\gamma$ que aumentam ao longo da diferenciação. Todas se encontraram mais expressas no paciente que no controle, no 13º dia da cultura, com exceção da $II\beta$ como já mencionado anteriormente (Figura 24).

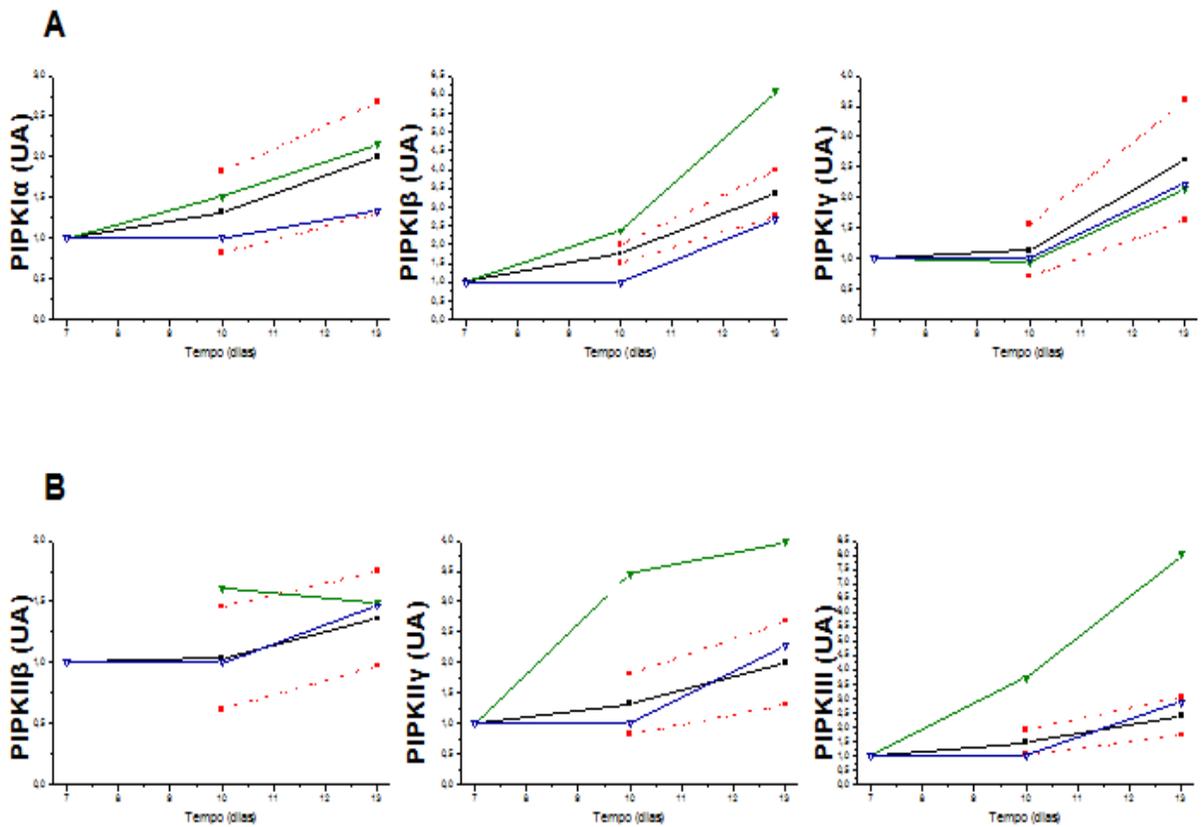


Figura 23: Perfil de expressão das PIPKs α , β e γ (**A**) e $\text{II}\beta$, $\text{II}\gamma$ e III (**B**) no paciente MAFL. A linha verde representa o paciente, a linha azul seu respectivo controle e, as linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos genes em unidades arbitrárias (UA).

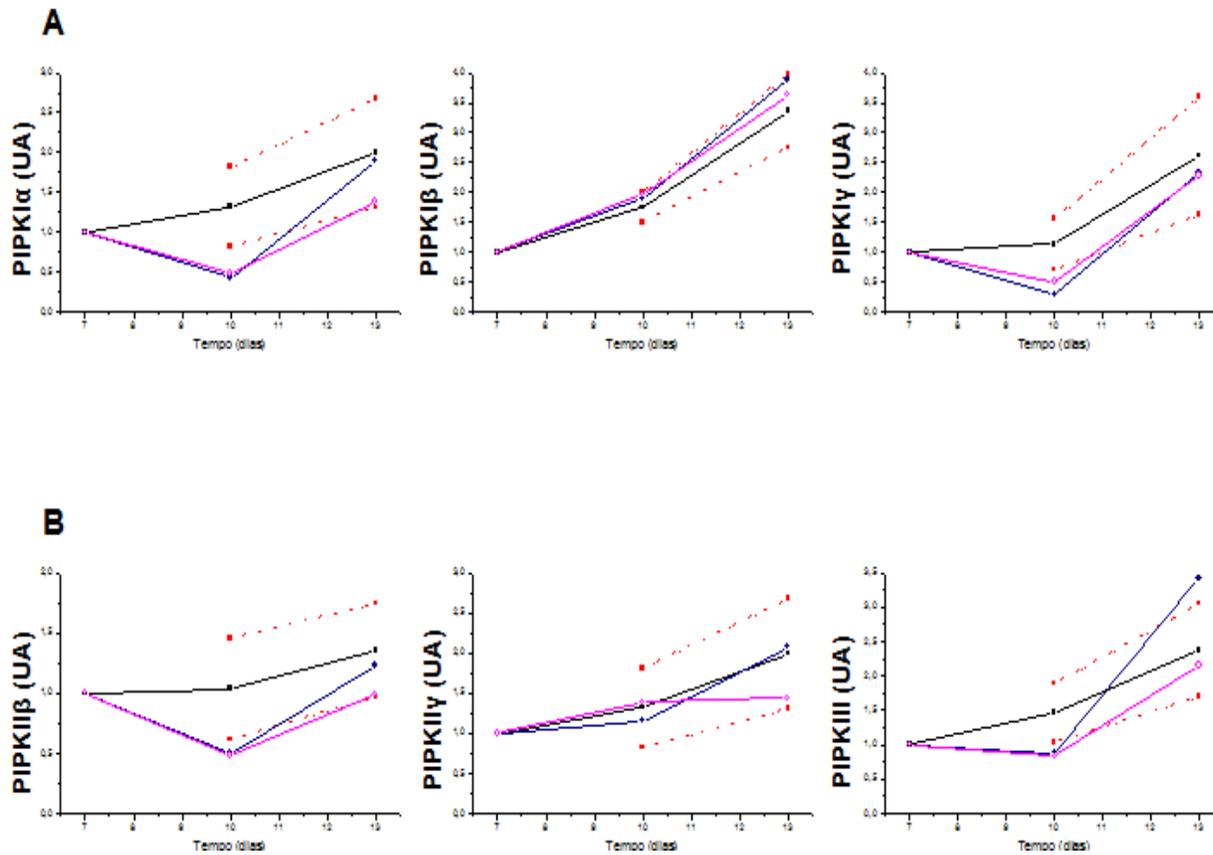


Figura 24: Perfil de expressão das PIPKs I α , I β e I γ (A) e II β , II γ e III (B) no paciente ELS. A linha azul representa o paciente, a linha rosa seu respectivo controle e, as linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos gene em unidades arbitrárias (UA).

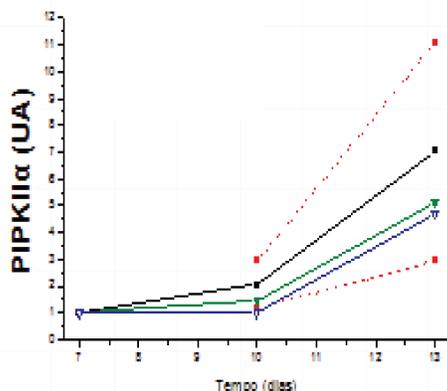
4.2.1.3) Pacientes com Anemia Falciforme

4.2.1.3a) Pacientes JJS e JOS

Nos pacientes JJS e JOS, assim como em seus respectivos controles, observamos que a expressão do gene da PIPKII α também aumentou à medida que as células se tornaram mais diferenciadas (Figura 25).

O paciente JJS apresentou o nível de expressão do gene da PIPKII um pouco mais elevado que o seu controle no 13º dia da cultura (5,1 UA no paciente e 4,7 UA no controle), enquanto que no paciente JOS ocorreu o contrário, ou seja, a expressão desse gene foi mais elevada no controle (2,5 UA no paciente e 5 UA no controle) (Figura 26).

A (JJS)



B (JOS)

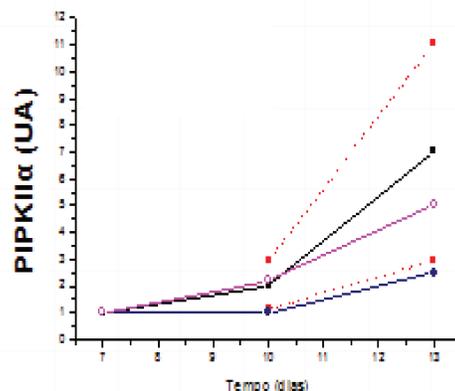
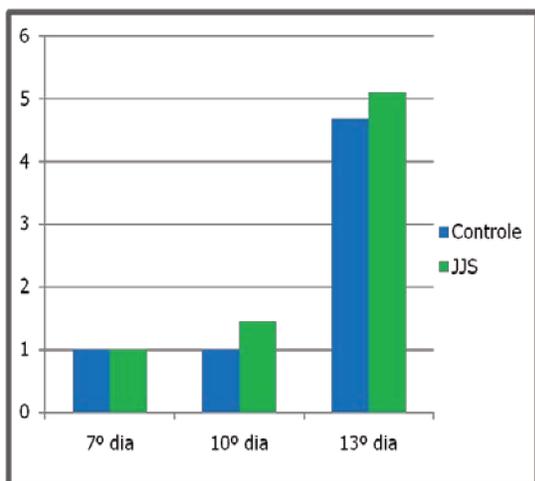


Figura 25: Perfil de expressão do gene PIPKII α nos pacientes com Anemia Falciforme.

(A) paciente JJS e (B) paciente JOS. Em (A) a linha verde representa o paciente JJS, a linha azul seu respectivo controle e em (B) as linhas azul e rosa representam, respectivamente, o paciente JOS e o controle. As linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão do gene em unidades arbitrárias (UA).

A



B

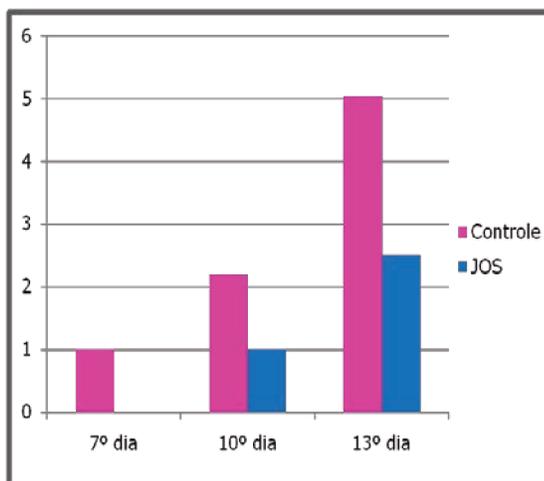


Figura 26: Comparação da expressão do gene PIPKII α entre os pacientes com Anemia Falciforme e seus respectivos. (A) paciente JJS e (B) paciente JOS.

