

CAMILA ORESCO DOS SANTOS

**Estudo da expressão do gene *AHSP*
(Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein) na diferenciação de
eritrócitos em cultura e em pacientes com β -talassemia**

CAMPINAS

2004

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, Área Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento
Campinas, 20 de fevereiro de 2004.


Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Orientador

CAMILA ORESO DOS SANTOS

**Estudo da expressão do gene *AHSP*
(Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein) na diferenciação de
eritrócitos em cultura e em pacientes com β -talassemia**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em
Fisiopatologia Médica, área de Medicina Experimental.*

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TI UNICAMP
	Sa59e
V	EX
TOMBO BC/	59179
PROC.	16 - 117 - 04
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/07/04
Nº CPD	

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

CM00198255-7

318 id. 318252

Sa59e Santos, Camila Oresco dos
Estudo da expressão do gene *AHSP* (Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein) na diferenciação de eritrócitos em cultura e em pacientes com β -talassemia / Camila Oresco dos Santos. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Talassemia. 2. Hemoglobinopatia. 3. Hemoglobina. I.
Fernando Ferreira Costa. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Membros:

1.

2.

3.

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

Data: 20.02.2004

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Celso e Valdete, pelo amor, respeito, confiança e apoio;

Aos meus irmãos, Silvia e Celso Júnior, pela amizade e apoio e otimismo;

Aos meus familiares, pela força.

Ao Anderson, o “xu”, meu grande companheiro de sempre, pelo carinho, ajuda, compreensão e incentivo;

A Larissa, “meu coração”, por preencher minha vida de alegria;

Às minhas grandes amigas Diana, Luana e Raquel, que o tempo e a distância nunca nos separe;

A Deus, pela perseverança, presença e fé.

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

A Dra. Sara Teresinha Olalla Saad pelo apoio e dicas.

Ao Dr. Fernando Alberto Lopes pelos ensinamentos e apoio.

À Eliane, pela delicadeza e pela correção.

Ao Roberto, pela estatística.

Aos amigos Juliana e André, amizade, descontração e pelas informações clínicas.

Ao Anderson, meu melhor amigo, meu sonho em conjunto.

A Dulcinéia, minha mais nova amiga, pelos conselhos, confiança e diversão.

À Ângela, a “santa das bênçãos”, pela amizade, aventuras e companheirismo.

A Ucha, pelas risadas.

À Adriana pela cultura, amizade e confidências.

A Márcia, pelo “cabelézimo”.

A Tereza da pós-graduação, pela ajuda e atenção.

A Sheley, a “pititica”, pelas lembranças.

A Ana Paula, Anderson, Marcos (Scaff) e Gisele por terem sido minha inspiração, exemplo e amizade.

Aos amigos do laboratório Helo, Dil, Denise, Lena, Manoela, Babi, Flávia, Silvia, Aída, Tiago, Luciana, Luciana (Bella), Denis, Gustavo, Raimundo, Paty, Paty (secretária), Andréia, Raquel, Samuel, Tereza, Marcelo, Nic, Carol, Eliane, Tarcísio, Hélvia, Érika, Paulo, Flavinha, Tati, Natasha, Dra. Carmen, Erick e a todos os outros aqui não mencionados, mas que fizeram parte de uma alegre convivência.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis..."

(Desconhecido)

	PÁG.
RESUMO	xxxi
ABSTRACT	xxxv
INTRODUÇÃO	39
OBJETIVOS	53
MATERIAIS E MÉTODOS	57
1- Casuística.....	59
2- Extração de DNA.....	60
3- Proliferação e maturação dos progenitores eritróides humanos em cultura líquida de duas fases.....	60
4- Extração de RNA.....	62
5- Síntese de cDNA.....	63
6- PCR quantitativo em tempo real – “Real Time PCR”.....	64
7- Seqüenciamento de DNA.....	72
8- Análise Estatística.....	74
RESULTADOS	75
1- Cultura eritróide em duas fases.....	77
2- Análise da expressão gênica durante a diferenciação eritróide normal.....	80
3- Análise da expressão gênica em pacientes com β -talassemia e em controles.....	84
4- Análise estrutural do gene <i>AHSP</i>	91

DISCUSSÃO.....	103
CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXOS.....	123
1- Carta consentimento paciente.....	125
2- Carta consentimento controles.....	127
3- Tabela geral de mutações e polimorfismos em pacientes.....	129
4- Tabela geral de mutações e polimorfismos em controles.....	131
APÊNDICES.....	133
1- Expression of α -hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis – SANTOS, C.O., DUARTE, A.S.S., SAAD, S.T.O., COSTA, F.F. Experimental Hematology, 2004.....	135

pO₂	-	Pressão de Oxigênio
O₂	-	Oxigênio
Fe⁺²	-	Ferro
CO₂	-	Gás carbônico
EKLF	-	Fator de transcrição ‘erythroid Kruppel-like factor’
HbA₂	-	Hemoglobina Adulta tipo 2
HbF	-	Hemoglobina Fetal
MCV	-	Volume corpuscular médio
MCH	-	Hemoglobina corpuscular média
LCR	-	Região controladora de locus
HU	-	Hidroxiuréia
EDRF	-	Erythroid differentiation related factor
AHSP	-	Alpha-haemoglobin stabilizing protein
SNPs	-	Single nucleotide polymorphism
IMDM	-	Iscoe’s Modified Dulbecc’os Medium
PE	-	Ficoeritrina
FITC	-	Fluoresceína isotiocianato
TFI	-	Transcription finish initiative
CT	-	Cycle Threshold
ΔCT	-	Ct do gene alvo menos Ct do gene endógeno
ΔΔCT	-	ΔCT da amostra a ser quantificada menos ΔCT da amostra referência

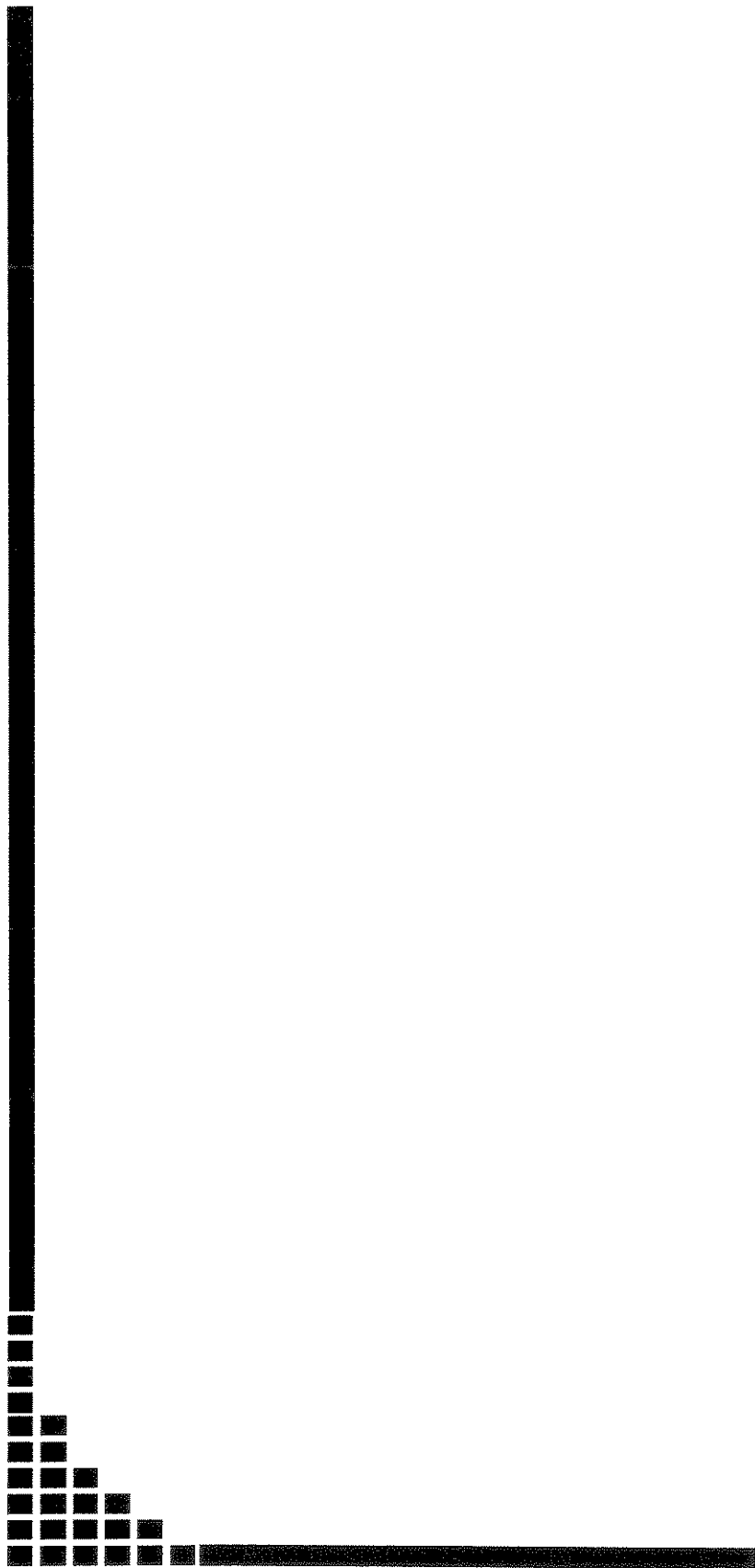
$2^{-\Delta\Delta CT}$	-	Fórmula aritmética para quantificação em PCR em tempo real
TM	-	Temperature Melting
EPO	-	Eritropoetina
BFU-E	-	Unidade formadora de burst eritróide
CFU-E	-	Unidade formadora de colônia eritróide
RNA	-	Ácido ribonucléico
cDNA	-	DNA complementar
mRNA	-	RNA mensageiro
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
NH₄Cl	-	Cloreto de amônio
NH₄HCO₃	-	Bicarbonato de amônio
KCl	-	Cloreto de potássio
CHCL₃	-	Clorofórmio
DEPC	-	Dietilpirocarbonato
Mg⁺⁺	-	Magnésio
RBC	-	‘Red Blood Cell’
NaOH	-	Hidróxido de Sódio

	PAG.
Tabela 1- Frequência de mutações no gene β -globina na população do Sudeste brasileiro.....	46
Tabela 2- Quadro com os possíveis tipos de β -talassemia, suas representações alélicas, tipo de hemoglobinas presentes e características clínicas relacionadas.....	47
Tabela 3- Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação de genes da técnica de PCR quantitativo em tempo real.....	65
Tabela 4- Concentração de <i>primers</i> utilizados na amplificação de genes na técnica de PCR quantitativo em tempo real.....	66
Tabela 5- Temperatura de dissociação dos produtos de PCR gerados pelos genes estudados.....	70
Tabela 6- Descrição dos <i>primers</i> utilizados na amplificação da região estrutural do gene <i>AHSP</i>	72
Tabela 7- Análise da razão da expressão dos genes <i>AHSP</i> / α -globina durante a diferenciação eritróide.....	84
Tabela 8- Dados gerais de pacientes com β -talassemia envolvidos neste estudo.....	85
Tabela 9a- Análise da razão da expressão dos genes <i>AHSP</i> / α -globina em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles.....	90
Tabela 9b- Análise da razão da expressão dos genes <i>AHSP</i> / α -globina em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles.....	90
Tabela 10- Relação de SNPs já descritos no gene <i>AHSP</i>	91

Tabela 11-	Relação de polimorfismos e mutações encontradas nos indivíduos analisados neste estudo.....	93
Tabela 12-	Porcentagem de SNPs detectados na análise do DNA de pacientes com β -talassemia e em controles.....	93
Tabela 13-	Análise da presença de polimorfismos em conjunto.....	94
Tabela 14-	Análise comparativa de dados de expressão do gene <i>AHSP</i> , genótipo para β -talassemia e SNPs.....	94
Tabela 15-	Informações genéticas e hematológicas do paciente com mutação 12888 no gene <i>AHSP</i>	99
Tabela 16-	Análise preliminar da estrutura secundária de <i>AHSP</i> com e sem mutação no sítio 12888.....	101

	PÁG.
Figura 1- Desenvolvimento ontogenético normal das cadeias globínicas.....	42
Figura 2- Esquema sobre a fisiopatologia de β -talassemia.....	49
Figura 3- Esquema de função de <i>AHSP</i>	51
Figura 4- Curva de amplificação de PCR quantitativo em tempo real.....	69
Figura 5- Curva de dissociação.....	71
Figura 6- Sequência genômica <i>AHSP</i>	73
Figura 7- Análise morfológica da diferenciação celular durante a cultura eritróide em duas fases.....	78
Figura 8- Análise da diferenciação celular por citometria de fluxo em células eritróides em cultura de duas fases.....	79
Figura 9- Fragmentos do gene <i>AHSP</i> amplificados por PCR.....	92
Figura 10- Eletroferograma de sequências – polimorfismo região 12347.....	95
Figura 11- Eletroferograma de sequências – polimorfismo região 12391.....	96
Figura 12- Eletroferograma de sequências – polimorfismo região 12895.....	97
Figura 13- Eletroferograma de sequências – polimorfismo região 12991.....	98
Figura 14- Eletroferograma de sequências – mutação região 12888.....	100

	PÁG.
Gráfico 1- Análise de eficiência de amplificação.....	67
Gráfico 2- Análise da expressão do gene <i>AHSP</i> durante a diferenciação eritróide.....	81
Gráfico 3- Análise da expressão do gene α -globina durante a diferenciação eritróide.....	82
Gráfico 4- Análise da razão da expressão dos gene <i>AHSP</i> / α -globina durante a diferenciação eritróide.....	83
Gráfico 5- Expressão do gene <i>AHSP</i> em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles.....	87
Gráfico 6- Expressão do gene α -globina em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles.....	88
Gráfico 7- Análise da razão da expressão dos genes <i>AHSP</i> / α -globina em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles.....	89



RESUMO

As síndromes talassêmicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias em que existe uma redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Nas β -talassemias ocorre supressão total ou parcial da produção de cadeias β .

O estado homozigótico da maioria das variantes genéticas de β -talassemia produz o quadro clínico da talassemia maior ou anemia de Cooley. Esses pacientes apresentam acentuada anemia e necessitam de transfusões sanguíneas regulares para sobreviverem. Os indivíduos heterozigotos para β -talassemia apresentam, com raras exceções, apenas discreta anemia. Existem ainda alguns quadros clínicos não tão graves quanto à forma homozigótica clássica, geralmente não dependentes de transfusão, que são denominados de “talassemia intermediária”.

A baixa produção de β -globina em β -talassemia, com a síntese normal de α -globinas resulta num excesso de cadeias α que são responsáveis pela eritropoiese não eficaz, danos à membranas de eritrócitos e redução da vida-média de células vermelhas.

Recentemente foi descrita uma proteína que formaria um complexo estável quando ligado à α -globinas, evitando que estas sofressem oxidação e precipitação. Esta proteína foi denominada *AHSP* (Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein). A caracterização da proteína foi feita em camundongos e, até a presente data, não são encontrados dados da expressão do gene em humanos.

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram feitas análises de expressão gênica durante a diferenciação eritróide humana e em pacientes com β -talassemia, evoluções clínicas maior e intermediária e em indivíduos controles. Foram feitas também análises da sequência de DNA na procura de polimorfismos ou mutações que pudessem estar relacionados com a modulação da expressão ou relacionados com a doença.

A análise da expressão gênica durante a diferenciação eritróide em humanos, mimetizada por cultura de precursores eritróides em cultura de duas fases indica que o gene *AHSP* está sendo requerido durante toda a diferenciação celular, sugerindo que possivelmente *AHSP* está sendo requerido para estabilizar cadeias- α para a formação de hemoglobina.