Em relação ao perfil de expressão dos genes das outras PIPKs, no paciente JJS as PIPKs I α , I γ e II β apresentaram sua expressão diminuída no 10º dia e voltando a aumentar no 13º dia da cultura, enquanto que I β , II γ e III aumentaram sua expressão ao longo da diferenciação. Todas se mostraram mais expressas no paciente. No paciente JOS, os genes de todas as PIPKs aumentaram sua expressão ao longo da diferenciação, porém, o nível de expressão de I α , I β e II γ encontrou-se mais elevado no controle, enquanto que I γ , II β e III foram mais expressas no paciente (Figuras 27 e 28).

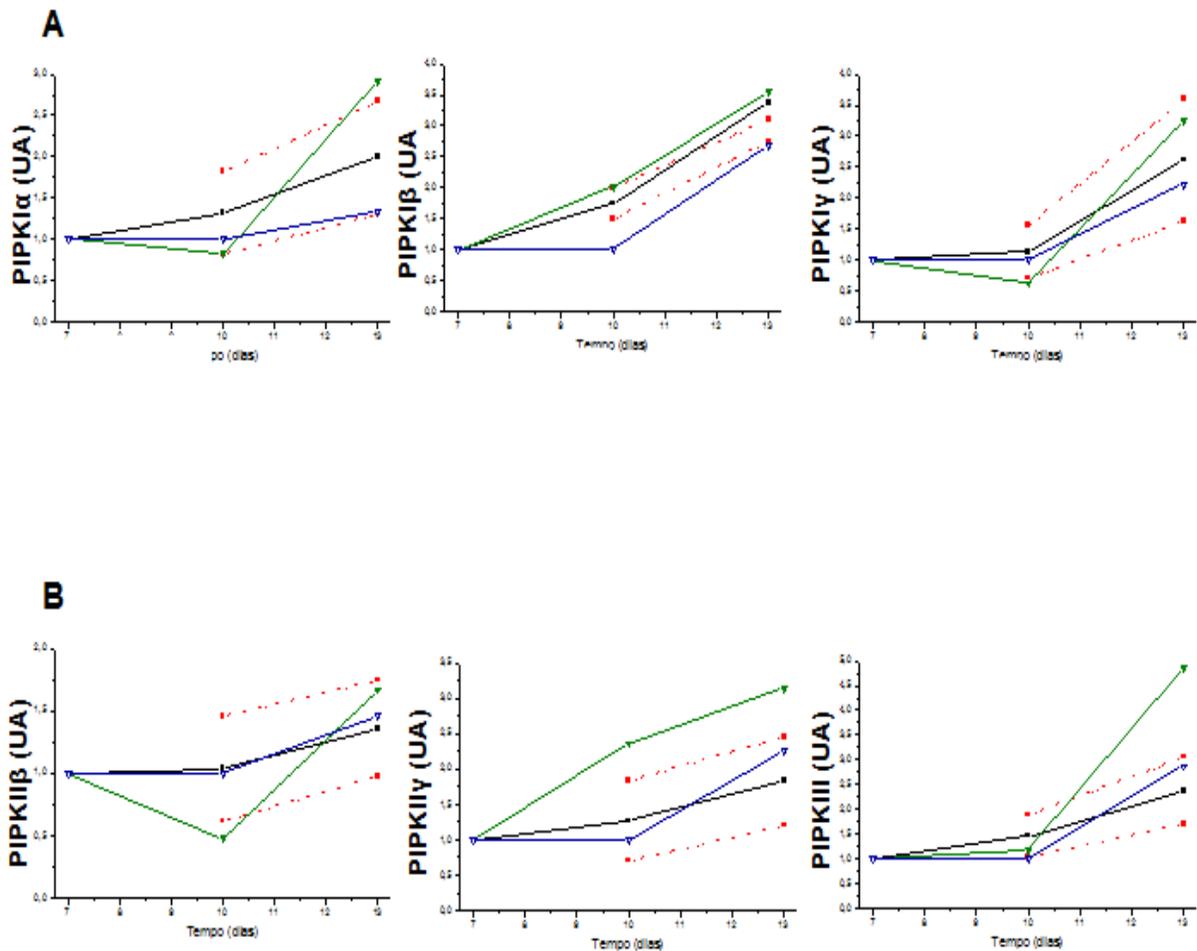


Figura 27: Perfil de expressão dos genes das PIPKs α , I β e I γ (**A**) e II β , II γ e III (**B**) no paciente JSS. A linha verde representa o paciente, a linha azul seu respectivo controle e, as linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos genes em unidades arbitrárias (UA).

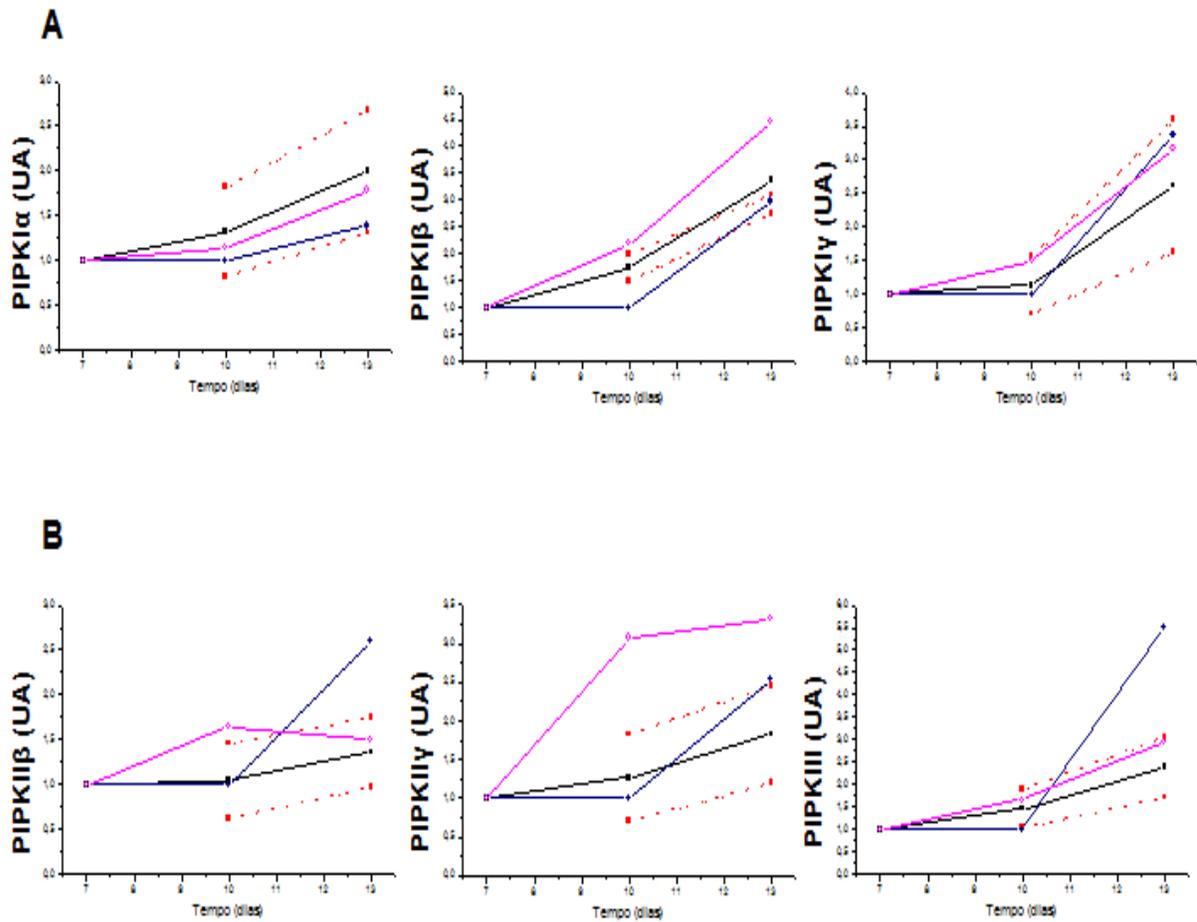


Figura 28: Perfil de expressão dos genes das PIPKs α , β e γ (**A**) e β , γ e III (**B**) no paciente JOS. A linha azul representa o paciente, a linha rosa seu respectivo controle e, as linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos genes em unidades arbitrárias (UA).

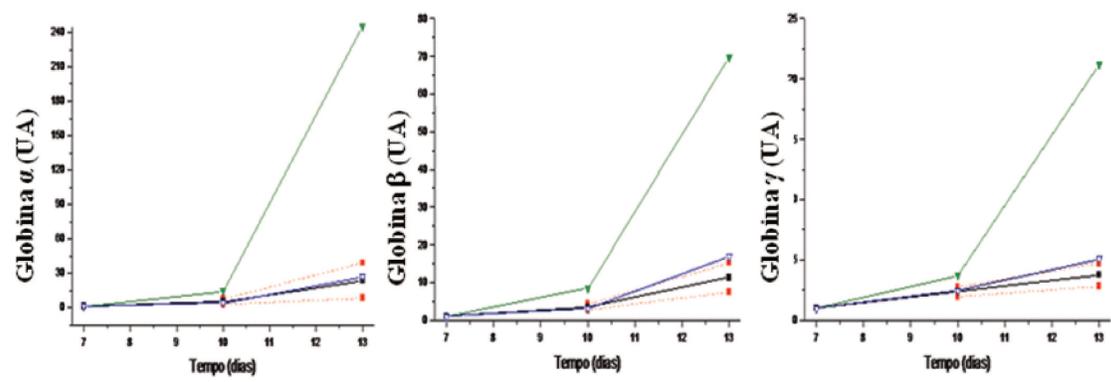
4.2.2) Perfil de expressão dos genes das globinas humanas e comparação com o dos genes das PIPKs durante a diferenciação eritróide *in vitro* nos pacientes com hemoglobinopatias.

Avaliamos também o perfil de expressão dos genes das globinas α , β e γ e os comparamos ao dos genes das PIPKs nos pacientes, para verificarmos se seguiam o mesmo padrão de expressão durante a diferenciação eritróide *in vitro*.

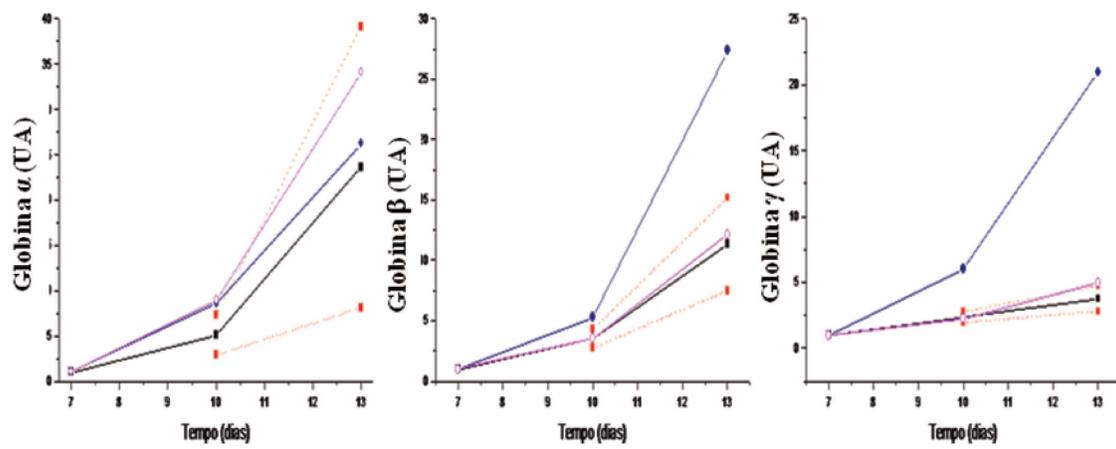
Os resultados dos perfis de expressão das globinas nos pacientes revelaram que todas apresentaram sua expressão aumentando ao longo da diferenciação (Figura 29), assim como o grupo normal estudado, permitindo-nos inferir, como já demonstrado nos resultados acima, que a maioria das PIPKs segue esse mesmo perfil, porém, cada uma de uma maneira característica.

Ao compararmos os perfis de expressão gênica das PIPKs com os das globinas nos pacientes, observamos que o perfil da PIPKII α no paciente α -talassêmico JKW foi o que mais se aproximou daquele dos genes de globina, praticamente coincidindo com eles (Figura 30). Já no paciente FMM, não encontramos o mesmo resultado: a PIPKI assemelhou ao perfil de expressão da globina α .

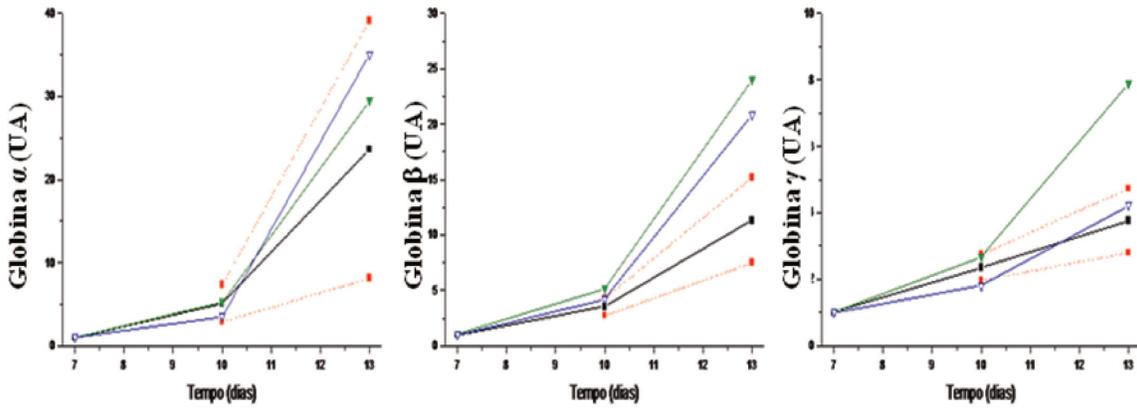
A) JKW



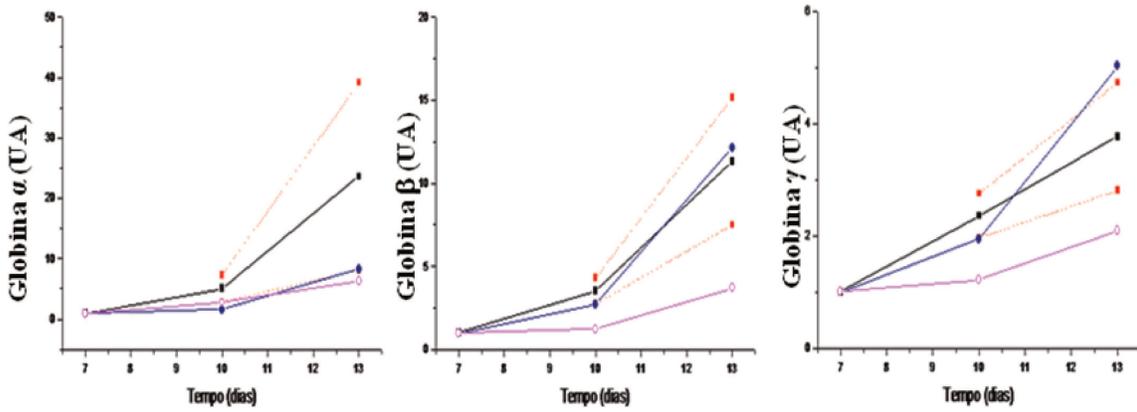
B) FMM



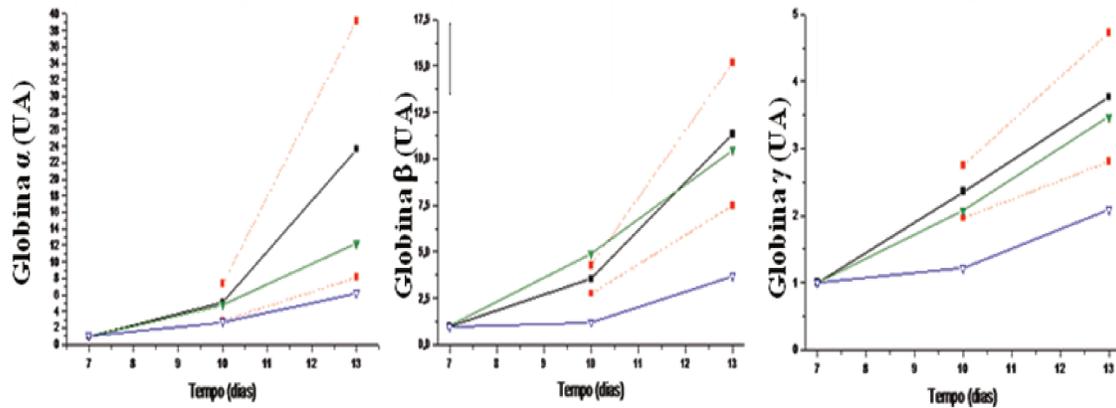
C) MAFL



D) ELS



E) JJS



F) JOS

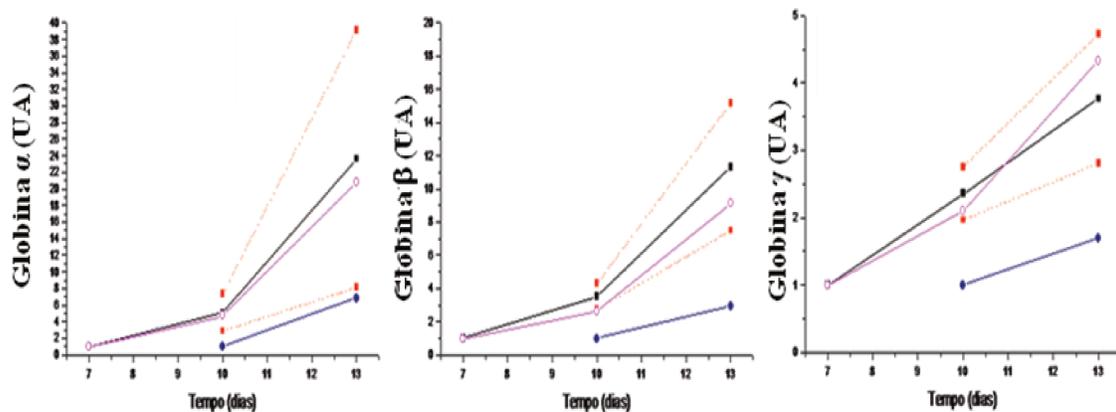


Figura 29: Perfis de expressão das globinas nos pacientes α -talassêmicos (A e B), β -talassêmicos (C e D) e com Anemia Falciforme (E e F). As linhas verdes representam os pacientes A, C, E e as linhas azuis seus respectivos controles. As linhas azuis representam os pacientes B, D, F e as linhas rosa seus respectivos controles. As linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos genes em unidades arbitrárias (UA).

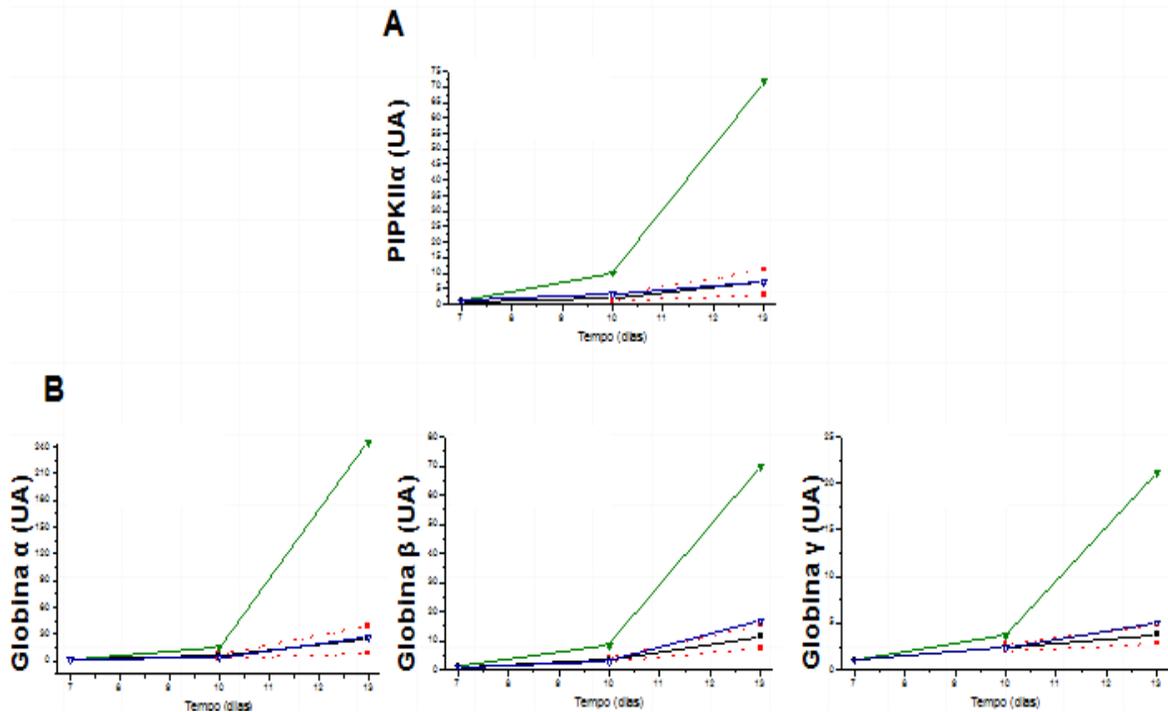
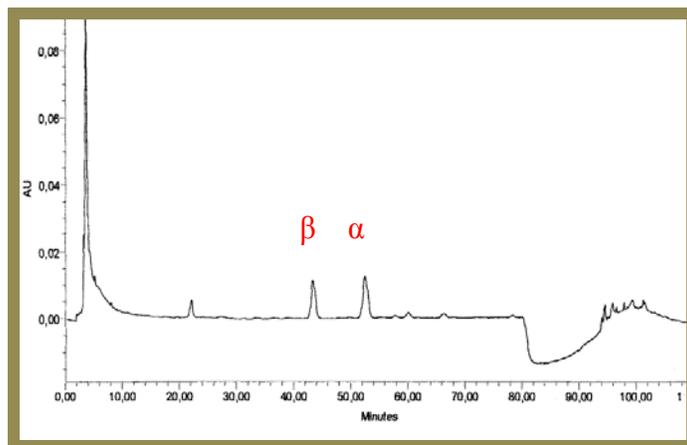


Figura 30: Comparação entre os perfis de expressão do gene PIPKII α (A) com os das globinas (α , β , γ) (B) no paciente α -talassêmico JKW. A linha verde representa o paciente, a linha azul seu respectivo controle e, as linhas vermelhas e pretas, respectivamente, o intervalo de confiança de 95% e a média do grupo normal. Os eixos x e y correspondem, respectivamente, aos dias da cultura (pontos 7, 10 e 13) e a expressão dos genes em unidades arbitrárias (UA).