Em pacientes com β -talassemia, a expressão do gene *AHSP* está aumentada em pacientes com clínica Intermediária quando comparados com pacientes com clínica Maior e controles, enquanto que a expressão de α -globina não demonstra diferenças entre os grupos. Mas dados da razão da expressão do gene *AHSP*/ α -globina demonstram que, quando comparados com os dados obtidos da cultura, os grupos provavelmente apresentam diferenças pelo fato de que β -talassemia intermediária apresentar mais eritroblastos que os outros grupos, mostrando que possivelmente *AHSP* não apresenta relação com a evolução clínica em β -talassemias.

As análises de polimorfismos demonstraram polimorfismos que podem estar relacionado com β -talassemia e uma mutação que pode estar alterando a estrutura protéica de *AHSP* e talvez contribuindo para a pior evolução clínica de pacientes heterozigotos para β -talassemia.

Baseado nestes dados nós prevemos uma importante função deste gene durante a diferenciação eritróide normal, descrevemos polimorfismos que podem relacionar o gene *AHSP* com β -talassemias na população estudada durante o desenvolvimento deste trabalho, descrevemos aqui a primeira mutação detectada no gene *AHSP* que possa mostrar uma possível relação desta proteína com a evolução clínica em β -talassemia, mas uma importância concreta do gene *AHSP* na fisiopatologia da β -talassemia ainda não está bem estabelecida.



ABSTRACT

Thalassemia syndromes are a heterogeneous group of heredity diseases in which there is a reduction in the synthesis of one or more hemoglobin chains. In β -thalassemia there is a reduction or total suppression of the β -globin gene expression.

The homozygous state of most β -thalassemia genetic variants produces the clinic evolution of major thalassemia or Cooley's anemia. These patients present severe anemia and require regular blood transfusions in order to survive. Heterozygous individuals present, with exceptions, discrete anemia. There are some clinical evolutions, not as severe as the classic homozygous form, which are often blood transfusion independent, named β -thalassemia intermedia.

Lower levels of β -globin in β -thalassemia, with normal synthesis of α -globin lead to an unbalanced globin synthesis and to an excessive production of α -globin chains. This results in ineffective erythropoiesis, erythrocyte membrane damage and a shortened lifespan of red blood cells.

Recently, a protein forming a stable complex when connected with α -globin avoiding thus the deleterious effects of α -globin precipitation and oxidation has been described. This protein has been denominated *AHSP* (Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein) and its characterization has only been performed on mice. Until now no data regarding the expression in human genes has been found.

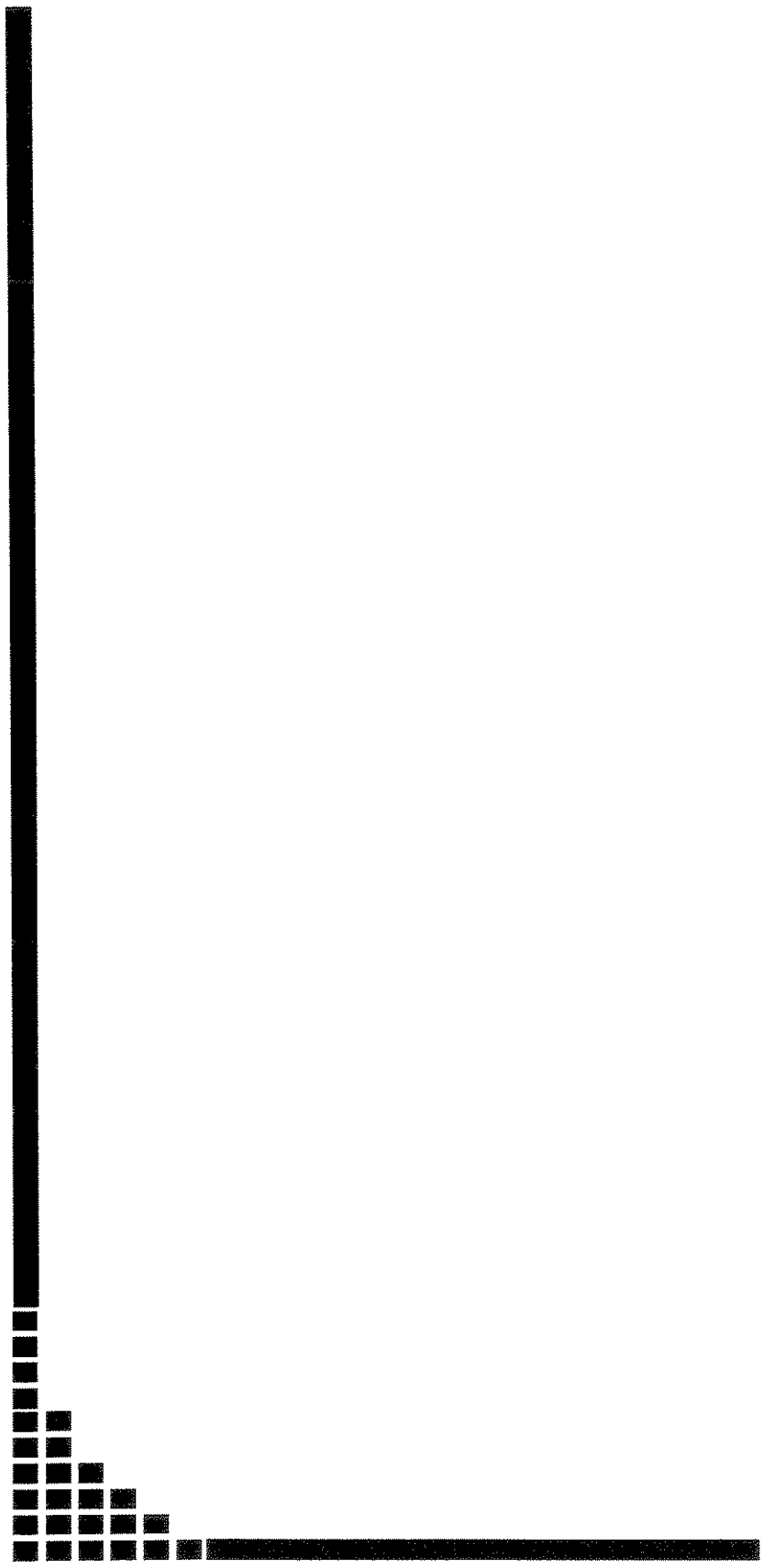
The present study analyzed the gene expression of the *AHSP* gene during human erythroid cell differentiation and in major and intermedia homozygous β -thalassemia patients and in controls. DNA analysis was performed in order to detect polymorphisms or mutations possibly related to expression modulation or to the disease.

The gene expression analysis during human erythroid cell differentiation, reproduced by the culture of the erythroid precursor in two phases demonstrated that the *AHSP* gene is required during the entire cell differentiation, suggesting that *AHSP* may possibly be required to stabilize α -chains in order to form hemoglobin.

In β -thalassemic patients, the *AHSP* gene expression was increased in intermedia patients compared to major patients and controls, however no difference regarding α -globin gene expression was demonstrated between the groups. Ratio data of the *AHSP*/ α -globin gene expression demonstrated that, when compared with the cell differentiation data, the groups probably presented differences due to the fact that β -thalassemia intermedia patients presented more erythroblasts than the other groups, suggesting that *AHSP* may not be related to the clinical evolution of β -thalassemia.

The polymorphisms analyses showed some one that could be relationship with β -thalassemia and a mutation that could be changing the *AHSP* structure and may contributing to a worse clinic evolution in patients heterozygous to β -thalassemia.

Based on these data we suggest that the *AHSP* gene plays an important role during normal erythroid differentiation, described some polymorphisms that could be relation *AHSP* gene with β -thalassemia, described the first mutation on *AHSP* gene that could show a possible relation of the *AHSP* with the clinic evolution in β -thalassemia, but a real importance of the *AHSP* gene in β -thalassemia pathophysiology is not clearly.



INTRODUÇÃO

O termo hemoglobina foi descrito pela primeira vez em 1674 como sendo um pigmento em eritrócitos que apresenta a propriedade de se ligar à molécula de oxigênio. A molécula de hemoglobina é constituída de 4 subunidades, cada uma contendo um grupo heme, um derivado porfirínico contendo radical Fe^{+2} , ligado a uma cadeia globínica (Steinberg, 2001).

Nos pulmões onde a pressão de oxigênio (pO_2) é alta, cada molécula de hemoglobina se combina com 4 moléculas de O_2 , sendo uma molécula O_2 para cada grupo heme, formando a oxihemoglobina. Esta combinação é reversível e o O_2 transportado é transferido para os tecidos onde a pO_2 é baixa. A combinação da hemoglobina com CO_2 normalmente produzidos nos tecidos também é reversível e constitui a carboxihemoglobina. Este evento de ligação com O_2 e/ou com CO_2 ocorre em células específicas denominadas hemácias, eritrócitos ou glóbulos vermelhos (Hoffman, 1991).

Os genes das globinas localizam-se em 2 agrupamentos ('cluster'): agrupamento α com aproximadamente 30kb de DNA localizados no cromossomo 16, e agrupamento β com aproximadamente 50Kb de DNA localizados no cromossomo 11. A disposição gênica nestes agrupamentos apresenta grande importância na transcrição gênica, como podem ser visualizados na figura 1:

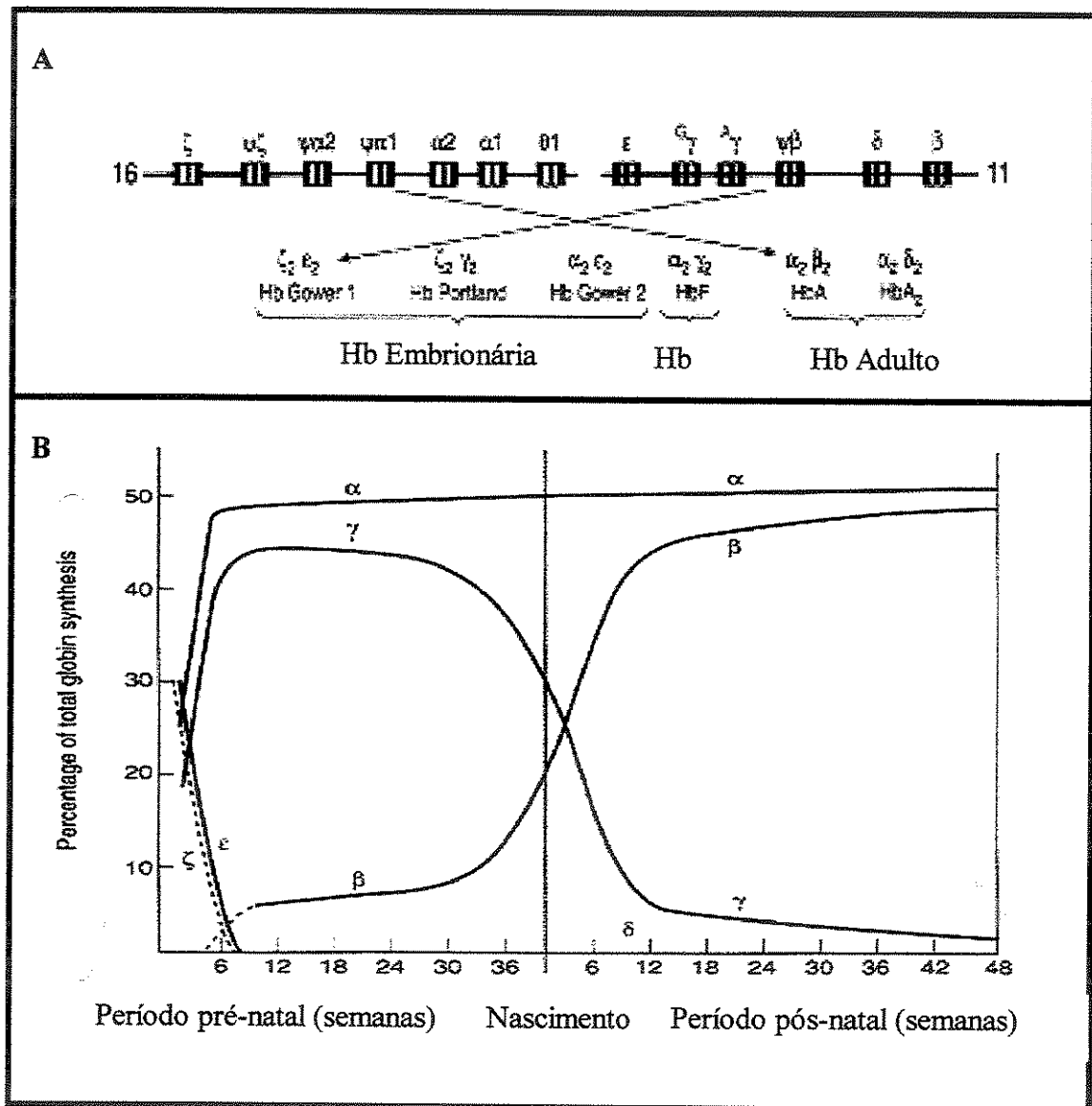


Figura 1 – Desenvolvimento ontogenético normal das cadeias globínicas– Na figura 1A podemos observar a composição e a disposição gênica dos cluster α e β . De acordo com a composição dos clusters temos a formação de vários tipos de hemoglobinas: as de predomínio embrionário, as presentes no período fetal e as que encontramos durante toda a vida adulta. O evento visualizado na figura B representa a troca sincronizada do predomínio do tipo de hemoglobina, fenômeno denominado “Switching” (Weathedrall, 2001).

Alterações hereditárias na molécula de hemoglobina causam doenças denominadas hemoglobinopatias, que são classificadas como alterações estruturais, onde ocorre a modificação das cadeias ao nível estrutural (como exemplo anemia falciforme) e, como alterações que levam à deficiência de síntese das cadeias globínicas, denominadas talassemias.

As talassemias compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias em que existe uma redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Esta anormalidade, de natureza complexa, ocasiona, em última análise, a supressão total ou parcial da produção de cadeias α nas α -talassemias e de cadeias β nas β -talassemias (Thein, 1998).

Daí advém hemoglobinizacão deficiente e, conseqüentemente, microcitose e hipocromia características dessas síndromes. Além disso, a síntese de cadeias não afetada permanece inalterada provocando acúmulo e formação de agregados instáveis das cadeias não pareadas. A precipitação desses agregados provoca numerosos efeitos deletérios sobre a hemácia ou seus precursores (Hoffman, 1991 e Steinberg, 2001). São essas lesões as responsáveis pela destruição prematura dos eritroblastos na medula óssea, caracterizando a eritropoese ineficaz comum a essas síndromes, e também pela reduzida sobrevida dos eritrócitos na circulação, determinante do quadro hemolítico (Bank, 1978 e Weatherall et al, 1972).

No caso de β -talassemias, modificações nas muitas das seqüências regulatórias que controlam o cluster β já foram descritas (Plonczynski et al, 1999). Entre elas estão pequenas e grandes seqüências repetitivas, como exemplo as seqüências *AluI*, altamente repetitivas, que podem apresentar uma considerável contribuição na geração de varias deleções no complexo β -globina, o que leva ao aparecimento da β -talassemia.

O gene da β -globina apresenta três elementos *cis*-ativadores, seqüências encontradas “*upstream*” ao sítio de início de transcrição que controlam este evento: TATA box, um motivo CCAAT box e um motivo duplicado CACCC, que é predominante em promotores específicos de eritrócitos. Estes motivos são reconhecidos por fatores de transcrição. A ligação do fator EKLF (erythroid Kruppel-like factor) ao motivo CACCC

parece ser crucial à expressão normal do gene em adultos. Em adição a estes motivos, a região “*upstream*” ao promotor contém dois motivos para o fator de transcrição GATA-1 (Orkin, 1992) que funcionalmente regula também a biossíntese de heme e proteínas de membrana de eritrócitos (Shirihai et al, 2000).