Em relação aos outros pacientes, observamos que em um dos pacientes com talassemia β (MAFL) o perfil de expressão dos genes da PIPKII β também foi semelhante ao perfil de expressão dos genes das globinas, enquanto que no outro paciente (ELS) nenhuma das PIPKs mostrou semelhança com o perfil das globinas. Nos pacientes com Anemia Falciforme, tanto no JSS quanto no JOS, o perfil de expressão do gene da PIPKII assemelhou-se ao do gene da globina α (Figuras 23, 24, 27, 28, 29).

Um resultado que nos chamou a atenção na cultura de células dos pacientes talassêmicos foi o nível de expressão das globinas nos mesmos. A eritropoese em indivíduos saudáveis envolve níveis balanceados da transcrição dos genes das globinas dos tipos α e β , enquanto que em pacientes, ~~múta~~ nessas genes e nas suas sequências regulatórias podem levar ao desbalanço da produção dos mesmos, causando doenças, como as talassemias (Mahajan et al., 2009). O nível de expressão da globina α - talassêmico JKW, que esperávamos estar diminuída, apresentou-se extremamente elevado em relação ao seu controle (244 UA no paciente e 26 UA no controle), e, nos 2 pacientes β -talassêmicos, a expressão da globina β , que também deveria estar diminuída, mostrou-se elevada em relação ao seu controle. Nossa hipótese para esse resultado é que pode haver um mecanismo compensatório *in vitro* que leva ao aumento da transcrição do gene que está presente. Dessa forma, haveria a transcrição do mesmo, que, no entanto, não seria traduzido em proteína. Esse fato poderia ser demonstrado pela análise protéica das globinas. Nós analisamos por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) de fase reversa as cadeias globínicas de uma amostra da cultura do paciente JKW e, como pode ser observado no cromatograma (Figura 31), as cadeias α do paciente, como esperávamos, está diminuída em relação ao seu respectivo controle (globina β =38% e globina α =50% no controle; globina β =52% e globina α =35% no paciente), apoiando a hipótese descrita acima.

A



B

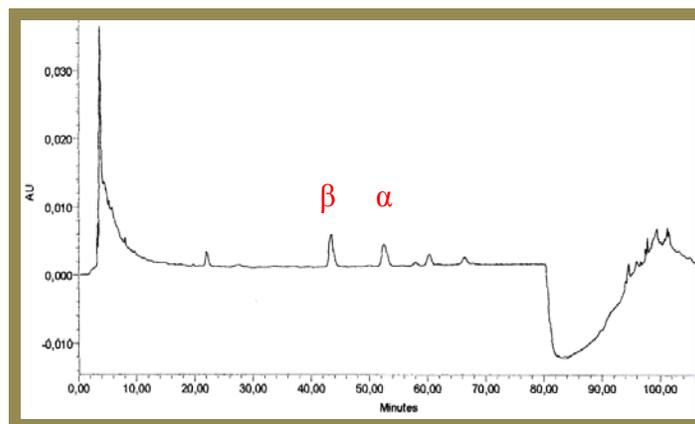


Figura 31: Cromatograma das cadeias globínicas. (A) Controle e (B) paciente JKW.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

As PIPKs são uma família de enzimas lipídio quinases que participam de diversas vias de sinalização intracelular e transdução de sinal (Anderson et al., 1999). Elas atuam no passo final da síntese de $PI4,5P_2$, um importante segundo mensageiro envolvido em diversos processos celulares, e são classificadas em três subfamílias (PIPK tipo I, PIPK tipo II e PIPK tipo III), de acordo com seus substratos específicos e alvos celulares (Figuras 32 e 33). As subfamílias I e II incluem três isoformas, (α , β e γ). Atualmente sabe-se que os membros da subfamília do tipo I utilizam preferencialmente o $PI4P$ como substrato para gerar a maior parte do $PI4,5P_2$ na célula; já as PIPKs do tipo II sintetizam $PI4,5P_2$ utilizando $PI5P$ como substrato, enquanto a PIPK tipo III utiliza o $PI3P$ para gerar $PI3,5P_2$ (Heath et al., 2003; Heck et al., 2007).

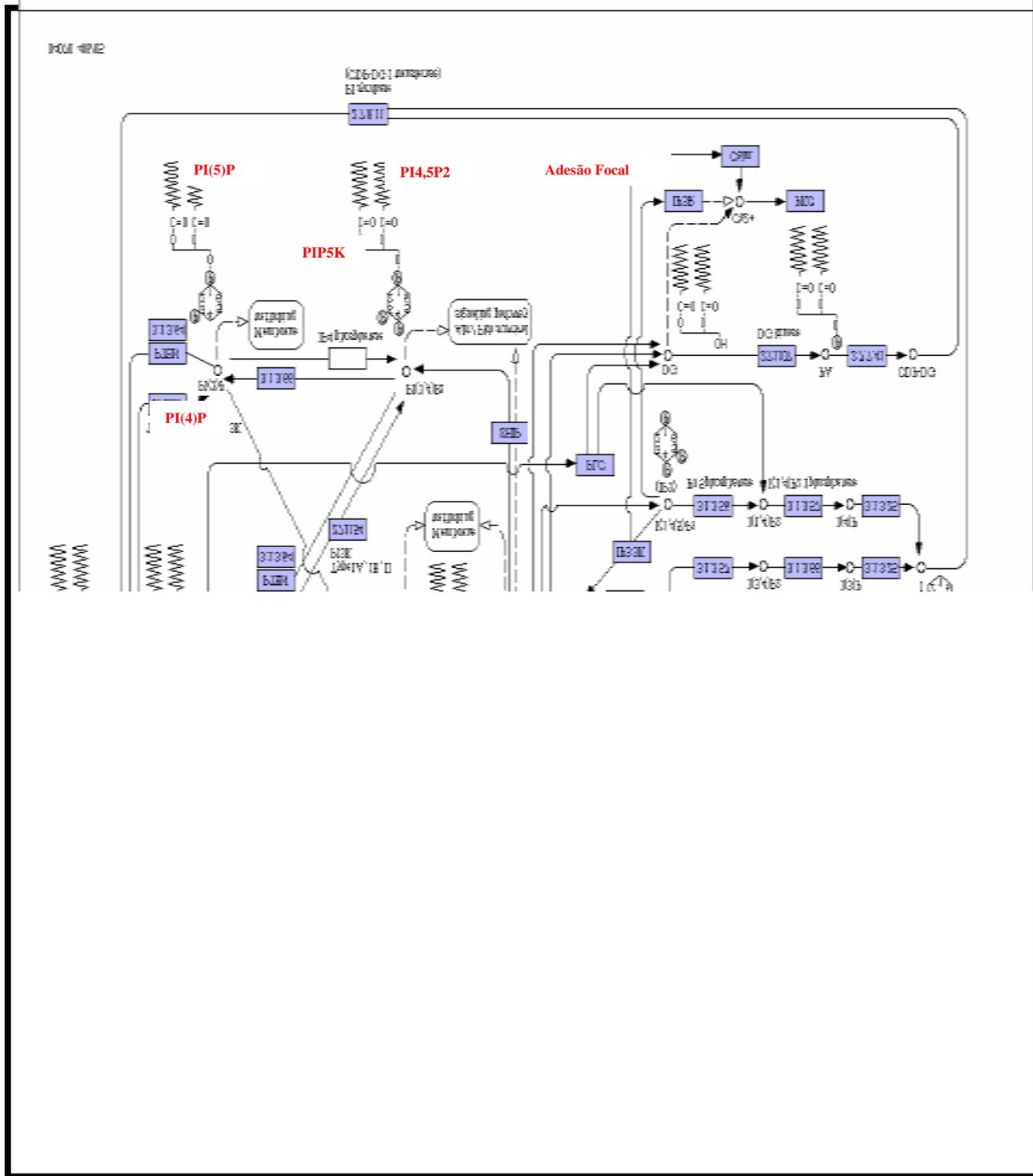


Figura 33: Sistema de sinalização do fosfatidilinositol [KEGG (*Kioto Encyclopedia Genes and Genoma*) – www.genoma.jp/kegg].

Além de substratos distintos, as PIPKs atuam em diferentes alvos sub-celulares: a PIPK tipo I está presente na membrana plasmática, em focos de adesão, no núcleo celular, no Complexo de Golgi e está envolvida com o remodelamento do citoesqueleto de actina, adesão, secreção, endocitose e regulação de canais iônicos; a PIPK tipo II foi encontrada no citosol, no núcleo e associada ao retículo endoplasmático e, embora suas funções não estejam completamente esclarecidas, assim como a PIPK tipo I, parece estar envolvida com a regulação de eventos nucleares (Figura 34). A PIPK tipo III foi localizada na membrana interna da célula e é responsável pela manutenção de sua integridade (Boronenkov et al., 1998; Anderson et al., 1999; Doughman et al., 2003).

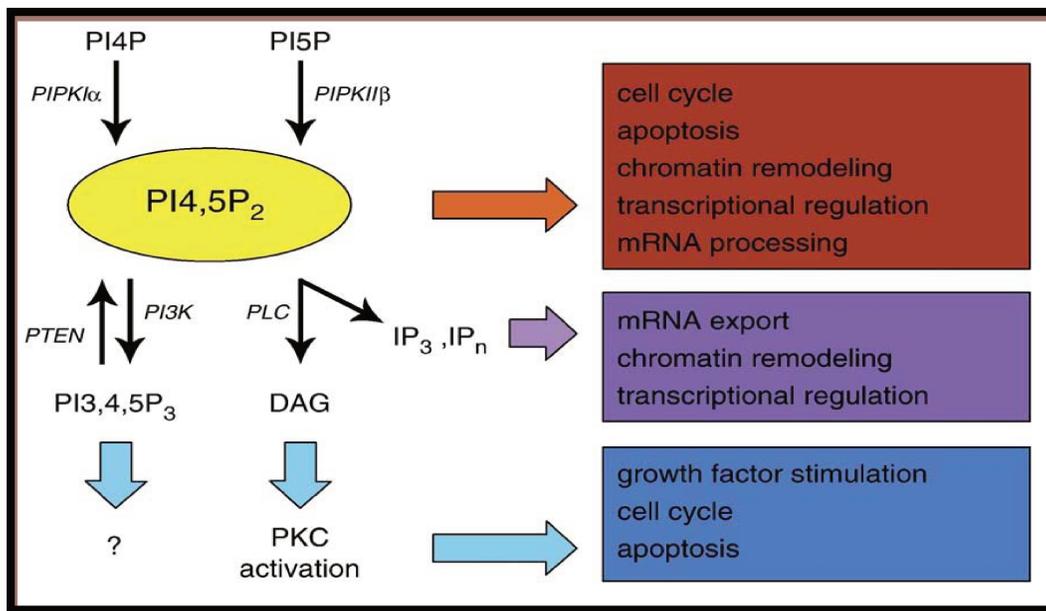


Figura 34: Sinalização do PI4,5P₂ no núcleo (Bunce et al., 2006a).