A importância de várias seqüências flanqueadoras 5’ para a expressão normal do gene é indiscutível pelo surgimento da β -talassemia a partir de mutações pontuais nestas seqüências, especificamente sobre os motivos TATA box e CACCC box (Antoniou et al, 1988). Seqüências 5’-UTR, que ocupam regiões entre a cauda cap do β mRNA e o códon de inicialização (ATG) e seqüências 3’-UTR, que se encontram entre o códon de terminalização e a cauda poli-A, são também importantes na regulação da expressão do gene da β -globina e se encontram modificados em certos tipos de β -talassemia (Öner, 2001).

À montante do complexo β está o LCR (*locus control region*). Esta região tem uma grande importância na expressão do gene: ela mantém “aberto” o domínio cromatínico e age como um *enhancer* (seqüências que fazem contato com promotores através de dobramentos ou formação de alças de fibra cromatínica), quando os níveis de expressão estão baixos (Grosveld et al, 1987).

O desenvolvimento específico da expressão individual dos genes da globina é governado pela interação física direta entre promotores de globina e a região LCR, interação esta mediada pela ligação de fatores de transcrição. Este desenvolvimento preciso da expressão apresenta dois mecanismos: silenciamento de genes e competição gênica.

Em média 200 alelos anormais relacionados com as β -talassemias têm sido caracterizados. Embora mutações possam surgir de defeitos envolvidos em qualquer uma das vias de interação entre seqüências regulatórias e LCR, a grande maioria de β -talassemias é causada por mutações de ponto no gene ou nas seqüências flanqueadoras (Thein, 1998).

Raramente grandes deleções estruturais podem acontecer e levar à β -talassemias, (como por exemplo podemos observar a remoção substancial da região 5' final do complexo), mas deixa o gene β intacto, resultando num fenótipo de β -talassemia. Estas deleções silenciam o gene da β -globina porque removem toda ou uma porção substancial dos elementos regulatórios no LCR (Kulozik et al, 1991); e deleções que envolvem somente o gene para β -globina onde pode acontecer a remoção dos promotores (Thein et al, 1984b e Varawalla et al, 1991).

Outras deleções, também extremamente raras, são de particular interesse funcional e fenotípico por serem associadas com uma anormal elevação nos níveis de HbA₂ (hemoglobina adulta) em heterozigotos. Estas deleções removem uma região no β -promotor que inclui os elementos CACCC, CCAAT e TATA, elevando os níveis de HbA₂ e ocorrendo variáveis aumentos de HbF (hemoglobina fetal) em heterozigotos, que parecem estar relacionados com a remoção da região 5' promotora do gene β .

Este evento remove a competição para o LCR "*upstream*", levando ao aumento da interação do LCR com os genes γ e δ em *cis*, aumentando sua expressão (Sargent e Lloyd, 2001). Dados experimentais indicam que o aumento desproporcional de HbA₂, deriva do gene δ para a deleção do gene β Codrington et al, 1990). Esta hipótese pode também explicar o tênue aumento dos níveis de HbF que acompanha este grupo de β -talassemia por deleção e β -talassemia por mutação única, afetando a região promotora do gene. Embora o aumento de HbF seja variável e tênue em heterozigotos, ele é adequado para compensar a completa ausência de β -globina em homozigotos.

As mutações que causam β -talassemias resultam na completa falta (β^0 -talassemias) ou na deficiência de β -globina (β^+ -talassemias). Enquanto algumas mutações levam à tênue redução na síntese de β -globina e são denominadas β^{++} -talassemias, em outras o déficit é tão pequeno que os heterozigotos são conhecidos como "silenciosos" (Hoffman, 1991). A tabela 1 mostra a frequência de mutações de maior predomínio no Sudeste Brasileiro.

Tabela 1 – Frequência de mutações no gene β -globina mais freqüentes na população do Sudeste brasileiro (Martins, 93)

Mutação	Descrição	Tipo	Distribuição
CD 39 (CAG – TAG)	Inserção de <i>Stop Códon</i>	β^0	69%
IVS1-1 (G – A)	Alteração de sítio de <i>splice junction</i>	β^0	6%
IVS1-6 (T – C)	Modificação de sítio consensu de <i>splice</i>	β^+	7%
IVS1-110 (G – A)	Criação de sítio críptico de <i>splice</i>	β^+	20%

O estado homozigótico da maioria das variantes genéticas de β -talassemias produz o quadro clínico da β -talassemias maior ou Anemia de Cooley. Esses pacientes apresentam acentuada anemia a partir do quarto mês de vida e necessitam transfusões sanguíneas regulares para sobreviverem. Esse processo terapêutico conduz ao acúmulo de ferro no organismo e às suas conseqüências sobre glândulas endócrinas, fígado e coração. As complicações cardíacas secundárias a hemocromatose na segunda década da vida, representam a causa mais comum de morte nessa doença (Steinberg, 2001).

Os heterozigotos para β -talassemias apresentam, com raras exceções, apenas discreta anemia e não condicionam manifestações clínicas relevantes. No entanto, as alterações laboratoriais são significativas, caracterizando-se por microcitose, hipocromia e elevação dos níveis de HbA₂ e algumas vezes de HbF (Bank, 1978, Weatherall et al, 1972). Existe, no entanto, um contingente de talassêmicos heterozigotos sem qualquer anormalidade laboratorial detectável pelos métodos habituais (Weatherall et al, 1980).

Entre estes limites extremos existem algumas formas de combinações genéticas condizentes a quadros clínicos não tão graves quanto a forma homozigótica clássica, às quais se aplica com freqüência a denominação de “ β -talassemias intermediária” (Cicidalli et al, 1980 e Gallo et al, 1979). A tabela 1 exemplifica os tipos de talassemias e suas características clínicas:

Tabela 2 – Quadro com os possíveis tipos de talassemias, suas representações alélicas, tipos de hemoglobinas presentes e características clínicas relacionadas (Oliveira, 1983).

Tipo de talassemias	Tipo de Hemoglobina	Característica Clínica
β -talassemia menor $\beta^A\beta^+$, $\beta^A\beta^0$	Principalmente HbA; Níveis aumentados de HbA ₂ ; Raramente níveis aumentados de HbF.	Citomorfologia anormal Anemia discreta
β -talassemia maior $\beta^0\beta^0$ $\beta^0\beta^+$ $\beta^+\beta^+$	Principalmente HbA ₂ e HbF (quando $\beta^0\beta^0$) Principalmente HbA ₂ e HbF com níveis variáveis de HbA (quando $\beta^0\beta^+$) Principalmente HbA com níveis variáveis de HbA ₂ e HbF (quando $\beta^+\beta^+$)	Citomorfologia anormal Anemia intensa Transfusões freqüentes
β -talassemia intermediária $\beta^0\beta^0$ $\beta^0\beta^+$ $\beta^+\beta^+$ $\beta^0\beta^A$, $\beta^+\beta^A$ (raros)	Principalmente HbA ₂ e HbF (quando $\beta^0\beta^0$) Principalmente HbA ₂ e HbF com níveis variáveis de HbA (quando $\beta^0\beta^+$) Principalmente HbA com níveis variáveis de HbA ₂ e HbF (quando $\beta^+\beta^+$, $\beta^0\beta^A$ e $\beta^+\beta^A$)	Citomorfologia anormal Anemia moderada Não depende de transfusões

Vários agentes farmacológicos que alteram a expressão de HbF têm sido testados em animais e em pacientes com anemia falciforme e β -talassemias. Dentre os mais conhecidos está a Hidroxiuréia (HU), agente utilizado na terapêutica de doenças mieloproliferativas e que nos últimos anos vem sendo administrada a pacientes visando induzir a síntese de HbF e conseqüentemente amenizar os sintomas que caracterizam a doença (Saleh et al, 1998). O mecanismo que leva ao aumento da síntese de HbF ainda não está bem elucidado.

Entretanto, a síntese normal de α -globinas em pacientes com β -talassemias resulta em desequilíbrio na síntese de cadeias globínicas. As de α -globinas livres são extremamente instáveis e precipitam formando corpos de inclusão. Estas inclusões de cadeias α são responsáveis pela destruição intramedular de precursores de eritrócitos e na eritropoese ineficaz, que caracterizam as β -talassemias (Wickramasinghe e Hughes, 1980).

Os produtos da degradação das cadeias α em excesso, que são globina, heme, hemin (forma oxidada do heme) e ferro livre, provavelmente são responsáveis por grande parte dos danos à membrana de eritrócitos nestas síndromes. Células vermelhas de indivíduos portadores de β -talassemias apresentam redução em sua vida-média, que reflete as múltiplas lesões causadas pelo excesso de cadeias α (figura 2).

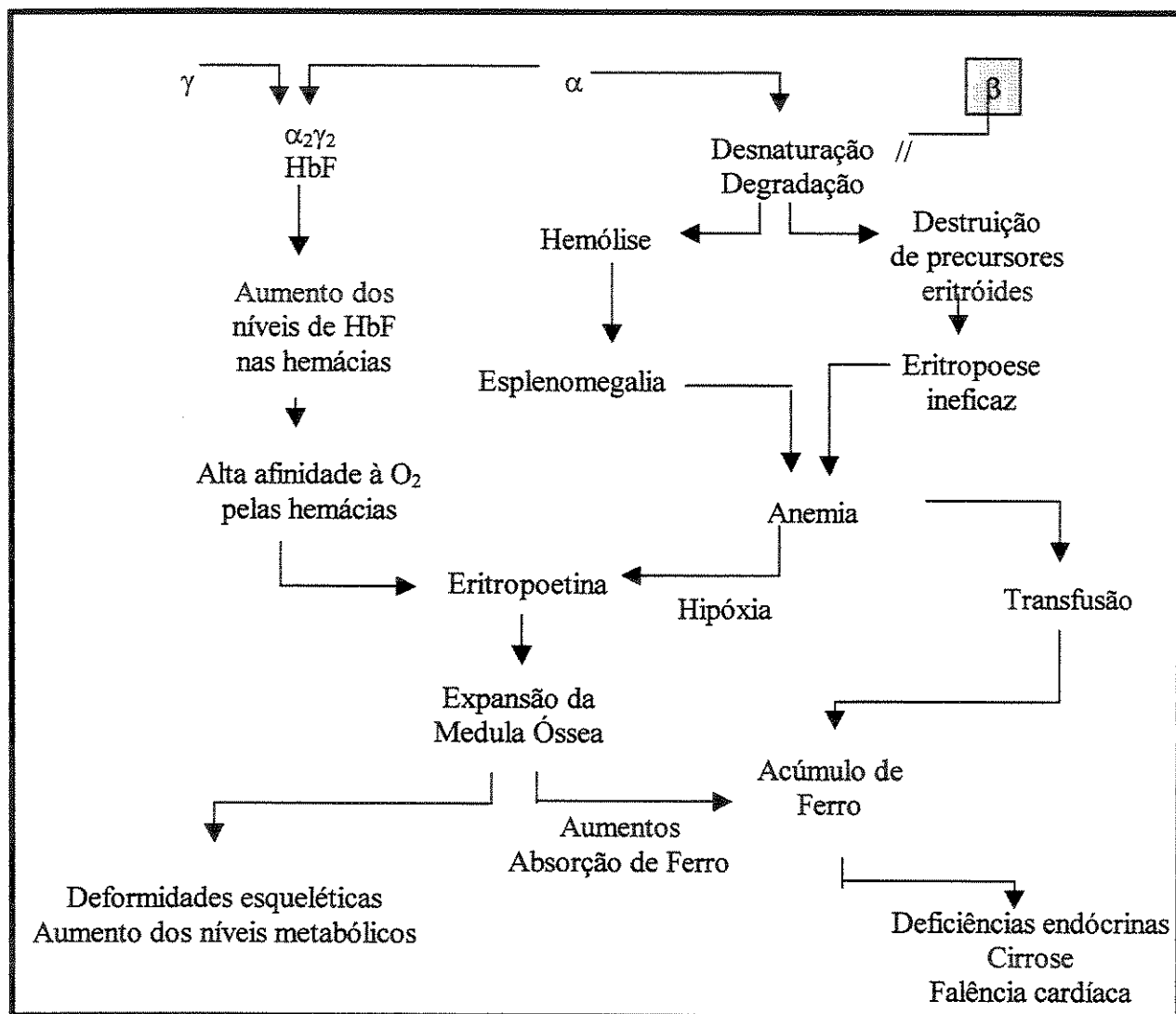


Figura 2- Esquema sobre a fisiopatologia de β-talassemias –As cadeias α-globinas livres precipitam no organismo danificando a parede de precursores eritróides levando à eritropoese ineficaz e diminuição da vida média da hemácia (parte direita da figura). Este evento leva à produção de progenitores celulares, que ocasiona expansão da medula óssea. Em casos de anemia muito grave necessita-se de transfusão, situação na qual aumentam os níveis de ferro no organismo e conseqüentemente sua absorção, levando à clínicas relacionadas com as β-talassemias que são geralmente a causa de óbitos dos pacientes. Em casos onde se observa aumento da produção de hemoglobina fetal (lado esquerdo da figura), o paciente apresenta um quadro clínico melhor (Weatherral et al, 2001).

Miele, Manson e Clinton (2001), descreveram um gene localizado no cromossomo 16, de aproximadamente 2kb, que origina um RNA mensageiro de aproximadamente 500pb e codifica para uma proteína de 102 aminoácidos com expressão relacionada à atividade hematopoiética (maturação de eritrócitos), embora sua função precisa ainda não seja conhecida. O gene foi denominado *EDRF* (erythroid differentiation-related factor), pois foi isolado de eritroblastos de rato e medula óssea humana (Kong et al, 2001).

Kihm et al (2001), investigando genes controlados pelo fator de transcrição GATA-1, concluíram que o gene *EDRF*, renomeado como *AHSP* (*Alpha-Haemoglobin Stabilizing Protein*), forma um complexo estável quando ligado à α -globinas, bloqueando drasticamente a oxidação e precipitação de cadeias α -globina livres, funcionando como uma “*chaperone*” molecular para α -globina, promovendo um mecanismo compensatório através do qual precursores de eritrócitos aliviam os efeitos deletérios da precipitação de α -globinas durante a eritropoese normal (figura 3).

Estudos posteriores confirmaram a especificidade de *AHSP* em ligar-se somente com α -globinas e não com β -globinas (Gell et al, 2002). A partir destes dados é possível prever uma possível função importante do gene *AHSP* na fisiopatologia de β -talassemia.