Em 1989, a PIPK foi purificada da membrana dos eritrócitos, o que permitiu elucidar algumas das propriedades bioquímicas dessas enzimas (Ling et al., 1989). No ano seguinte, Bazenet et al. caracterizaram, nestas mesmas células, as PIPKs tipos I e II,

demonstrando que a primeira é uma proteína da membrana do eritrócito, enquanto que a segunda é citosólica.

A PIPK tipo II α foi a primeira a ser clonada dos eritrócitos e está abundantemente presente nestas células. Interessantemente, sua sequência não mostra homologia significativa com qualquer outra quinase conhecida (Boronenkov e Anderson, 1995; Bazenet et al., 1990).

Os genes PIPKs I α e I β foram clonados e sequenciados em 1996 (Ishihara et al., 1996; Loijens e Anderson, 1996) e foram mapeados nos cromossomos 1q22 e 9q13, respectivamente. As proteínas codificadas por esses genes apresentam uma homologia nos aminoácidos da região central (75% de identidade), mas diferem nas regiões amino e carboxi-terminal. Ambos apresentam um peso molecular de 68 kDa. A clonagem da terceira isoforma, gene PIPKI γ , foi realizada pelo mesmo grupo em 1998 (Ishihara et al., 1998). Esse gene foi mapeado no cromossomo 19q13.3 e apresentou duas isoformas de *splicing* alternativo migrando a 87 e 90 kDa em eletroforese em gel de poliacrilamida. A sequência de aminoácidos da região central mostra, aproximadamente, 80% de homologia com as PIPKs tipo I α e I β (Ishihara et al., 1998).

Como já mencionado, o gene PIPKII foi o primeiro a ser clonado de eritrócitos humanos (Boronenkov et al., 1995). Ele está localizado no cromossomo 10p12.2 e codifica um RNAm de 4,1 Kb. No mesmo ano, Divecha et al. (1995) clonaram e sequenciaram a isoforma PIPKII γ isolada de plaquetas humanas. Esse gene foi mapeado no cromossomo 12q13.3. A sequência das proteínas codificadas por esses dois genes diferem na região entre os aminoácidos 297 e 311 (Divecha et al., 1995). O gene PIPKII β foi clonado por Castellino et al., em 1997. Ele foi mapeado no cromossomo 17q12 e codifica um RNAm de 6,3 Kb. A sequência de aminoácidos apresenta 77,8% de identidade com a PIPKII α .

Recentemente, em estudo desenvolvido em nosso laboratório que buscou avaliar os transcritos diferencialmente expressos nos reticulócitos de dois pacientes (irmãos) com talassemia α (Doença da Hb H), com a mesma base molecular da doença e diferentes percentuais de Hb H nas hemácias do sangue periférico, observou-se que a expressão do gene PIPKII α encontrava-se aumentada nos pacientes em relação ao controle sadio, e que seus níveis de expressão guardavam proporcionalidade tanto com os níveis de Hb H detectados no sangue periférico, quanto com os níveis de expressão do gene da globina β nos reticulócitos, de forma que o paciente com maior expressão do gene PIPKII α era aquele com maior percentual de Hb H e com maior nível de expressão dos genes β (Wenning et al., 2009). Esses resultados sugeriram que a maior proporção de Hb anômala possivelmente se deva a uma taxa maior de transcrição do gene da globina β ao invés de uma maior proteólise nas células do paciente com menor percentual de Hb H, como inicialmente se pensava, e que, de alguma forma, a expressão do gene β é influenciada ou regulada pela PIPKII α e pela via de sinalização celular do fosfatidilinositol.

Para se investigar mais sobre a relação entre as PIPKs, particularmente a PIPKII α , e a expressão dos genes de globinas, particularmente o da globina β , seriam necessários um número maior de pacientes (difícil de ser obtido tendo em vista que a Doença da Hb H não é freqüente), a inclusão de mais pacientes β -talassêmicos na amostragem, um maior conhecimento sobre o perfil de expressão dos genes PIPKs (especialmente o da PIPKII α) em células eritróides e na diferenciação destas células em cultura (condição experimental mais usada atualmente para este tipo de estudo) e um referencial de normalidade para este tipo celular, nestas condições, para possibilitar as comparações necessárias e a avaliação da presença de associação entre as concentrações enzimáticas e a expressão dos genes de globina ou a síntese de globinas ou, ainda, a síntese de hemoglobina.

Como na literatura são escassos os trabalhos abordando esses aspectos (Bazenet et al., 1990; Boronenkov e Anderson, 1995; Wenning et al., 2009) e como não há, de nosso conhecimento, nenhum estudo prévio avaliando a expressão dos genes das PIPKs em células eritróides em cultura, tornaram-se objetivos principais do presente trabalho o estabelecimento do perfil de expressão dos genes da PIPK β e das outras PIPKs e sua comparação com a expressão dos genes de globinas (β e γ) durante a diferenciação eritróide humana em cultura de células CD34⁺ normais. Para isso foram obtidas células de 11 indivíduos saudáveis, aqui denominados de grupo normal. Adicionalmente, foram estudados seis pacientes com hemoglobinopatias (2 com α -talassemia, 2 com β -talassemia e 2 com Anemia Falciforme). Empregou-se a cultura de células CD34⁺ hematopoiéticas do sangue periférico e, ao longo da diferenciação eritróide - dias 7, 10 e 13 - as células foram coletadas para citometria de fluxo e cistospin (acompanhamento da diferenciação eritróide) e para a avaliação da expressão gênica de todas as PIPKs e globinas, por PCR em Tempo Real (qRT-PCR).

No grupo normal, a expressão do gene PIPK β e dos demais genes das PIPKs, aumentou à medida que as células se tornaram mais diferenciadas, coincidindo com os perfis de expressão dos genes de globinas, particularmente das globinas α e β .

Dessa forma, conseguimos estabelecer o perfil de expressão dos genes PIPKs em células eritróides de indivíduos saudáveis em cultura, mostrando que ela aumenta gradativamente no decorrer da diferenciação eritróide, porém, cada gene, com um perfil característico, exatamente como ocorre com os genes de globinas (Mahajan et al., 2009). Ou seja, há um paralelismo entre a expressão dos genes PIPKs e a expressão dos genes de globinas, reforçando, dessa forma, a hipótese de que elas podem estar relacionadas.

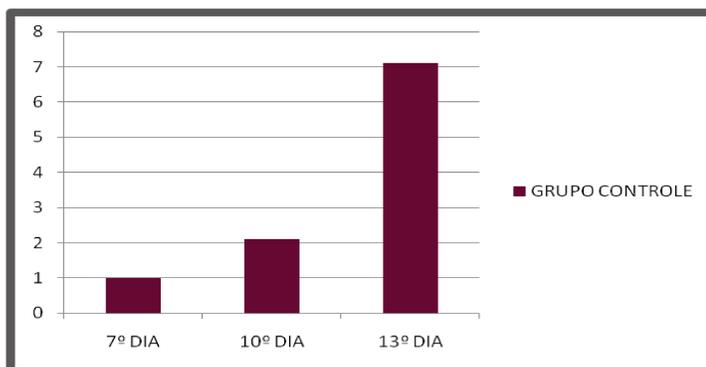
Adicionalmente, foram estudados 6 pacientes com hemoglobinopatias. Como já mencionado, a cultura de cada um deles foi realizada sempre em paralelo à cultura de um indivíduo normal. Além disso, os pacientes foram analisados separadamente do grupo normal pela limitação de seu tamanho amostral. O perfil de expressão do gene *PIP2I* foi avaliado e em todos os seis pacientes analisados mostrou-se igual ao de seus respectivos controles individuais e ao do grupo normal, ou seja, com um aumento gradativo ao longo da diferenciação celular eritróide.

Já os níveis de expressão foram heterogêneos, indicando maior complexidade quando se trata de células provenientes de indivíduos com doença. Considerando-se o 13º dia da cultura eritróide, para comparação, nas células dos pacientes com Talassemia α a expressão do gene *PIP2I* foi, no paciente JKW, aproximadamente doze vezes maior do que em seu respectivo controle (6 UA no controle e 71UA no paciente), enquanto no paciente FMM, diferentemente do esperado, ela foi praticamente igual ao do controle, estando até ligeiramente mais elevada neste último (5,8 UA no controle e 4,6 UA no paciente).

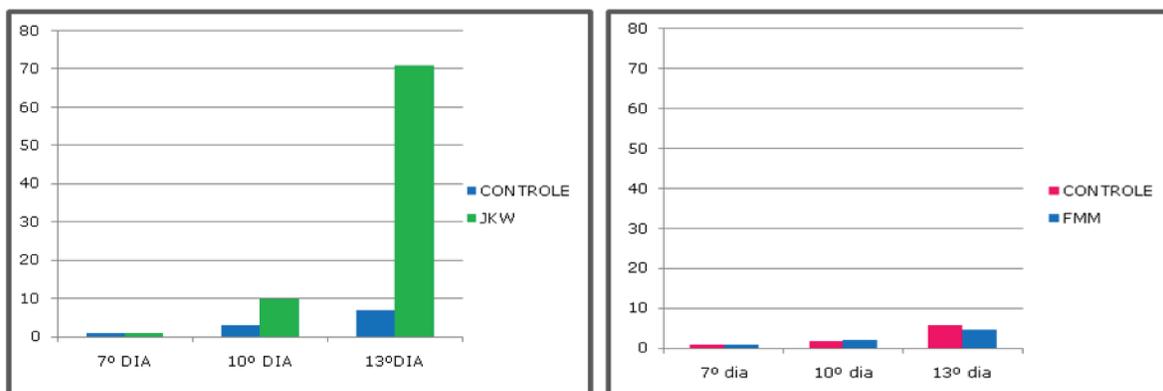
Entre os β -talassêmicos, a expressão do gene *PIP2I* nas células do paciente ELS apresentou-se quase três vezes menor que em seu respectivo controle (10,6 UA no controle e 3,6 UA no paciente), enquanto nas células do paciente MAFL sua expressão foi praticamente igual à do controle (4,67 UA no controle e 4,86 UA no paciente).

A figura 35 mostra a comparação dos perfis de expressão entre o grupo normal, os pacientes α -talassêmicos e os β -talassêmicos, com seus respectivos controles.