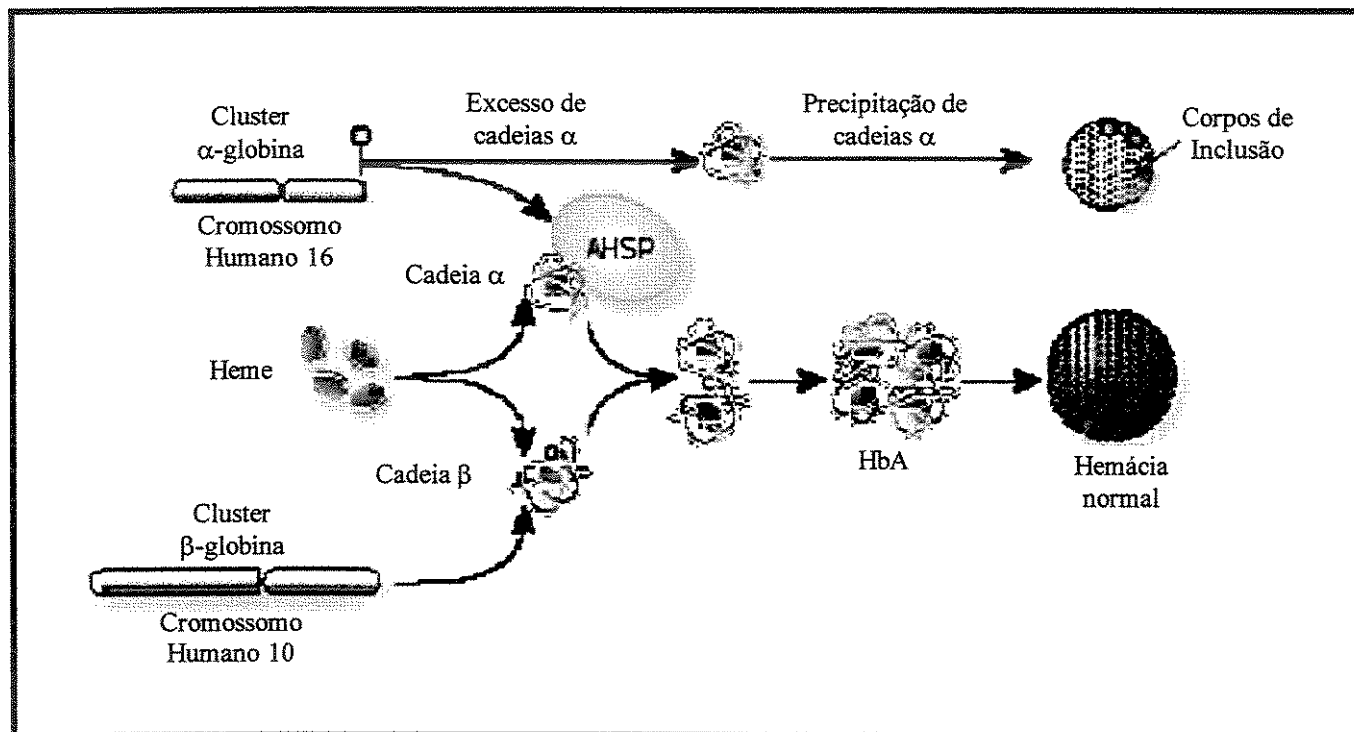


Figura 3 – Esquema de função de AHSP – Nesta figura Kihm, et al, (2001) ilustraram um possível mecanismo de ação pela proteína AHSP. Na figura propõe-se que a proteína seja requerida para estabilizar α -globinas e direcionando-a na sua ligação com β -globinas para a formação de hemoglobina. Em situações de excesso de cadeias α -globinas, a proteína poderia diminuir os efeitos deletérios destas cadeias livres, evitando sua precipitação no organismo.

A hipótese seria que a proteína *AHSP* poderia atuar como um modulador de gravidade em β -talassemia. Para a confirmação desta hipótese neste trabalho foram realizados estudos de expressão gênica, com quantificação dos níveis de expressão do gene *AHSP* durante a diferenciação normal e em pacientes com β -talassemia intermediária e maior e em indivíduos controles.

Nossos dados indicaram que *AHSP* está intimamente ligado com a diferenciação eritróide, tendo sua expressão aumentada em estágios celulares com alto metabolismo de hemoglobina. Quanto aos dados observados em pacientes com β -talassemias, nossos dados indicam maiores níveis de expressão em pacientes com clínica intermediária quando comparados com pacientes com clínica maior, mas não alto suficiente para propor, por enquanto, uma função moduladora da proteína *AHSP* na fisiopatologia das β -talassemias.

Análises de DNA realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho mostraram polimorfismos que estão relacionados com o grupo de pacientes com β -talassemia estudados e, a primeira mutação descrita no gene *AHSP* que leva a modificação de aminoácido e provavelmente à alteração da estrutura protéica. Esta mutação foi detectada num paciente heterozigoto para β -talassemia mas com uma evolução clínica intermediária. Este é o primeiro indício concreto que correlaciona diretamente o gene *AHSP* como possível modulador de gravidade em β -talassemia.

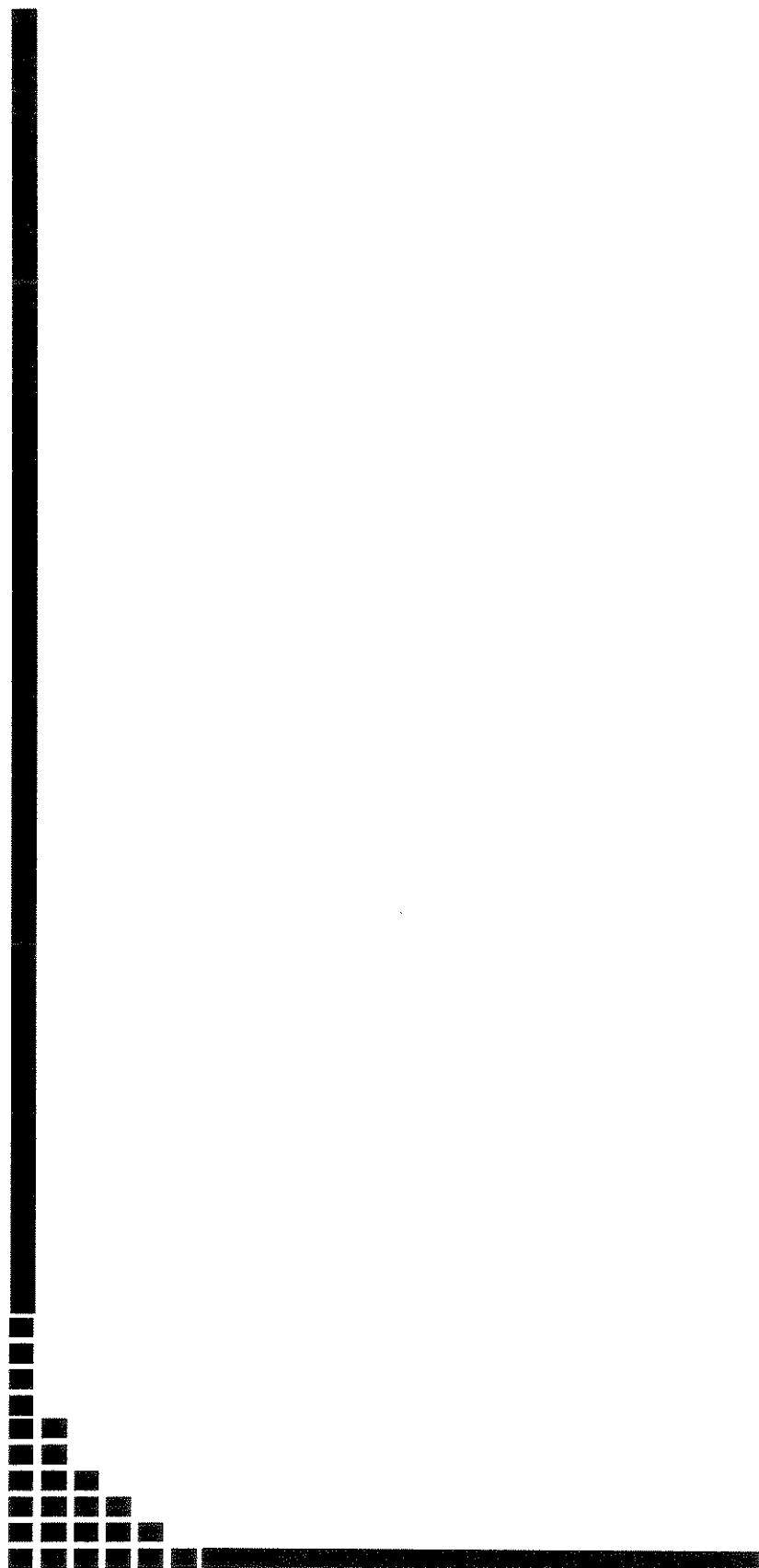
À partir de todos estes dados, abrimos perspectivas de estudos com outros genes utilizando a metodologia descrita, propomos, como fizeram outros autores também, uma compreensão melhor de como as cadeias globínicas podem se ligar para a formação de hemoglobina, e sugerimos um estudo mais profundo sobre a relação da proteína com as β -talassemias.



OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram :

1. Quantificar pelo método de PCR quantitativo em tempo real a expressão do gene *AHSP* na diferenciação de células eritróides humanas normais através do método de cultura e eritroblastos de duas fases;
2. Quantificar pelo método de PCR quantitativo em tempo real a expressão do gene *AHSP* em pacientes portadores de β -talassemias homozigóticas forma maior e forma intermediária;
3. Analisar a existência de polimorfismos (SNPs) ou mutações no gene *AHSP*, que poderiam estar envolvidos numa possível redução ou ausência da expressão do gene, através da técnica de seqüenciamento automático de DNA.



***MATERIAIS E
MÉTODOS***

1- Casuística

Foram estudadas 36 amostras de pacientes com β -talassemia, forma maior e forma intermediária, atendidos no ambulatório do Hemocentro (UNICAMP). Os indivíduos controle compreenderam 07 amostras de pacientes com Esferocitose hereditária, 03 amostras de pacientes com Anemia falciforme, e 22 amostras de voluntários sadios sem alterações hematopoéticas ou na eletroforese de hemoglobina. Destas amostras foram analisadas 12 amostras pacientes com β -talassemias homozigóticas e 5 amostras de pacientes portadores de esferocitose hereditária nos estudos de expressão gênica.

Os casos de β -talassemia foram diagnosticados pelo serviço de rotina do hemocentro levando em consideração dados hematológicos, eletroforese de hemoglobina e presença de mutações no gene da β -globina detectados por seqüenciamento de DNA no paciente e nos familiares. A classificação de talassemia maior e intermediária foi feita segundo os procedimentos recomendados internacionalmente (Guidelines for the clinical management of thalassemia)

Foram coletados aproximadamente 15ml de sangue periférico em EDTA destes pacientes. O sangue foi submetido à separação de soro dos elementos figurados do sangue (células brancas e células vermelhas) por centrifugação em tubos falcon de 50 ml por 10 minutos à 3000RPM. O soro foi descartado e as hemácias foram lisadas durante 30 minutos sob agitação vigorosa em tampão 1,1M NH_4Cl / 0,01M NH_4HCO_3 (cloreto de amônio / bicarbonato de amônio). Após a lise das hemácias, o conteúdo foi submetido à centrifugação por 10 minutos à 3000RPM em temperatura de 4°C. O pellet de leucócitos foi separado para extração de DNA.

O sobrenadante contendo hemácias lisadas e reticulócitos foi recuperado e submetido a gradiente em $1/10$ Sacarose/KCl por centrifugação à 5000RPM por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação as hemácias precipitadas foram descartadas e o sobrenadante tratado com 0,7ml de ácido acético 10% gelado para precipitação dos reticulócitos em centrifugação à 5000RPM por 20 minutos à temperatura ambiente.

O pellet de reticulócitos foi ressuspenso em 1-2ml de Trizol (Invitrogen) para a extração de RNA para posteriormente ser transcrito em cDNA com a enzima Super Script II (Invitrogen).

2- Extração de DNA

O DNA das amostras de pacientes foi extraído como o reagente Trizol (Invitrogen), uma solução monofásica de fenol e guanidina isocianato. Ao botão de leucócitos foram acrescentados de 1 à 3ml de Trizol, quantidade essa que variou de acordo com a homogeneidade da solução. Durante a homogeneização.

A solução de Trizol foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Acrescentou-se às amostras homogeneizadas 200µl de clorofórmio (CHCl₃) que foram em seguida agitadas vigorosamente. Nova incubação foi realizada por mais 5 minutos à temperatura ambiente e, então, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 minutos à 13500RPM, em temperatura de 4°C. A fase orgânica foi descartada e procedeu-se a precipitação do DNA por adição de 300µl de Ethanol absoluto, incubação à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação à 4400PMR por 5 minutos, em temperatura de 4°C. Após a precipitação, o “pellet de DNA” foi lavado duas vezes com solução de 0.1M de Citrato de Sódio, dissolvido em Ethanol 10%, e, novamente centrifugado à 4400RPM por 5 minutos, em temperatura de 4°C.

As amostras de DNA foram ressuspensas em aproximadamente 300µl de NaOH 8mM e incubadas *overnight* à 4°C. As amostras foram estocadas em freezer -20°C.

3- Proliferação e maturação dos progenitores eritróides humanos em Cultura Líquida de Duas Fases

Para a realização deste trabalho, foram utilizados materiais provenientes de culturas de diferenciação eritróide em duas fases. A técnica consiste na separação de células mononucleares de sangue periférico obtidas a partir de “buffy coat” (Pope, et al, 2000 e Fibach et al, 1989) de doadores saudáveis e isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/ml-Sigma) à 1500 RPM por 30 minutos à temperatura ambiente. A camada de células da interface foi coletada em tubos de centrifuga estéril e lavada em meio de cultura “Iscove’s Modified Dulbecco’s Médium” (IMDM; Invitrogen)

por três vezes através de centrifugações a 1500 RPM por 10 minutos à temperatura ambiente. O botão celular foi ressuspense em meio de cultura IMDM (Invitrogen) e a verificação da quantidade e viabilidade das células foi realizada através de câmara de “Neubauer” com corante azul de trypan. As células foram cultivadas numa densidade de aproximadamente 1×10^6 cels/ml em meio de cultura IMDM (Invitrogen) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado e estéril (Invitrogen), 10% de meio condicionado coletado da linhagem de células de carcinoma de bexiga 5637 e 1 µg/ml de ciclosporina A (Sandfz). As culturas foram incubadas a 37°C, numa atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 7 dias .

Após esse período de cultura primária, as células não aderentes foram coletadas e lavadas em meio de cultura IMDM (Invitrogen) através de centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos à temperatura ambiente. A quantificação da população celular foi feita, por exclusão das células mortas, em câmara de “Neubauer” com azul de trypan. As células foram colocadas novamente em cultura, em placas de 6 “wells” numa densidade de 0.5×10^6 céls/ml, contendo meio IMDM (Invitrogen) fresco suplementado com 30% de soro bovino fetal (Invitrogen), 1% de soro albumina bovina deionizada (BSA-Sigma), 10^{-5} mol/L 2-mercaptoetanol (Sigma), 1,5 nmol/L de glutamina (Gibco), 10^{-6} mol/L de dexametasona (Sigma), 300µg/ml de transferrina saturada com ferro (Sigma), 1 U/ml de eritropoetina recombinante (Cilag), 5ng/ml de “Steam Cell Factor” (SCF_Calbiochem), 2,5µg/ml de fungizone (Invitrogen), 50µg/ml de estreptomicina (Invitrogen) e 25 µg/ml de gentamicina (Invitrogen). As culturas foram incubadas à 37°C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ e 5% de O₂.

Todos os dias a viabilidade das células foi verificada por exclusão das mortas, após coloração com azul de trypan e, a verificação da morfologia foi feita através de preparações de “citospin” coradas com “Leischman”. Amostras de células também foram coletadas diariamente para extração de RNA total. Após 4 dias de incubação na fase II, para a remoção dos linfócitos, as células foram colhidas e centrifugadas a 1500 RPM por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi reservado. O botão células foi ressuspense em 1 ml do sobrenadante, colocado em 2ml de Percoll (Sigma- densidade 1.0585g/ml) e centrifugado a 2000 RPM por 20 minutos à temperatura ambiente. A camada

superior contendo os pró-eritroblastos foi coletada e ressuspendida no sobrenadante recuperado e prosseguiu-se à incubação por aproximadamente mais 7 dias.

Coletas diárias de células foram realizadas para verificação da morfologia e viabilidade celular, extração de RNA total e análise da diferenciação celular por citometria de fluxo, técnica que consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, com um anticorpo marcado com um fluocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceínas isotiacianato (FITC). Este fluocromo ao ser estimulado por um feixe de laser emite um fóton que é capturado por sensores no citômetro, fazendo análises tanto qualitativas como quantitativas (Owens et al, 1995).

Para a análise da diferenciação celular foi utilizado o método para marcação de superfície celular utilizando anticorpo anti-glicoforina A conjugado com PE e anticorpo anti-receptor de transferrina conjugado com FITC.

O RNA total das células em cultura foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) e transcrito em cDNA com a enzima Super Script II (Invitrogen)

4- Extração de RNA

O RNA total das amostras de pacientes e das amostras de cultura de duas fases foi extraído como o reagente Trizol (Invitrogen), uma solução monofásica de fenol e guanidina isocianato. Ao botão de células foram acrescentados de 1 à 3ml de Trizol, quantidade essa que variou de acordo com a homogeneidade da solução. Durante a homogeneização, o reagente Trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares.