A



B



C

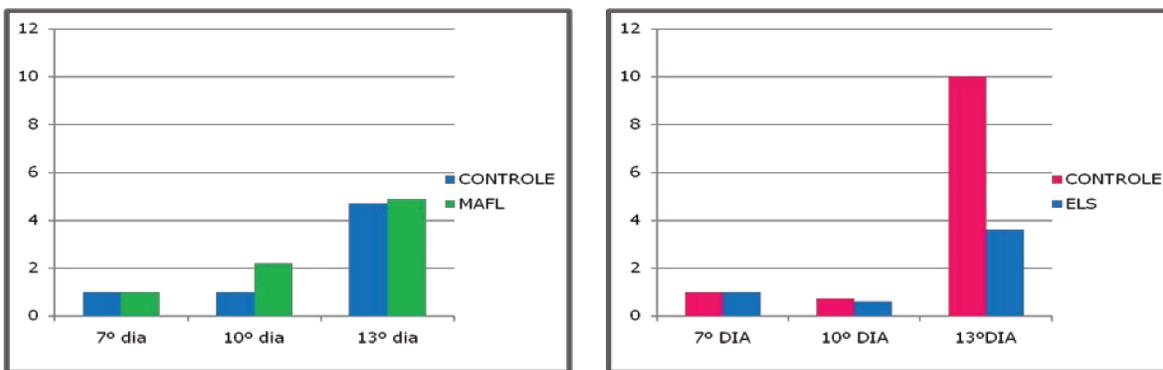
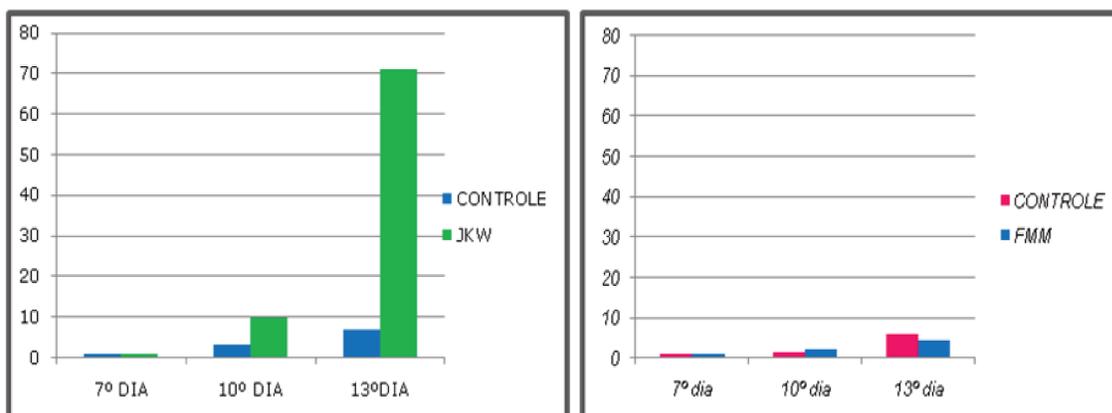


Figura 35: Comparação dos perfis de expressão do gene PIPKII α entre o grupo normal (A), os pacientes α -talassêmicos JKW e FMM (B) e os β -talassêmico MAFL e ELS (C), com seus controles.

Na figura 35, temos, de ambos os lados (α e β -talassemia), resultados que apóiam (pacientes JKW e ELS), corroborando os resultados do trabalho de Wenning, e resultados que não apóiam (pacientes FMM e MAFL) nossa hipótese de relação entre as PIPKs e a expressão dos genes de globinas. Talvez a diferença encontrada nos pacientes com talassemia α possa ser explicada pelos diferentes genótipos ($--^{SEA}/\alpha^{HpH}\alpha$ em JKW e $-\alpha^{3,7}/--$ em FMM), notando que no primeiro a doença é causada pela associação entre uma deleção e uma mutação não-delecional, enquanto no segundo há a associação de duas deleções; ainda, pela diferença na percentagem de Hb H (16,8% em JKW e 10% em FMM), ou, por outros fatores que desconhecemos mas que sugerem mecanismos diferentes atuando aqui. Por outro lado, o paralelismo entre os níveis de expressão do gene PIPKII e do de globina β foi aparentemente mantido: a expressão deste último nas células do paciente JKW foi quase 2,5 vezes maior que a do paciente FMM (69 UA em JKW e 27UA em FMM) (Figura 36). De acordo com os achados de Wenning et al. (2009), a diferença na percentagem de Hb H seria devida aos níveis de expressão do gene β e estaria refletida no índice hematimétrico HCM (Hemoglobina Corpuscular Média), ou seja, o menor valor de HCM resulta de uma maior incapacidade de síntese e preenchimento das células vermelhas com cadeias β . Analisando os dados hematimétricos dos pacientes JKW e FMM, observamos que o HCM em FMM é menor que em JKW (18,1pg e 20,2pg, respectivamente), corroborando os achados de Wenning et al., 2009.

A (PIP2I α)



B (Globina β)

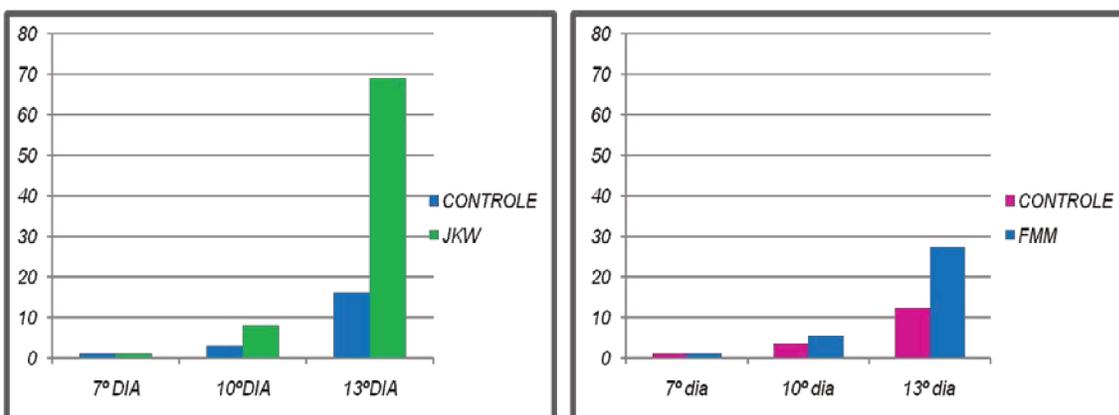


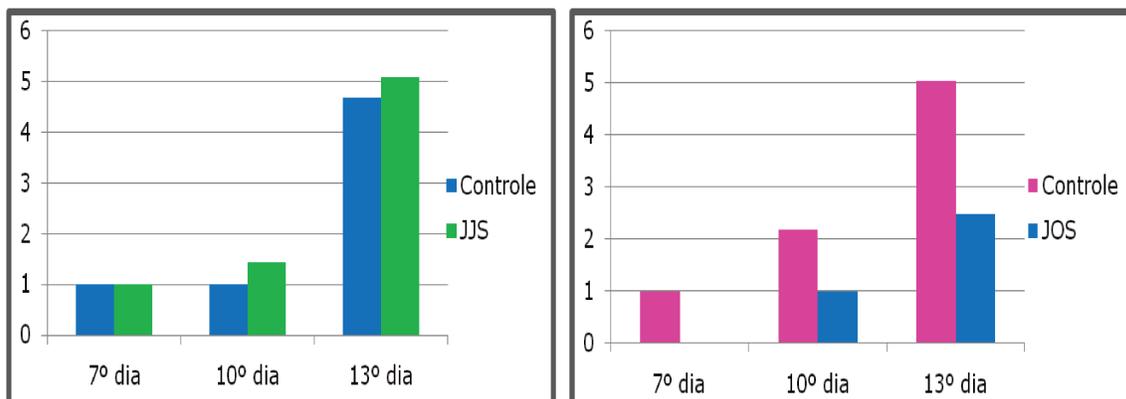
Figura 36: Comparação dos perfis de expressão dos genes PIP2I α (A) e da globina β (B) entre os pacientes α -talassêmicos JKW e FMM.

Já em relação aos pacientes β -talassêmicos, que têm a mesma base molecular da doença, outros fatores possivelmente levam às diferenças encontradas. Em um deles (ELS) a expressão do gene PIP2I α estava reduzida em relação ao seu respectivo controle, corroborando resultados encontrados no trabalho de Wenning et al, onde a expressão desse gene também encontrou-se diminuída nos reticulócitos de três pacientes com Talassemia β intermediária. Entretanto, nenhum deles, apresentou a expressão do gene PIP2I α

significativamente elevada, como o observado nos dois pacientes α -talassêmicos estudados por Wenning et al. (2009), e no paciente JKW aqui investigado.

Os níveis de expressão do gene $PIP2I\alpha$ nos pacientes com Anemia Falciforme também diferiram: nas células de JJS, a expressão foi discretamente maior do que nas de seu respectivo controle (5,1 UA no paciente e 4,7 UA no controle), enquanto nas células de JOS, ela foi menor do que no controle (2,5 UA no paciente e 5 UA no controle). A Anemia Falciforme é relacionada a uma grande heterogeneidade clínico-laboratorial que ainda não é completamente entendida (Rosse et al., 2000; Lettre et al., 2008). Por outro lado, a expressão do gene $PIP2I\alpha$ acompanhou a do gene de globina β , como pode ser observado na Figura 37, onde se observa que o paciente JJS, que apresenta uma expressão aumentada do gene β em relação ao seu controle também apresenta uma expressão aumentada de $PIP2I\alpha$.

A (PIP2I α)



B (Globina β)

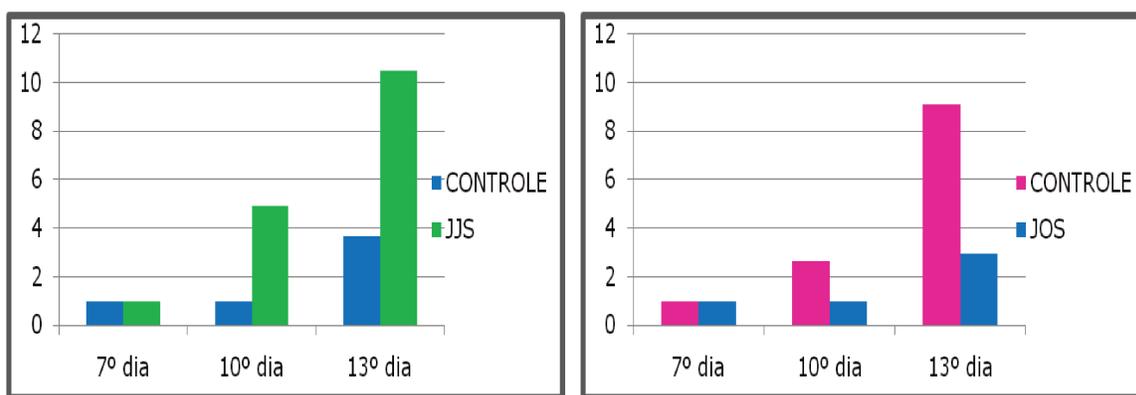


Figura 37: Comparação entre os perfis de expressão dos genes PIP2I α (A) e da globina β (B) nos pacientes com Anemia Falciforme JJS e JOS.

Os perfis de expressão da maioria dos outros genes PIPKs, apesar de similares, foram heterogêneos entre os pacientes. Em FMM α (-talassêmico), MAFL (β -talassêmico) e JOS (Falciforme) a expressão do gene PIP2I α encontrou-se diminuída no 13º dia. Nos pacientes ELS (β -talassêmico) e JJS (Falciforme) a expressão dos genes PIPKs α , I γ , II β e III mostrou-se reduzida no 10º dia, voltando a aumentar no 13º dia da cultura.

Embora com perfis similares, os níveis de expressão dos genes PIPKs variaram entre os pacientes de cada grupo. Como todos têm anemia hemolítica, esperava-se que pelo

menos as PIPKs tipo I e III, por serem proteínas presentes na membrana das células (Anderson et al., 1999), estivessem aumentadas em relação ao controle em todos os pacientes, porém, esse resultado só foi observado nos pacientes JKW (α -talassêmico), ELS e MAFL (β -talassêmicos) e JJS (Falciforme), enfatizando a dificuldade em se concluir sobre dados obtidos de números de indivíduos não representativos de suas populações.

Como já demonstrado nos resultados, o nível de expressão das globinas na cultura eritróide dos pacientes, particularmente nos talassêmicos, foi diferente do esperado. No paciente α -talassêmico JKW, a globina α deveria estar menos expressa que no controle, já que na Talassemia α temos uma redução ou até mesmo ausência da síntese da cadeia α da Hb. Entretanto, ela apresentou-se extremamente mais expressa em relação ao seu controle (244 UA no paciente JKW e 26 UA no controle). Nos dois pacientes β -talassêmicos (MAFL e ELS), a globina β , que também deveria ser menos expressa, mostrou-se elevada em relação ao seu controle. Não compreendemos essas observações, mas sugerimos a possibilidade de um mecanismo compensatório *in vitro* que leve ao aumento da transcrição do gene presente, porém, sem tradução em proteína. Esse fato pode, então, ser demonstrado pela análise protéica das globinas em uma amostra da cultura do paciente α -JKW (α -talassêmico) e do seu respectivo controle, através do HPLC de fase reversa. Como esperado, as cadeias α do paciente encontraram-se reduzidas em relação ao seu respectivo controle (globina β =38% e globina α =50% no controle; globina β =52% e globina α =35% no paciente). Assim, os dados de síntese de globinas obtidos nos pacientes não nos permitiu inferir conclusivamente a relação entre a PIPKIIa e a globina β , mostrando que os mecanismos relacionados ao controle da síntese protéica são, provavelmente, muito complexos e variáveis em situações diferentes.

As atividades das PIPKs, como já discutido, estão presentes em vários compartimentos subcelulares, incluindo a membrana plasmática, o citosol, o retículo endoplasmático, o citoesqueleto e o núcleo (Loijens et al., 1996, Anderson et al., 1999). Em 1998, Boronenkov et al., demonstraram que as PIPKI α e PIPKI β estão associadas a domínios subnucleares, identificados como “*nuclear speckles*”, que contêm fatores participantes do processamento de mRNA, sugerindo, portanto, o envolvimento dessas quinases na expressão gênica. Entretanto, o mecanismo pelo qual elas diretamente regulam essas funções permanece desconhecido, com poucos trabalhos tentando elucidar a regulação da expressão gênica por esses fosfoinosítídeos nucleares (Mellman et al., 2008; Mellman e Anderson, 2009).

As PIPKs têm também sido alvo de estudos como reguladores da sinalização durante o desenvolvimento dos organismos e como alterações nas suas funções podem levar a doenças humanas (Skwarek e Boulianne, 2009), pois são essenciais para a regulação precisa da sinalização em múltiplos processos celulares.

Os genes das PIPKs, particularmente o da PIPKI α , aumentam gradativamente sua expressão durante a diferenciação eritróide, em um perfil que muito se assemelha ao dos genes de globinas, particularmente aos dos genes das globinas α e β . Esta demonstração sugere que o produto das PIPKs, o PI4,5P₂, possa ter, como importante mensageiro secundário envolvido com a regulação da expressão gênica, um papel relevante na regulação da expressão dos genes de globinas e no processo normal de síntese de hemoglobina nos eritrócitos. Em condições patológicas, como nas Talassemias e Anemia Falciforme, parece haver uma variabilidade que só com a avaliação de um número maior de casos poderá ser melhor compreendida, no sentido de se buscar o que os casos que

apresentam aumento da PIPKII α em comum que leva a esse tipo de resposta, não observada em outros casos com a mesma doença.

Este é, de nosso conhecimento, o primeiro estudo a estabelecer os perfis de expressão dos genes PIPKs durante a diferenciação eritróide humana *in vitro* em um grupo de indivíduos normais. Ele revela que a expressão do gene PIPKII α , bem como dos demais genes PIPKs, aumenta à medida que as células se tornam mais diferenciadas, acompanhando o perfil de expressão das globinas, evidência de uma relação entre estas enzimas e a síntese de Hb.

Seis pacientes com hemoglobinopatias foram adicionalmente analisados. Os resultados foram um pouco contraditórios, heterogêneos e diferentes do esperado. Nas três situações patológicas (Talassemia α , Talassemia β e Anemia Falciforme), a maioria das PIPKs apresentou o mesmo comportamento, ou seja, expressão equivalente ou aumentada em relação ao controle. A diferença encontrada entre esses pacientes foi em relação à expressão dos genes PIPKII α e globina β , ambos proporcionalmente mais expressos nos pacientes α -talassêmicos (paciente JKW e pacientes estudados por Wenning et al., 2009), enquanto nos pacientes β -talassêmicos e com Anemia Falciforme, a expressão de ambos os genes apresentou-se normal ou diminuída em relação ao controle. Sugerimos assim um modelo para tentar explicar a relação entre esses dois genes. Como há dados na literatura mostrando que o PI4,5P₂ participa da regulação da expressão gênica (Anderson et al., 1999; Bunce et al., 2006a), nossa hipótese é a de que, na Talassemia α , o mesmo poderia conferir estabilidade às moléculas de mRNA da globina β de modo a garantir sua tradução. Quanto mais PI4,5P₂, maior seria a tradução de transcritos da globina β .

Estudos futuros, com diferentes abordagens e métodos, e um número maior de casos estudados, poderão contribuir para uma melhor avaliação e compreensão do papel dessas quinases nas células eritróides. A análise da expressão gênica em paralelo com a análise protéica, tanto das globinas quanto das PIPKs, será muito importante, pois nos permitirá determinar a relação entre RNA e proteína na cultura de células. Se possível, a quantificação do próprio PI4,5P₂, a fim de verificar se sua síntese ou distribuição celular também é alterada quando temos alteração na expressão do gene PIPKII. Mas isso, por enquanto, não parece ser tecnicamente viável. O silenciamento do gene PIPK II α através da técnica de RNA de interferência, se bem sucedido, seria também uma tentativa de acesso à seguinte questão: o silenciamento do gene PIPKII leva à redução da expressão ou tradução dos genes de globina ou da síntese de hemoglobina? Aumentar o número de pacientes a serem estudados e tentar a abordagem acima mencionada é o que prevemos como continuidade deste trabalho.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

- Em células eritróides em cultura, obtidas de indivíduos normais, a expressão do gene PIPKII α aumentou gradativamente durante a diferenciação eritróide;
- O perfil de expressão dos genes das demais PIPKs (I β , I γ , II β , II γ e III) foi similar ao do gene PIPKII α , aumentando ao longo da diferenciação eritróide;
- O perfil de expressão dos genes das PIPKs acompanhou o perfil de expressão dos genes de globinas, particularmente das globinas α e β , sugerindo uma relação entre eles;
- Em células eritróides em cultura, obtidas de pacientes, os resultados dos perfis de expressão dos genes das PIPKs foram heterogêneos, revelando uma maior complexidade no processo de regulação gênica. Os dados obtidos, entretanto, em parte corroboram a hipótese de uma relação entre o gene PIPKII α e a produção de globina β .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Anderson RA, Boronenkov IV, Doughman SD, Kunz J, Loijens J. Phosphatidylinositol Phosphate Kinases, a Multifaceted Family of Signaling Enzymes. *J Biol Chem* 1999; 274 (15):9907-910.

Backman L. Protein cytoskeleton. Functional or futile phosphorus. *Nature* 1988; 334:653.

Bazenet CE, Ruano AR, Brockman L, Anderson RA. The Human Erythrocyte Contains Two Forms of Phosphatidylinositol 4 – phosphate 5 – kinase Which Are Differentially Active Toward. *J Biol Chem* 1990; 265 (29):18012-22.

Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*. New York, McGraw-Hill Companies; 2001.

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

Boronenkov IV, Anderson RA. The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *J Biol Chem* 1995; 270(7):2881-4.

Boronenkov IV, Loijens J, Umeda M, Anderson RA. Phosphoinositide Signaling Pathways in Nuclei Are Associated with Nuclear Speckles Containing Pre-mRNA Processing Factors. *Mol Biol Cell* 1998; 9 (12):3547-60.

Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG. Phosphatidylinositol 4,5 – bishosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* 2001; 154 (5):1007-17.

Bunce MW, Bergendahl K, Anderson RA. Nuclear PI(4,5)P₂: A new place for an old signal. *Biochim Biophys Acta* 2006a; 1761(5-6):560-9.

Bunce MW, Gonzales ML, Anderson RA. Stress-ING Out: Phosphoinositides mediate the cellular stress response. *Sci STRE* 2006b; 1-3.

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

Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia. *JAMA* 1997; 278(15):1273-7.

Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide Kinases. *Biochemistry* 1990; 29(51):11147-56.

Castellino AM, Parker GJ, Boronenkov IV, Anderson RA. A novel interaction between the juxtamembrane region of the p55 tumor necrosis factor receptor and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(9):5861-70.

Ciruela A, Hinchliffe KA, Divecha N, Irvine RF. Nuclear targeting of the β isoform Type II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its α -helix 7. *Biochem J* 2000; 346:587-91

Chui DHK, Furcharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 2003; 101 (3):791-800.

Costa FF. Anemia Falciforme. In: Zago, M.A.; Falcão, R.P.; Pasquini, R. Hematologia, Fundamentos e Prática. 1ª edição, São Paulo. Atheneu. Cap7, p.289-308, 2001.

Costa FF, Sonati MF. Hemoglobina: estrutura, síntese e transporte de oxigênio. In: Covas DT, Langhi-Junior DM, Bordin JO. Hemoterapia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu; p.27-33, 2007.

De Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-

initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem cells* 1998; 16(6):387-96.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(12):6025-30.

Di Paolo G e De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006; 443:651-57.

Di Renzo A, Novelletto A, Aliquo MC, Bianco I, Tagarelli A, Brancatti, C, Colombo B, Felicetti L. Molecular Bases for Hb H Disease in Italy: nondeletional Alpha- Thalassemia Haplotypes. *Am J Hum Genet* 1986; 39: 631-9.

Divecha N, Brooksbank CEL, Irvine RF. Purification and characterization of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase. *Biochem J* 1992; 288:637-42.

Divecha N, Truong O, Hsuan JJ, Hinchliffe KA, Irvine RF. The cloning and sequence of the C isoform of PtdIns4P 5-kinase. *Biochem J* 1995; 309:715-19.

Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA. Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P₂ in its place. *J Membr Biol* 2003; 194(12):77-89.

Echavarria RA, Molina VC, Angel BM. Enfermedad por Hemoglobina H: Tercera Forma de Alfa- Talasemia Encontrada em Colômbia. *Sangre (Barc)* 1976; 21(1):43-53.

Embury SH, Miller JA, Dozy AM, Kan YW, Chan V, Todd D. Two different molecular organizations account for the single alpha globin gene of the alpha-thalassemia-2 genotype. *L Clin Invest* 1980; 66:1319-25.

Folayan-Esan GJ. The Thalassaemia Syndromes in Nigeria. *Br J Haematol* 1970; 19: 47-56.

Forget BG. Molecular genetics of human globin genes. In: *Disorders of hemoglobin*. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Cambridge University Press. Cambridge, UK, 2001.

Fried W. Erythropoietin and erythropoiesis. *Exp Hematol* 2009; 37(9):1007-15.