A solução de Trizol foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Acrescentou-se às amostras homogeneizadas 200µl de clorofórmio (CHCl₃) que foram em seguida agitadas vigorosamente. Nova incubação foi realizada por mais 5 minutos à temperatura ambiente e, então, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 minutos à 13500RPM, em

temperatura de 4°C. A fase orgânica, onde fica o RNA, foi recuperada, transferida para um novo tubo e procedeu-se a precipitação do RNA por adição de 500µl de Isopropanol gelado, incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação à 13500PMR por 10 minutos, em temperatura de 4°C. Após a precipitação, o “pellet de RNA” foi lavado com Ethanol 70% para remoção do excesso de sal e, novamente centrifugado, agora à 11500RPM por 5 minutos, em temperatura de 4°C.

As amostras de RNA total foram ressuspensas em água com dietilpirocarbonato (DEPC) e incubadas por 10 minutos à 55°C e 2 horas em gelo, para completa solubilização do RNA. Foram realizadas quantificações através de leitura da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm e, a integridade da amostra foi analisada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante 1.2%. Após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas em freezer -80°C.

5- Síntese de cDNA

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada a partir de aproximadamente 5µg de RNA total de pacientes e ou cultura de duas fases por meio da enzima SuperScript II (Invitrogen).

As amostras de RNA total foram tratadas com *DNase I* por 15 minutos em temperatura ambiente, para a remoção de qualquer DNA contaminante. A reação foi interrompida com a adição de EDTA, composto quelante de Mg^{++} - co-fator necessário para a atividade da *DNase*-, e por aquecimento à 65°C por 5 minutos.

Da adição de dNTPs, necessários para a formação da fita a ser sintetizada e do oligodT, que se ligará à região poli-A do RNA mensageiro servindo de ancorador para que a Transcriptase Reversa possa fazer a síntese da cadeia de cDNA, a reação foi incubada por 50 minutos à 42°C, temperatura ótima para a atividade da enzima e, depois, por 15 minutos à 70°C, para inativação da mesma.

Após a reação de transcrição reversa as amostras de cDNA foram utilizadas como molde em reação de PCR para amplificação de uma porção do gene de β -actina (aproximadamente 600pb) e assim confirmação da realização da síntese.

6- PCR quantitativo em tempo real – “Real-time PCR”

A técnica de real-time é baseada no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação de cadeia em polimerase (PCR) (Higuchi, 1993), pela ligação de uma sonda específica (Taqman, Molecular Beacon, etc) ou um corante (SYBRGreen), na fita recém sintetizada (Bustin, 2000).

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando o reagente “SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems)”, que além de conter todos os reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (dNTPs, MgCl, Tampão, Taq Ampli-Gold) contém também o corante SYBRGreen, componente intercalante de DNA dupla-fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo pelo equipamento acima citado.

A quantificação da expressão utilizada foi a denominada “análise relativa dos dados”, onde a expressão do gene *AHSP* foi quantificada em relação à uma situação onde não existe a expressão do gene, utilizando-se o tempo zero de cultura nas análises durante a diferenciação celular e utilizando-se cDNA de cérebro como tecido referência.

Todos os dados obtidos foram normalizados a partir da expressão de um gene de controle endógeno, a β -actina.

A análise relativa dos dados é expressa pela derivação da fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta CT}$ (a descrição da análise se dará mais adiante), de onde obtemos os níveis de expressão gênica das amostras sempre em relação à amostra calibradora, como descreve o manual do equipamento.

Para a realização desta técnica foram desenhado primers específicos para o gene *AHSP*, alvo do nosso estudo, e também primers específicos para o gene α -globina. Os primers foram desenhados com o uso do software “Primer Express” (Applied Biosystems). Seguem abaixo as seqüências dos primers (tabela 3):

Tabela 3 – Seqüências de primers utilizados na amplificação de genes na técnica de PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Seqüência Primer
α -globina-RT- F	5'-TGGTCCCCACAGACTCAGAGA -3'
α -globina-RT- R	5'-CGGCCTTGA CGTTGGTCTTT -3'
β -actina-RT- F	5'- TCACCGAGCGCGGCT -3'
β -actina-RT- R	5'- TAATGTCACGCACGATTTCCT -3'
AHSP-RT-F	5'- TGATCCTCTCGTCTCTGAAGAAGAC - 3'
AHSP-RT-R	5'- GCTGCCTGTAATAGTTGATGTAGAAGTT -3'

Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutiva é necessário são necessárias condições ótimas de reação, ou seja, que as amplificações apresentem 100% de eficiência de amplificação a cada ciclo, ocorrendo duplicação do DNA. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10^{(-1/\text{slope})}$, onde *slope* significa o valor da inclinação da curva. (Pfaffli, 2001 e Meijerink et al, 2001) (figura 4). Para que essa eficiência seja próxima entre as amostras é importante que os produtos gerados por cada par de primers também tenham um tamanho aproximado .

As otimizações aconteceram testando as amplificações obtidas de várias concentrações de primers em uma diluição seriada de cDNA de cultura eritróide de predomínio celular ortocromático. Foram feitas cinco diluições: 500ng (5×10^2), 200ng (2×10^2), 50ng (5×10^1), 20ng (2×10^1), 5ng (5×10^0) e 2ng (2×10^0). As concentrações de primers otimizadas e os tamanhos dos produtos de PCR seguem abaixo (tabela 4) :

Tabela 4 – Concentrações de primers utilizadas na amplificação de genes na técnica de PCR quantitativo em tempo real. As concentrações foram determinadas pela eficiência de amplificação gerada em condições testadas. Informados também estão o tamanho do produto de PCR gerado pela reação. Os valores marcados com * correspondem à quantidade de primer para amplificação do gene α -globina em amostras de pacientes e controles

Primer / Gene	Concentração utilizada	Produto PCR	Eficiência
		gerado	Amplificação (%)
α -globina	1,2 μ M e 0,3 μ M*	70pb	94,5% e 92%*
β -actina	1,2 μ M	60pb	100%
AHSP	1,7 μ M	79pb	96,5%

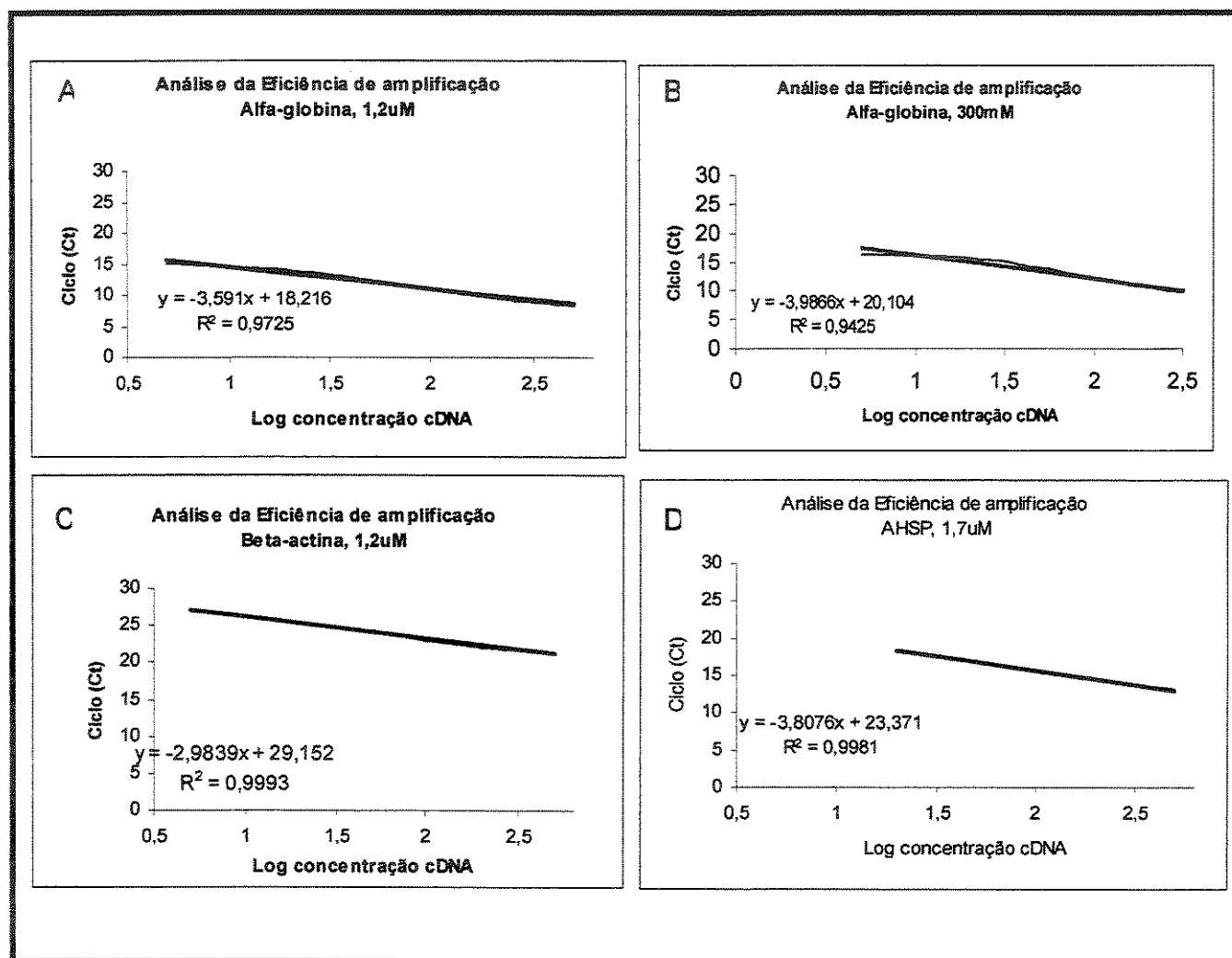


Gráfico 1 – Análise da eficiência de amplificação – Para analisar dados gerados pelo PCR quantitativo em tempo-real, as reações foram otimizadas para que tivessem 100% de eficiência de amplificação. De acordo com os dados demonstrados na tabela 4, a figura mostra os gráficos da análise de eficiência dos primers (A) α -globina 1,2 μ M ; (B) α -globina 300mM (C) AHSP 1,7 μ M e (D) β -actina 1,2 μ M. No eixo ‘x’ encontram-se o log das concentrações de cDNA utilizadas para fazer a curva de diluição e, no eixo ‘y’ encontram-se os ‘Cts’, ciclo onde foi detectada fluorescência.

Todas as amostras foram quantificadas sempre em duplicata em placas de 96 “wells” (Sorenson, BioScience Inc) com “caps” (SSI). As reações foram realizadas em um volume total de 25µl contendo 20ng de cDNA (reações para amplificação de materiais da cultura de duas fases) e 100ng (reações para amplificação de matérias de pacientes), 12,5µl de SYBRGreen Master Mix PCR (Applied Biosystems). As concentrações de primers utilizados e os tamanhos do produto amplificado já foram descritos na tabela 5.

Os dados são coletados na forma de emissão de fluorescência durante os ciclos da reação e analisados de forma curva. A determinação dos valores para quantificação da expressão acontece com a determinação do “Threshold”. O ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação é denominado “Cycle threshold”, ou “Ct” (figura 5).

Estes dados em forma de “Ct” foram exportados para uma planilha de Excel. Foram extraídas as médias destes dados, uma vez que as amostras eram feitas sempre em duplicatas, e as normalizações dos dados com o controle de expressão endógena, primeira passo da derivação aritmética denominado ΔCt (Ct da amostra com gene alvo menos Ct da amostra com gene de controle endógeno).

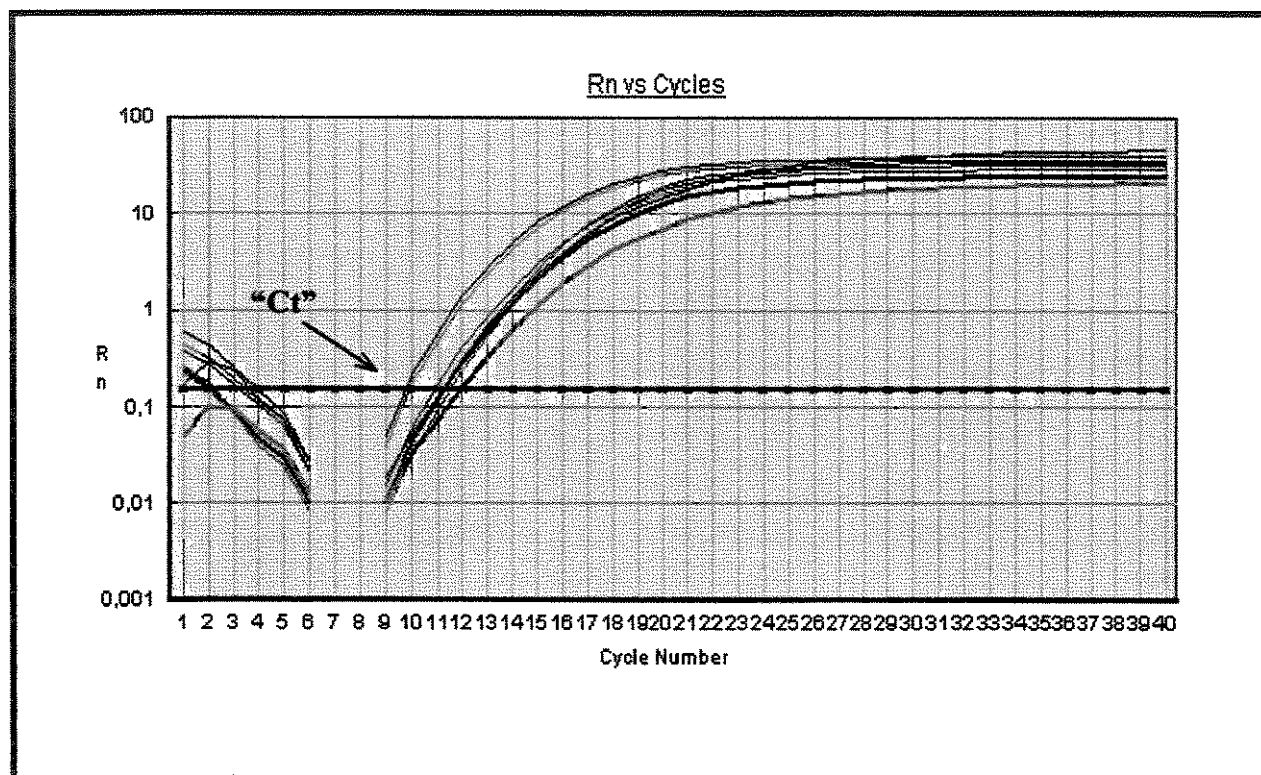


Figura 4 – Curva de amplificação de PCR quantitativo em tempo real – A análise da morfologia das curvas é um forte indicativo de que a reação ocorreu sem problemas. A curva deve ter uma morfologia sigmóide, mostrando as fases lag ou inicial, log ou exponencial e fase de platô, onde não ocorrem mais amplificações. Após esta análise é traçado o “threshold” e a partir dele coletados os dados em forma de “Ct”, ciclos onde a fluorescência “X” na fase exponencial do PCR será convertida em dados de expressão gênica.

Após a normalização dos dados foi realizada a calibração dos mesmos, utilizando situações onde a expressão do gene alvo é inexistente, levando ao segundo passo da derivação aritmética denominado $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt da amostra à ser quantificada menos ΔCt da amostra calibradora – tempo 0 (zero) de adição de eritropoetina na cultura de duas fases e cDNA de cérebro na análise dos pacientes).

Agora, os dados que foram normalizados e calibrados serão convertidos em níveis de expressão pela fórmula $2^{\Delta\Delta C_t}$, onde estima-se que a situação calibradora tem valor “1” (um) de expressão.