Fritsch EF, Lawn RM, Maniats T. Molecular cloning and characterization of the human β -like globin gene cluster. *Cell* 1980; 19:959-72.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide Kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:481-507.

Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. *Hemoglobin* 1987; 11: 65-88.

Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairuan V. Beta-Thalassemia Associated with Alpha-Thalassemia in Thailand. *Hemoglobin* 1988; 12: 581-92.

Gachon C, Mingam A, Charrier B. Real-time PCR: what relevance to plant sydies? *J Exp Bot* 2004; 55:1445-54.

Galanello R, Maccioni L, Ruggeri R, Perseu L, Cao A. Alpha Thalassaemia in Sardinian Newborns. *Br J Haematol* 1984; 58: 361-8

Gardocki ME, Jani N, Lopes JM. Phosphatidylinositol biosynthesis: biochemistry and regulation. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1735(2):89-100.

He Z, Li Z, Shi Y, Tang W, Huang K, Ma G, Zhou J, Meng J, Li H, Feng G, He L. The PIP5K2A gene and schizophrenia in the Chinese population--a case-control study. *Schizophr Res* 2007; 94(1-3):359-65.

Heath CM, Stahl PD, Barbieri MA. Lipid kinases play crucial and multiple roles in membrane trafficking and signaling. *Histol Histopathol* 2003; 18:989-98.

Heck JN, Mellman DL, Ling K, Sun Y, Wagoner MP, Schill NJ et al. A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42:15-39.

Heni T, Morlé F, Lopez B, Colonna R, Godet J. Alpha-Thalassemia Haplotypes in the Algerian Population. *Hum Genet* 1987; 75: 272-6.

Hermine O, Roméo PH. Regulation of erythropoiesis. In: *The Handbook ESH – Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis*. Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C, Editors. Chapter 2, p. 39-70, 2006.

Higgs DR, Pressley L, Serjeant GR, Clegg JB, Weatherall DJ. The Genetics and Molecular Basis of Alpha-Thalassaemia in Association with HbS in Jamaican Negroes. *Br J Haematol* 1981; 47:43-56.

Higgs DR, Vickers MA, Vikié AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood* 1989; 73(5):1081-104.

Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, Sharpe J, Lida J, Pretorius IM et al. A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. *Genes Dev* 1990; 4(9):1588-601.

Higgs DR. Alpha-Thalassemia. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6(1):117-50.

Higgs DR, Garrick D, Anguitta E, DE Gobbi M, Hughes J, Muers M et al. Understanding α -globin gene regulation: aiming to improve the management of thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054:92-102.

Higgs DR, Weatherall DJ. The Alpha Thalassaemias. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:1154-62.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993; 11(9):1026-30.

Hinchliffe KA, Irvine RF. Regulation of type II PIP Kinase by phosphorylation. *Cell Signal* 2006; 18(11):1906-13.

Hinchliffe KA, Giudici ML, Letcher AJ, Irvine RF. Type II α phosphatidylinositol phosphate kinase associates with the plasma membrane via interaction with type I isoforms. *Biochem J* 2002; 363:563-70.

Hokin LE, Hokin MR. The incorporation of ^{32}P from triphosphate into polyphosphoinositides (γ - ^{32}P) adenosine and phosphatidic acid in erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1964; 84:563-75.

Homma K, Terui S, Minemura M, Qadota H, Anraku Y, Kanaho Y et al. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273 (25):15779-86.

<http://hembase.niddk.nih.gov>

Hughes JR, Cheng JF, Ventress N, Prabhakar S, Clark K, Anguita E et al. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and, functional assessment of multispecies conserved sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(28):9830-35.

Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Katagiri H, Yazaki Y, Asano T et al. Cloning of cDNA encoding two isoforms of 68-kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase. *J Biol Chem* 1996; 271(39):23611-14.

Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Wada T, Yazaki Y, Asano T et al. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinases: Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 1998; 273(15):8741-48.

Jarman AP, Wood WG, Sharpe JA, Gourdon G, Ayyub H, Higgs DR. Characterization of the major regulatory element upstream of the human α -globin gene cluster. *Mol Cell Biol* 1991; 11(9):4679-89.

Jones DR, Bultsma WJ, Keune JR, Halstead D, Elouarrat S, Mohammed AJ et al. Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an in vivo role for PIP4Kbeta. *Mol Cell* 2006; 23(5):685-95.

Kanaho Y, Kobayashi A, Yokozeki T. The phosphoinositide kinase PIP5K that produces the versatile signaling phospholipid PI4,5P₂. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(9):1605-9.

Kanavakis E, Tzotzos S, Liapaki A, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis, A. Frequency of Alpha-Thalassemia in Greece. *Am J Hematol* 1986; 22: 225-32.

Kanavakis E, Trager-Synodinos JM, Papatotiriou I, Vrettou C, Metaxotou-Mavromati A, Stamoulakatou A et al. The interaction of α^0 -thalassaemia with Hb Icaria: three unusual cases of haemoglobinopathy H. *Br J Haematol* 1996; 92(2):332-35.

Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Fortina P. Human alpha-thalassemia syndromes: Detection of Molecular Defects. *Am J Hematol* 1996; 53(2):81-91.

KEGG (*Kioto Encyclopedia Genes and Genoma*) – www.genoma.jp/kegg

Kunz J, Wilson MP, Kisseleva M, Hurley JH, Majerus PW, Anderson RA. The activation loop of phosphatidylinositol phosphate kinases determines signaling specificity. *Mol Cell* 2000; 5(1):1-11.

Lette G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the *BCL11A*, *HBS1L-MYB*, and β -*globin* loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 11869-74.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257(5072):967-71.

Ling LE, Schulz JT, Cantley LC. Characterization and purification of membrane-associated phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from human red blood cells. *J Biol Chem* 1989; 264 (9): 5080-88.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001; 25:402-8.

Loijens J, Boronenkov IV, Parker GJ, Anderson RA. The phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family. *Adv Enzyme Regul* 1996; 36:115-40.

Loijens JC, Anderson RA. Type I phosphatidylinositol-4 phosphate-5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 1996; 271(51):32937-43.

Mahajan MC, Karmakar S, Newburger PE, Krause DS, Weissman SM. Dynamics of α -globin locus chromatin structure and gene expression during erythroid differentiation of human CD34+ cells in culture. *Exp Hematol* 2009; 37:1143-56.

Malik P, Fisher TC, Barsky LW, Zeng L, Izadi P, Hiti AL et al. An in vitro model of human red blood cell production from hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998; 91(8):2664-71.

Martinez G, Colombo B. Alpha-Thalassaemia in Cuba. *Acta Haematol* 1976; 55:6-9.

Meijerink J, Mandigers C, Locht LV, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn* 2001; 3(2):55-61.

Mellman DL, Gonzales ML, Song C, Barlow CA, Wang P, Kendzioriski C et al. A PtdIns4,5P₂-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. *Nature* 2008; 451(7181):1013-17.

Mellman DL, Anderson RA. A novel gene expression pathway regulated by nuclear phosphoinositides. *Adv Enzyme Regul* 2009; 49:11-28.

Nicholls RD, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. α^0 -Thalassemia Due to Recombination Between the α -Globin Gene and *Alu* I Repeat. *Blood* 1985; 65: 1434-38.

Ozsoylu S, Malik SA. Incidence of Alpha-Thalassemia in Turkey. *Turk J Pediatr* 1982; 24(4): 235-44.

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

Rameh LE, Tolias KF, Duckworth BC, Cantley LC. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* 1997; 390(6656):192-6.

Rao VD, Misra S, Boronenkov IV, Anderson RA, Hurley JH. Structure of type II β phosphatidylinositol phosphate kinase: a protein kinase fold flattened for interfacial phosphorylation. *Cell* 1998; 94(6):829–39.

Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha thalassemia. *Genet Mol Res* 2008; 7(4):1045-53.

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.

Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. Wiley-Liss, Fourth edition, 2003.

Skwarek LC e Boulianne GL. Great expectations for PIP: Phosphoinositides as regulators of signaling during development and disease. *Dev Cell* 2009; 16(1):12-20.

Smith CM, Kuettner JF, Turey DP, Burris SM, White JG. Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. *Blood* 1981; 58(1):71-77.

Sonati MF, Costa FF. Hemoglobin Bart's in a Brazilian Black Population. *Brazilian J Med Biol Res* 1990; 23:395-6.

Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin* 1991; 15(4): 309-11.

Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Ped* 2008; 84(4):S40-51.

Stammatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varnus H. *The molecular bases of blood diseases*. Philadelphia: Saunders Company; 1994.

Steinber MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, Bunn HF. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge University Press; 2001.

Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. Trends Pharmacol Sci 2006; 27(4): 204-10.

Thein SL. β -Thalassaemia. In: Rodgers GP. Baillieres Clin Haematol 1998; 11(1):91-126.

Thiselton DL, Maher BS, Webb BT, Bigdeli TB, O'Neill FA, Walsh D et al. Association analysis of the PIP4K2A gene on chromosome 10p12 and schizophrenia in the Irish study of high density schizophrenia families (ISHDSF) and the Irish case-control study of schizophrenia (ICCS). Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2009. (*in press*)

Toker A. The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Curr Opin Cell Biol 1998; 10(2):254-61.

Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Tzetis M, Kattamis A, Kattamis C. Characterization of nondeletional alpha-thalassemia mutations in the Greek population. Am J Hematol 1993; 44(3):162-67.

Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lécluse Y, Debili N et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. Exp Hematol 2004; 32:179-87.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002; 3(7):1-12.

Vanguilder H, Vrana K, Freeman W. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques 2008; 44(5):619-26.

Vekilov PG. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event sickle-cell anaemia? *Br J Haematol* 2007; 139:173-84.

Voon HP, Vadolas J. Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia. *Haematologica* 2008; 93(12):1868-76.

Weatherall DJ. The Thalassemias. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Rundles RW. *Hematology*. 4^a ed. New York: McGraw Hill Book Company; 1990.

Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*. 4^a ed. Oxford: Blackwell Science Ltda; 2001.

Wenning MR, Harteveld CL, Giordano PC, Kimura EM, Saad ST, Costa FF et al. Hemoglobin H disease resulting from the association of the - alpha 3.7 rightward deletion and the $(\alpha\alpha)^{MM}$ deletion in a Brazilian patient. *Eur J Haematol* 2002; 69(3):179-81.

Wenning MR, Sonati MF. Hemoglobinopatias hereditárias. In: Lopes AC, editor. *Diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Manole, p.310-4; 2007.

Wenning MRSC. Expressão gênica diferencial em reticulocitos de pacientes com Doença da Hemoglobina H. (Tese doutorado). Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007.

Wenning MR, Mello MP, Andrade TG, Lanaro C, Albuquerque DM, Saad ST et al. PIP4KIIA and beta-globin: transcripts differentially expressed in reticulocytes and associated with high levels of Hb H in two siblings with Hb H disease. *Eur J Haematol* 2009; 42(9):783-6.

Zago MA, Costa FF, Bottura C. Hemoglobin H Disease in three brazilian families. *Rev Brasil Genet*. VII 1984; (1): 137-47.

Zago MA, Costa FF. Hereditary Haemoglobin Disorders in Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1985; 79: 385-8.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu; 2004.

Zhang HB, Liu DP, Liang CC. The Control of Expression of the alpha-globin gene cluster. Int J Hematol 2002; 76(5):420-26.