Para certificação de que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por amplificação inespecífica dos primers, foi feita a análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento. Esta curva baseia-se no “Tm” (Melting Temperature) específica de cada produto, que é determinada pela sua composição de nucleotídeos. A cada variação da temperatura, que acontece entre 60°C à 95°C logo após o término do PCR, são coletados dados de fluorescência. A curva de dissociação ocorre quando em determinada temperatura o produto de PCR separa suas fitas e ocorre queda de fluorescência gerada pelo SYBRGreen, já que este intercala ^{entre as bases} somente dupla fita (figura 6). Seguem abaixo as temperaturas de dissociação de cada primer (tabela 5)

Todos estes passos foram seguidos levando em consideração as recomendações contidas no ‘User Bulletin’ da Applied Biosystems.

Tabela 5 – Temperatura de Dissociação dos produtos de PCR gerados pelos genes estudados.

Primer – Produto PCR gerado	Temperatura de Dissociação
α -globina	84°C
β -actina	83°C
AHSP	77°C

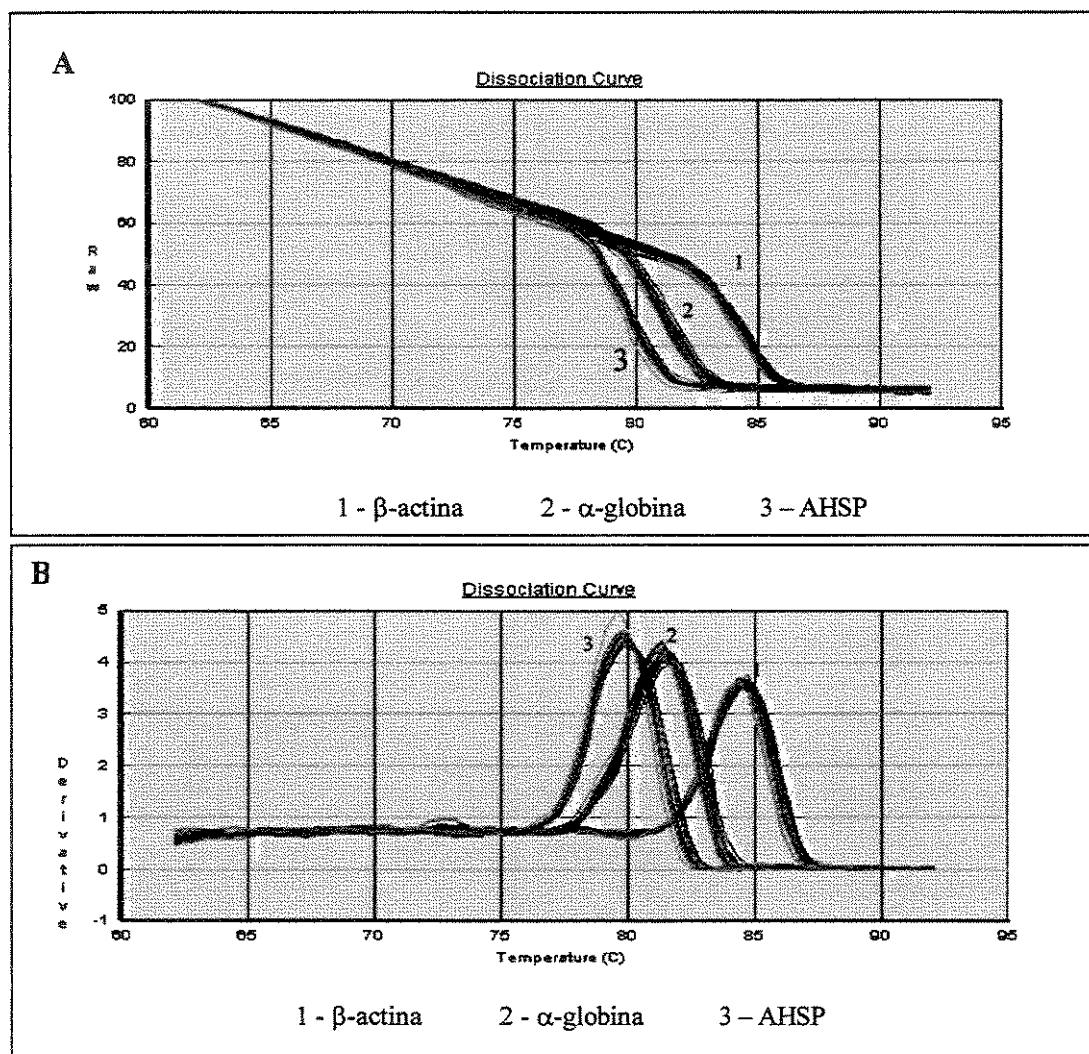


Figura 5 – Curva de Dissociação – A curva de dissociação é utilizada para analisar a ausência de contaminantes ou geração de produtos inespecíficos. De acordo com a tabela 5, podemos conferir que cada gene analisado tem um amplicon gerado, e este, uma temperatura de dissociação específica. A dissociação do produto da PCR leva ao desligamento da ligação SYBRGreen-DNA, levando à perda de fluorescência que, na figura acima é demonstrada com um pico. (A) Representação da curva de dissociação com queda da emissão de fluorescência e (B) uma outra representação utilizando a derivativa negativa.

7- Seqüenciamento de DNA

Na busca de mutações ou polimorfismos no gene *AHSP* que pudessem estar relacionadas com a gravidade da doença, foi realizado o seqüenciamento automático de DNA em equipamento 377 ABI (Applied Biosystems).

O gene foi amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando 4 pares de *primers* distintos, específicos para o gene. Os primers denominados F2 e R2 geram fragmentos de aproximadamente 428pb e, os *primers* denominados F3 e R1 geram fragmentos de aproximadamente 444pb. (tabela 6 e figura 6).

Tabela 6 – Descrição dos primers utilizados na amplificação da região promotora e estrutural do gene *AHSP*. A localização está de acordo com a seqüência de nucleotídeos do cromossomo 16.

Primer	Seqüência	Localização	Produto PCR
F2	5'- ACAGAGAGATTCACGCACC – 3'	12182	
R2	5'- GTATCCCGTGTCTCTCG – 3'	12610	428
F3	5'- ACGAGAGACACGGGATAC – 3'	12610	
R1	5'- AGCACTGGTCTTTATTGAGG – 3'	13054	444

```

12181 cacagagaga ttcacgcacc ctcaagagtg tgggtgagac atatacagcc tgttagacct
12241 gaaggtgagc ccaacctggg aaaatcgtga cctcagagca gggcaggatg tgaaagggtt
12301 tggaaaggag atagccctgc agggcaggag ggatttttaa ggggaggaag tgggttgggg
12361 gaaataccca gtgaggaggg aaacagatat gtaaattcta cctttttctc taccaggcca
12421 gatggctctt cttaaggcca ataaggatct catttccgca ggattgaagg agttcagcgt
12481 tctgctgaat cagcaggatg gtccaagctt tccatttcaa aggactggcc tggagactgg
12541 ggggtgccgg ggaagtggag gaagaggata attggagctg gtgaagtaat ggtggagttg
12601 atggaaacaa cgagagacac gggatacaat gcagaggaaa gagaatgtga gagttgggtg
12661 tgtggcacta ttctagtatt cccgaatccc attgctgacc acatttccc ttgccaaactg
12721 cctctccgca acccccagg tcttcaatga tctctcgtc tctgaagaag acatggtgac
12781 tgtggtggag gactggatga acttctacat caactattac aggcagcagg tgacagggga
12841 gcccgaagag cgagacaagg ctctgcagga gcttcggcaa gagctgaaca ctctggccaa
12901 ccctttcctg gccaaagtaca gggacttcct gaagtctcat gagctcccga gtcacccacc
12961 gccctcctcc tagctcaggg acccagcccc tcctctctga gaaactctga ccttcatgtc
13021 cttaggctgt gctcctgcc ctctaccctg acacctcaat aaagaccagt gctggttttg
13081 ttgacttcc

```

Figura 6 – Sequência genômica *AHSP* – A figura está numerada para melhor ilustrar os introns (12246 - 12409 e 12493 - 12741) e os exons (12181 – 12245, 12410-12492 e 12740- 13090) do gene. As seqüências em negrito e sublinhadas referem-se às seqüências dos *primers* utilizados tanto na amplificação do gene por PCR quanto para a reação de seqüenciamento.

A confirmação da amplificação foi feita em gel 2% e a quantificação dos produtos de PCR foi feita com utilização do marcador “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen), e as amostras foram submetidas à reação de seqüenciamento com o kit BigDye Terminator (Applied Biosystems). Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados aproximadamente 30ng de amostra. Primeiramente as reações foram realizadas utilizando *primers* que reproduzissem a fita sense. Se alguma alteração fosse encontrada, então a confirmação desta ocorria com o seqüenciamento utilizando *primers* que reproduzissem a fita antisense na mesma região.

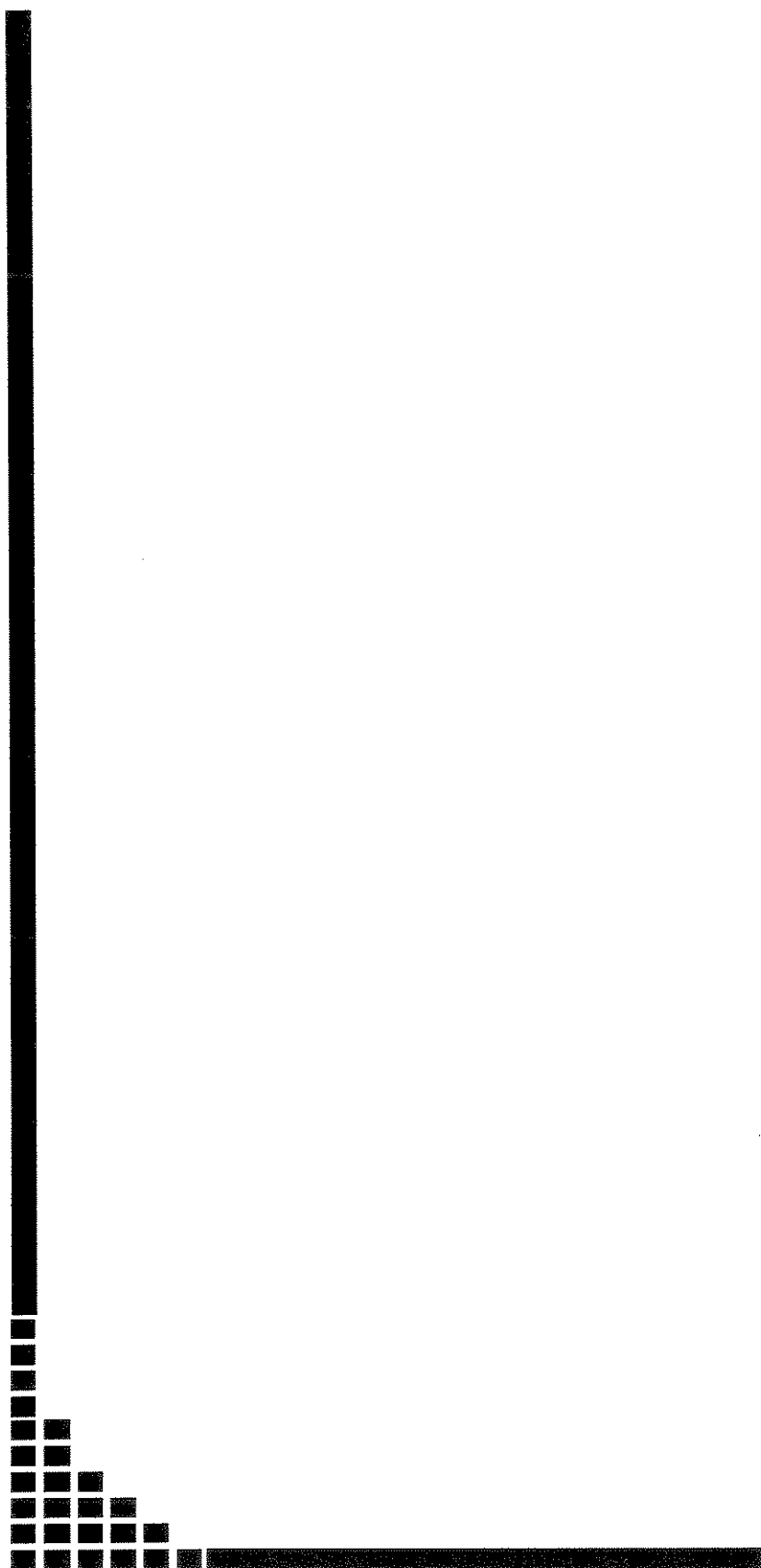
As amostras após o seqüenciamento foram analisadas de duas formas: análise da composição de nucleotídeos comparados com a seqüência depositada no GeneBank através da ferramenta de Blastn, e análise de composição de nucleotídeos pelo eletroferograma gerado pelo seqüenciador através do software Chromas V. 2.22.

Foram analisadas 36 amostras de pacientes com β -talassemia homozigótica e 32 amostras controles sendo 07 amostras de pacientes com Esferocitose hereditária, 03 amostras de pacientes com Anemia falciforme e 22 amostras de voluntários sadios e sem alterações hematopoiéticas ou na eletroforese de hemoglobina..

8- Análise Estatística

Para analisar a expressão gênica entre os diferentes grupos de pacientes e entre os diferentes tempos de diferenciação celular na cultura de duas fases optou-se pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney, uma vez que as variáveis do estudo rejeitaram a hipótese de normalidade. Os dados foram considerados significantes se o valor de p demonstrasse ser igual ou menor que 0,05. A análise estatística foi realizada em programa computacional GraphPad InStat Tm Software V2.02 Copyright (C) 1990-1993.

Para analisar a influência dos polimorfismos detectados, nos fenótipos de pacientes homozigotos para β -talassemias optou-se pelo teste de Fisher. Os dados foram considerados significantes se o valor de p demonstrasse ser igual ou menor que 0,05. A análise estatística foi realizada em programa computacional Epi Info 2000, versão 6.



RESULTADOS

1- Cultura eritróide em duas fases

O acompanhamento da diferenciação celular foi realizado por meio de duas estratégias: a análise da morfologia celular com microscopia óptica e análise da diferenciação celular por meio de citometria de fluxo marcando proteínas específicas de eritrócitos maduros.

As lâminas de células coletadas em vários estágios da segunda fase da cultura estão demonstradas na figura 7. Pró-eritroblastos começam a ser notados no 3º e 4º dias de diferenciação como células grandes e arredondadas que quando coradas com Leishman demonstram citoplasma corado em azul claro e um grande núcleo. À medida que este tipo celular prolifera forma aglomerados celulares. Durante a fase intermediária de diferenciação, aumenta-se gradualmente a proporção de eritroblastos basofílicos (entre 5º e 7º dias) e células do tipo policromatófilo e ortocromático (8º ao 10º dia). No final da segunda fase (entre 11º e 14º dias), os eritrócitos continuam a proliferar e maturar em células do tipo ortocromático.

A diferenciação na segunda fase da cultura foi quantitativamente determinada por citometria de fluxo usando anticorpo anti-receptor de transferrina conjugado com FITC e anticorpo anti-glicoforina A conjugado com PE (figura 8). Os dados demonstram que a diferenciação celular está ocorrendo durante a cultura de células, conclusão esta refletida pelo aumento da porcentagem de células positivas para transferrina e pelo aumento da porcentagem de células positivas para glicoforina-A. (0,03% e 0,11% no dia 0 –zero- da adição de eritropoetina, respectivamente, aumentando para 65,2% e 14,94% no 14º dia de cultura, respectivamente)

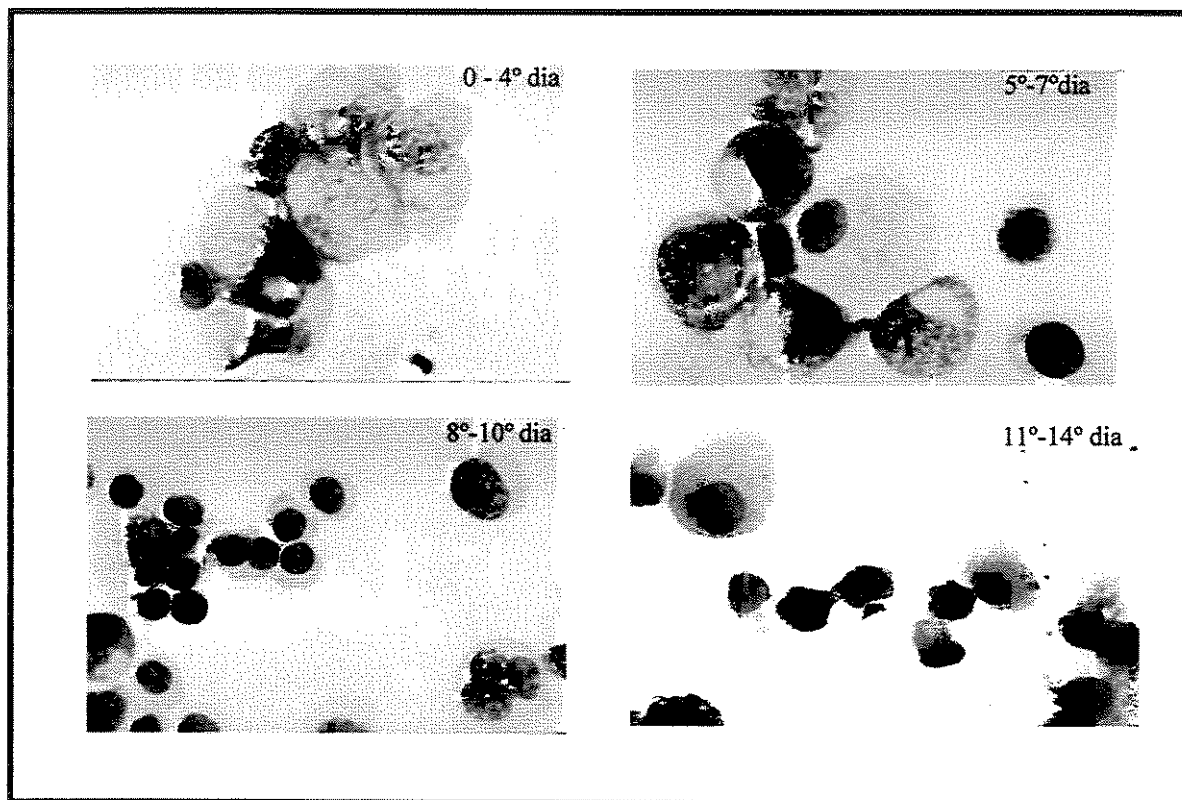


Figura 7 – Análise morfológica da diferenciação celular durante a cultura eritróide em duas fases – Células mononucleares foram isoladas de sangue periférico de doadores e colocadas em cultura primária por 7 dias em meio de cultura contendo soro bovino, ciclosporina A e fatores de crescimento. As células foram lavadas e colocadas em cultura secundária em meio de cultura contendo eritropoetina. Células coletadas durante a cultura secundária nos dias 0, 4, 5, 7, 8, 10, 11 e 13 (X1000) foram coradas com Leishman e analisadas em microscópio Eclipse E-600 (Nikon) utilizando o software Image pro-Express 4.0 (Media Cybernetics, LP) para determinar o estágio celular através da análise morfológica: fase inicial da cultura secundária (0 – 4º dia), predominância de pró-eritroblastos; fase intermediária da cultura secundária (5º - 7º dia), demonstrou a presença de eritroblastos basofílicos, e (8º - 10º dia), a presença de eritroblastos policromatófilos e eritroblastos ortocromáticos foi observada; na fase final da cultura secundária (11º - 14º dia), ocorre predominância de eritroblastos ortocromáticos.

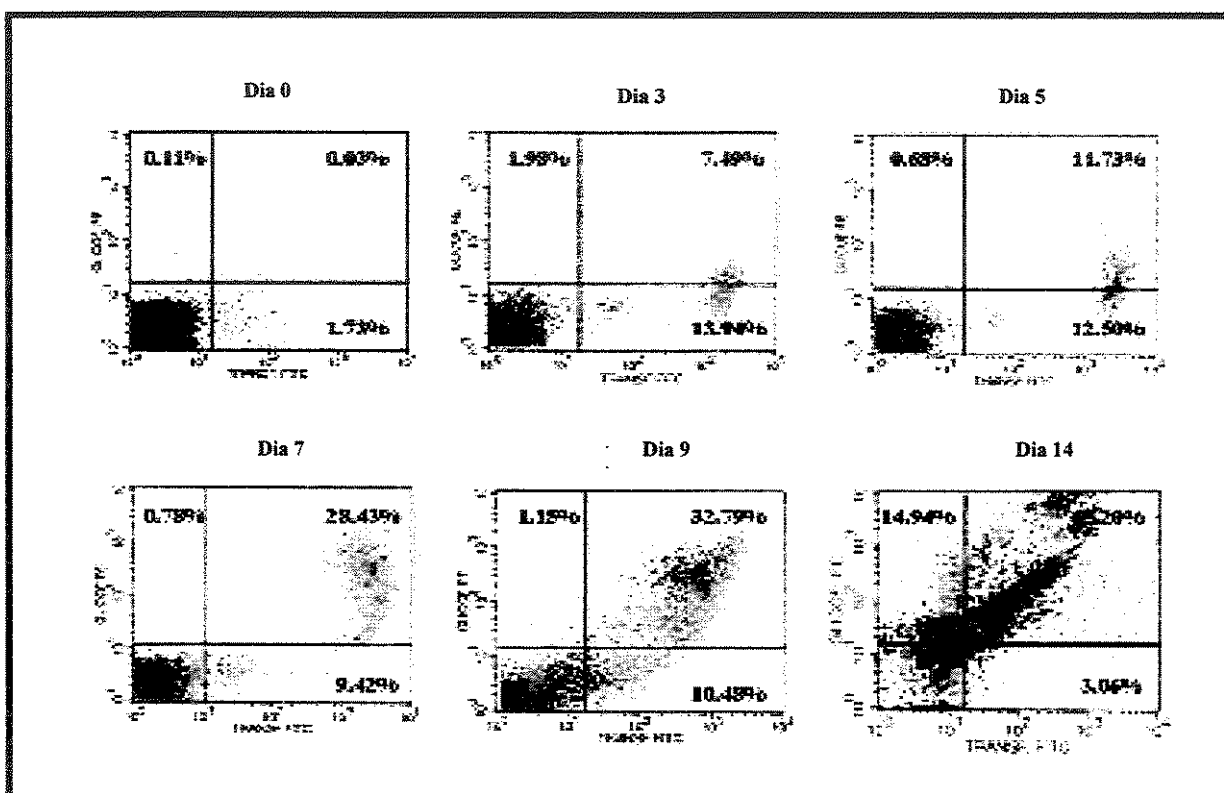


Figura 8 – Análise da diferenciação celular por citometria de fluxo em células de cultura eritróide em duas fases – Dados representativos da citometria de fluxo em células obtidas durante cultura secundária de eritrócitos. A diferenciação foi determinada utilizando anticorpo anti-receptor de transferrina conjugado com FITC (eixo x) e anticorpo anti-glicoforina-A conjugado com PE (eixo y). A porcentagem de células positivas para receptor de transferrina e células positivas para glicoforina A demonstra a diferenciação celular durante a segunda fase de cultura eritróide para cada amostra.

2- Análise da expressão gênica durante a diferenciação eritróide normal

Para quantificar os níveis da expressão do gene *AHSP* durante a diferenciação eritróide, amostras de sangue de doadores saudáveis foram submetidas à cultura eritróide em duas fases (n=5). Como já descrito, estudos morfológicos e por citometria de fluxo (figuras 7 e 8) foram utilizados na determinação e confirmação da diferenciação.

Os resultados indicam aumento concomitante de expressão do gene *AHSP* (gráfico 2) e do gene α -globina (gráfico 3) durante a maturação celular ($p < 0,05$). O maior nível de expressão foi observado quando ocorreu predominância celular do tipo eritroblastos policromatófilos (8° - 10° dia após a adição de eritropoetina), seguido por uma diminuição na expressão em células mais maduras (11°-14° dia após a adição de eritropoetina).

A razão entre os níveis de expressão do gene *AHSP* e do gene α -globina foi calculada para analisar a possível correlação entre a expressão do gene *AHSP* e a expressão do gene α -globina (gráfico 4 e tabela 7). Os resultados indicam que a expressão do gene *AHSP* está associada aos níveis de expressão do gene α -globina, e que a razão entre a expressão dos gene *AHSP*/ α -globina é muito similar durante toda a diferenciação do eritrócito, mostrando uma leve, mas não significativa, diminuição durante as fases tardias de diferenciação ($p = 0,3$).

Expressão do gene AHSP na diferenciação eritróide

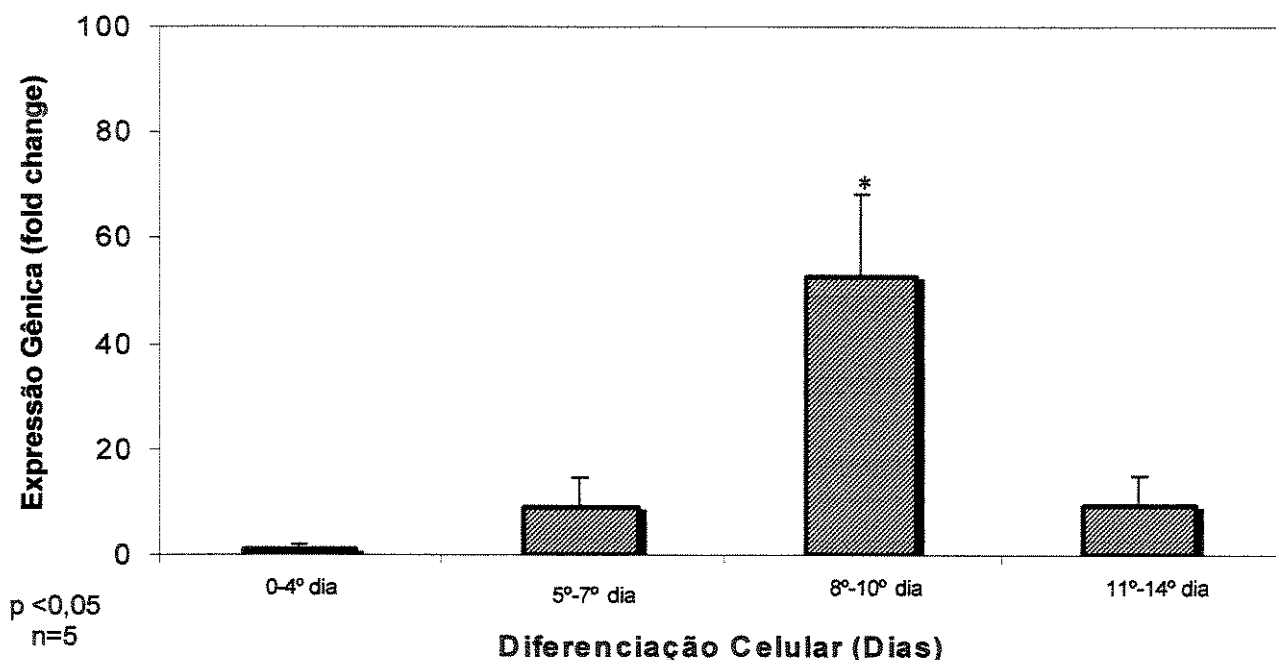


Gráfico 2 – Análise da expressão do gene *AHSP* durante a diferenciação eritróide –

Após a adição de eritropoetina foram feitas coletas celulares e, extração de RNA e síntese de cDNA. Através da tecnologia do PCR quantitativo em tempo real, foram quantificados níveis de expressão do gene *AHSP* durante a diferenciação eritróide. Níveis aumentados de expressão gênica foram detectados predominantemente em células do tipo eritroblasto policromatófilo (8º-10º dia após a adição de eritropoetina). A reação de PCR foi realizada em volume total de 25µl, contendo 20ng de cDNA, 12,5µl de SYBR Green Máster Mix PCR (Applied Biosystems) e as seguintes concentrações de primer: 1,7 µM de primer para *AHSP* e 1,2 µM de primer para *β-actina*.

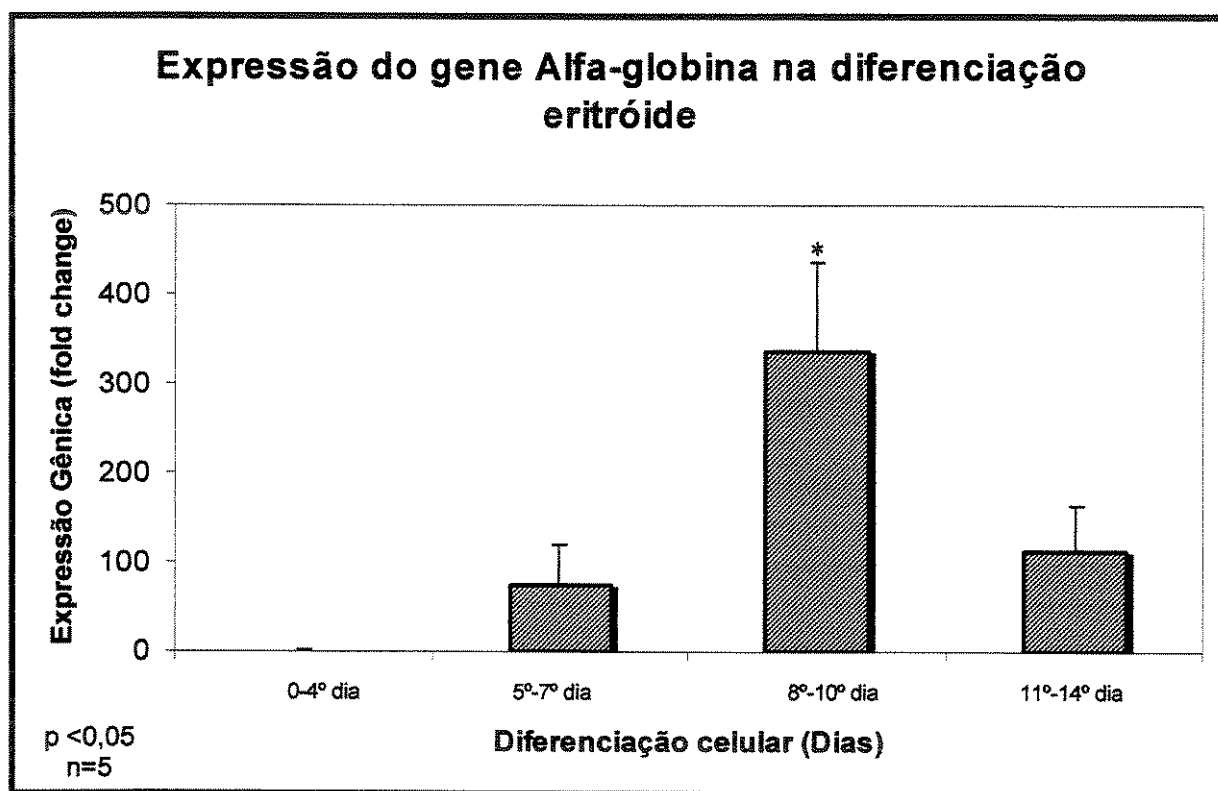


Gráfico 3 – Análise da expressão do gene α -globina durante a diferenciação eritróide

– Foram feitas análises de expressão dos genes requeridos para a formação de hemoglobinas durante a diferenciação eritróide em cultura de duas fases. Níveis aumentados da expressão gênica foram detectados predominantemente em células do tipo eritroblasto policromatófilo (8º-10º dia após adição de eritropoetina). A reação de PCR foi realizada em volume total de 25 μ l, contendo 20ng de cDNA, 12,5 μ l de SYBR Green Máster Mix PCR (Applied Biosystems) e as seguintes concentrações de primer: 1,2 μ M de primer para α -globina e 1,2 μ M de primer para β -actina.

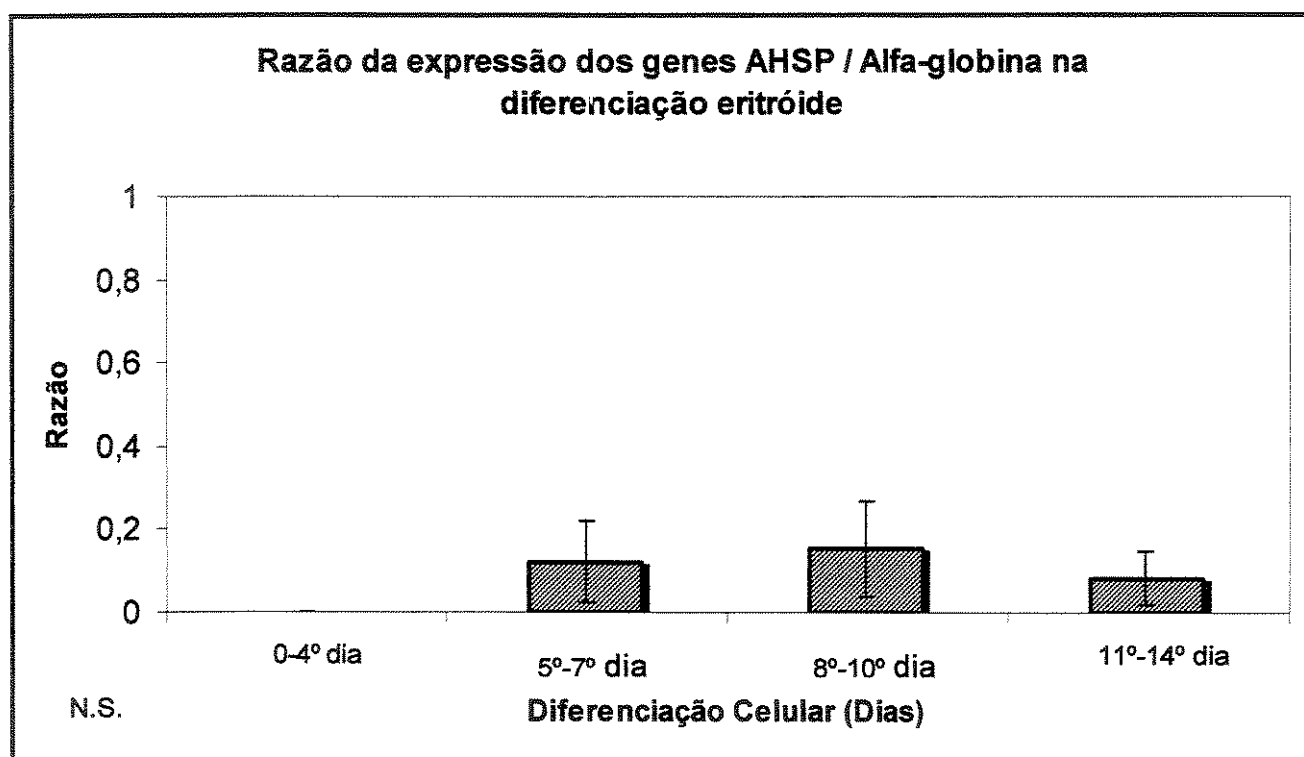


Gráfico 4- Análise da razão da expressão dos gene *AHSP* x *α-globina* durante a diferenciação eritróide – Dados mostrados no gráfico e tabela sugerem que a razão da expressão do gene *AHSP* pela expressão do gene *α-globina* não demonstram diferenças significativas durante a eritropoiese ($p = 0,3$), embora esta relação apresente redução nas fases terminais do processo.

Tabela 7 – Análise da razão da expressão dos gene *AHSP* x α -globina durante a diferenciação eritróide – Dados mostrados no gráfico e tabela sugerem que a razão da expressão do gene *AHSP* pela expressão do gene α -globina não demonstram diferenças significativas durante a eritropoiese ($p = 0,3$), embora esta relação apresente redução nas fases terminais do processo.

Diferenciação celular (dias após adição de eritropoetina)	Níveis de expressão do gene <i>AHSP</i> (Fold Change)	Níveis de expressão do gene α -globin (Fold Change)	Razão $\pm$ Desvio Padrão
0-4° Dia	0	0	0
5°-7° Dia	8,9	73,6	$0,12 \pm 0,1$
8°-10° Dia	52,5	336,8	$0,16 \pm 0,1$
11°-14° Dia	9,3	111,1	$0,08 \pm 0,06$

3- Análise da expressão gênica em pacientes homozigotos para β -talassemia e em controles

Em β -talassemias, os baixos níveis de cadeia β -globinas com a síntese normal de cadeias α -globinas resultam em um desbalanço de síntese de cadeia globínicas. Como o gene *AHSP* foi descrito sendo transcrito numa proteína tipo “chaperone”, com capacidade de se ligar à cadeias α -globinas livres, nós resolvemos estudar os níveis deste gene em reticulócitos de sangue periférico de pacientes com β -talassemias homozigotas evoluções clínicas intermediária e maior.

Como indivíduos controle foram estudados pacientes com esferocitose hereditária por não apresentarem qualquer tipo de alteração estrutural da molécula de hemoglobina e por apresentarem altos níveis de reticulócito.

Todos os pacientes envolvidos nesta pesquisa não apresentam associação com α -talassemia, pelo menos para as descrições mais freqüentes ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{MED}$ e $--^{SEA}$) (Kattami et al, 1996 e Embury et al, 1980).

Para o desenvolvimento da pesquisa, os pacientes foram agrupados em 3 grupos: grupo de pacientes com β -talassemias intermediária (n=5), grupo de pacientes com β -talassemias Maior (n=7) e grupo de indivíduos controles (n=5).

Foram coletados destes pacientes aproximadamente 15ml de sangue periférico para extração de RNA total de reticulócitos, síntese de cDNA e quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real como já descrito em materiais e métodos.

Tabela 8 – Dados gerais de pacientes com β - talassemia envolvidos neste estudo. A classificação para estudo foi determinada a partir da característica fenotípica do paciente: pacientes com necessidade de transfusões freqüentes foram classificados como maior; pacientes com evolução clínica sem necessidade de transfusões foram classificados como intermediário.

Pacientes	Fenótipo	Genótipo	Sexo	Idade
1	β -talassemia maior	CD39 / IVS1-110	Feminino	24
2	β - talassemia maior	IVS1-110 / IVS1-6	Masculino	27
3	β - talassemia maior	CD39 / CD39	Masculino	6
4	β - talassemia maior	CD39 / IVS1-6	Masculino	17
5	β - talassemia maior	IVS1-1/IVS1-6	Feminino	15
6	β - talassemia maior	CD39/IVS1-110	Feminino	18
7	β - talassemia maior	CD39 / IVS1-6	Masculino	14
8	β -talassemia intermediária	CD39 / CD39	Masculino	25
9	β - talassemia intermediária	CD39 / IVS1-6	Feminino	13
10	β - talassemia intermediária	CD39 / IVS1-6	Masculino	10
11	β - talassemia intermediária	CD39 / CD39	Masculino	24
12	β - talassemia intermediária	CD39 / IVS1-110	Masculino	68

Os resultados indicam que a expressão do gene *AHSP* (gráfico 5) foi maior em pacientes com β -talassemia intermediária do que a quantificada em pacientes com β -talassemia Maior e em controles ($p<0,05$). A expressão do gene *AHSP* não apresentou diferenças significativas entre pacientes com β -talassemia Maior e controles. A expressão do gene α -globina foi quantificada nos mesmos pacientes (gráfico 6) e não mostrou diferença de expressão entre os grupos ($p=0,25$).

A razão entre os níveis de expressão do gene *AHSP* e do gene α -globina foram calculados e comparados entre os grupos (gráfico 7 e tabelas 9a e 9b). Os resultados mostram diferenças estatisticamente significativas na relação *AHSP*/ α -globina em pacientes com β -talassemia intermediária ($p<0,05$). No entanto quando comparados com os outros grupos estudados é similar ao evento observado em cultura, onde as células mais diferenciadas apresentam redução nesta relação. Deste modo, o aumento observado pode ser devido ao maior número de eritroblastos nos pacientes com β -talassemia intermediária .

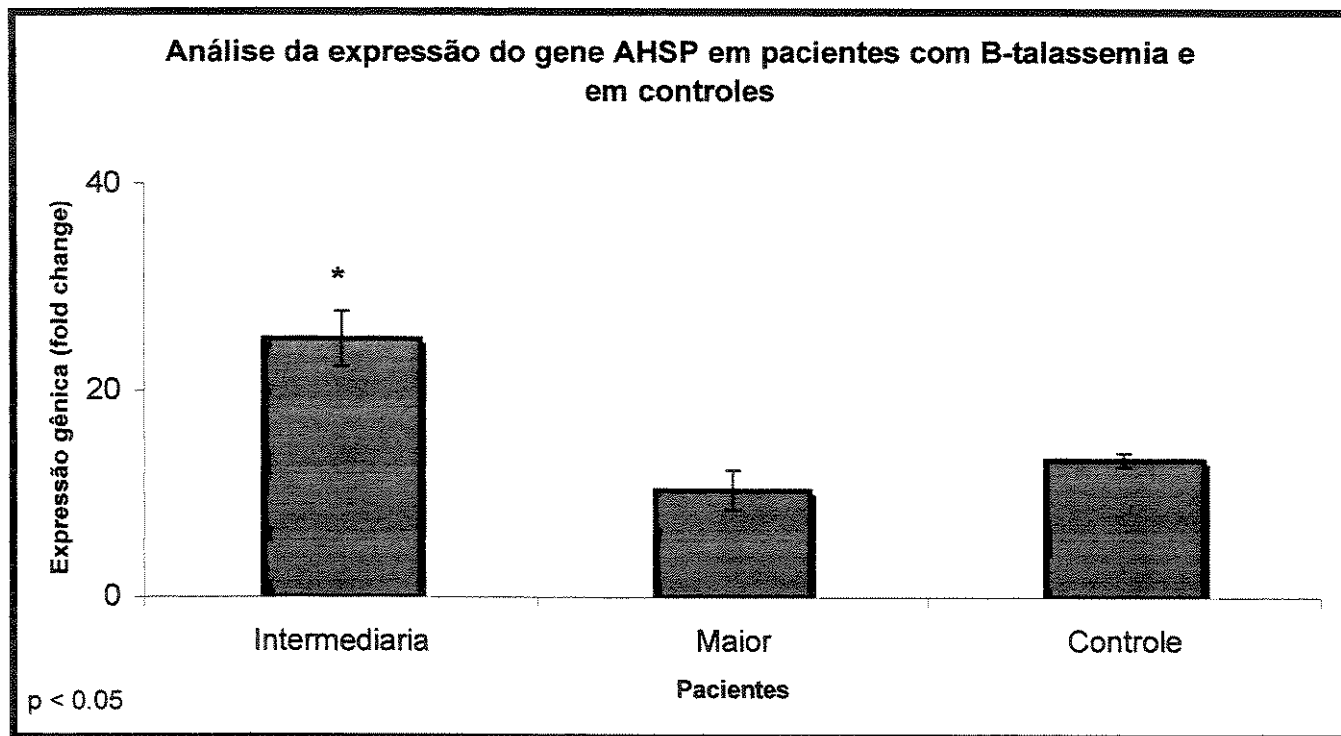


Gráfico 5 - Expressão do gene *AHSP* em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles – Foram analisados 5 pacientes com β -talassemia intermediária, 7 pacientes com β -talassemia maior e 5 pacientes com esferocitose hereditária, considerados como indivíduos controles. A expressão do gene *AHSP* foi maior em pacientes com β -talassemia intermediária quando comparado com os níveis quantificados em pacientes com β -talassemia maior e controles. A reação de PCR foi realizada em volume total de 25 μ l, contendo 100ng de cDNA, 12,5 μ l de SYBR Green Máster Mix PCR (Applied Biosystems) e as seguintes concentrações de primer: 1,7 μ M de primer para *AHSP* e 1,2 μ M de primer para β -actina.

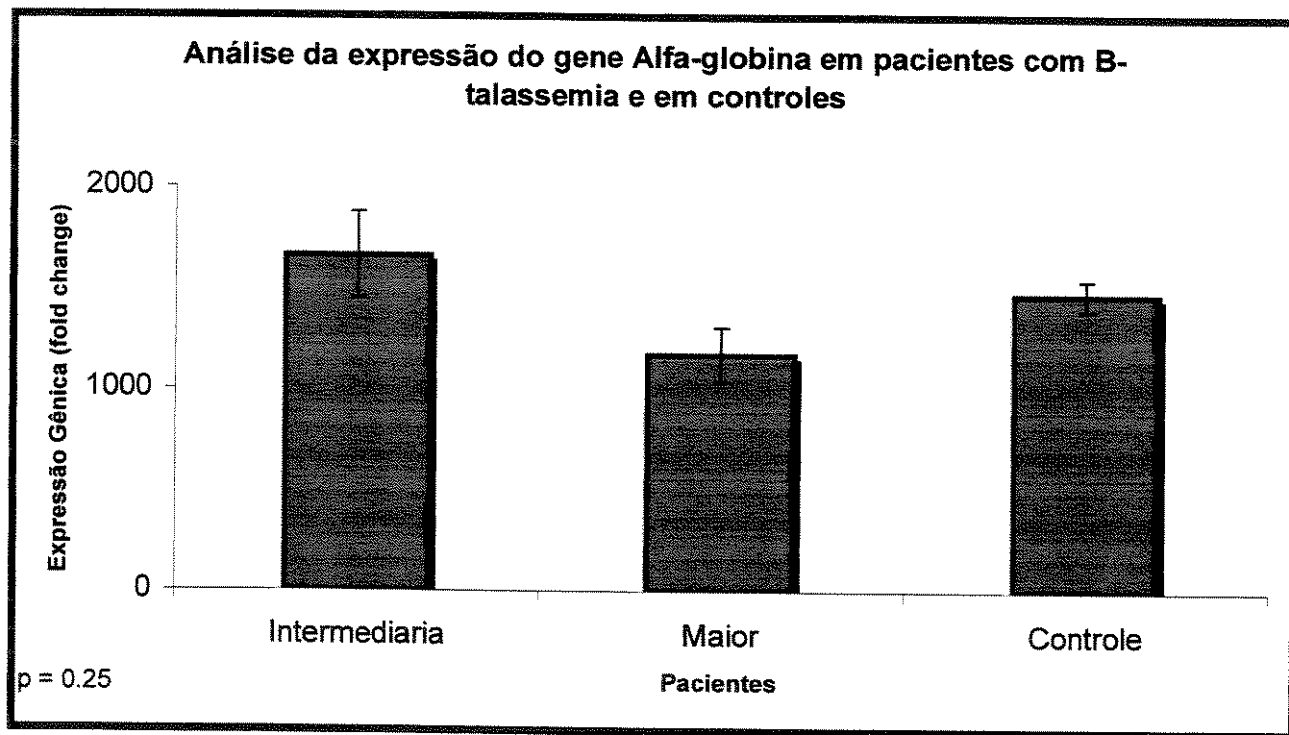


Gráfico 6 - Expressão do gene α -globina em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles – Foram analisados 5 pacientes com β -talassemia intermediária, 7 pacientes com β -talassemia maior e 5 pacientes com esferocitose hereditária, considerados como indivíduos controles. A expressão do gene α -globina não apresentou diferenças significativas entre os pacientes estudados. A reação de PCR foi realizada em volume total de 25 μ l, contendo 100ng de cDNA, 12,5 μ l de SYBR Green Máster Mix PCR (Applied Biosystems) e as seguintes concentrações de primer: 1,2 μ M de primer para α -globina e 1,2 μ M de primer para β -actina.

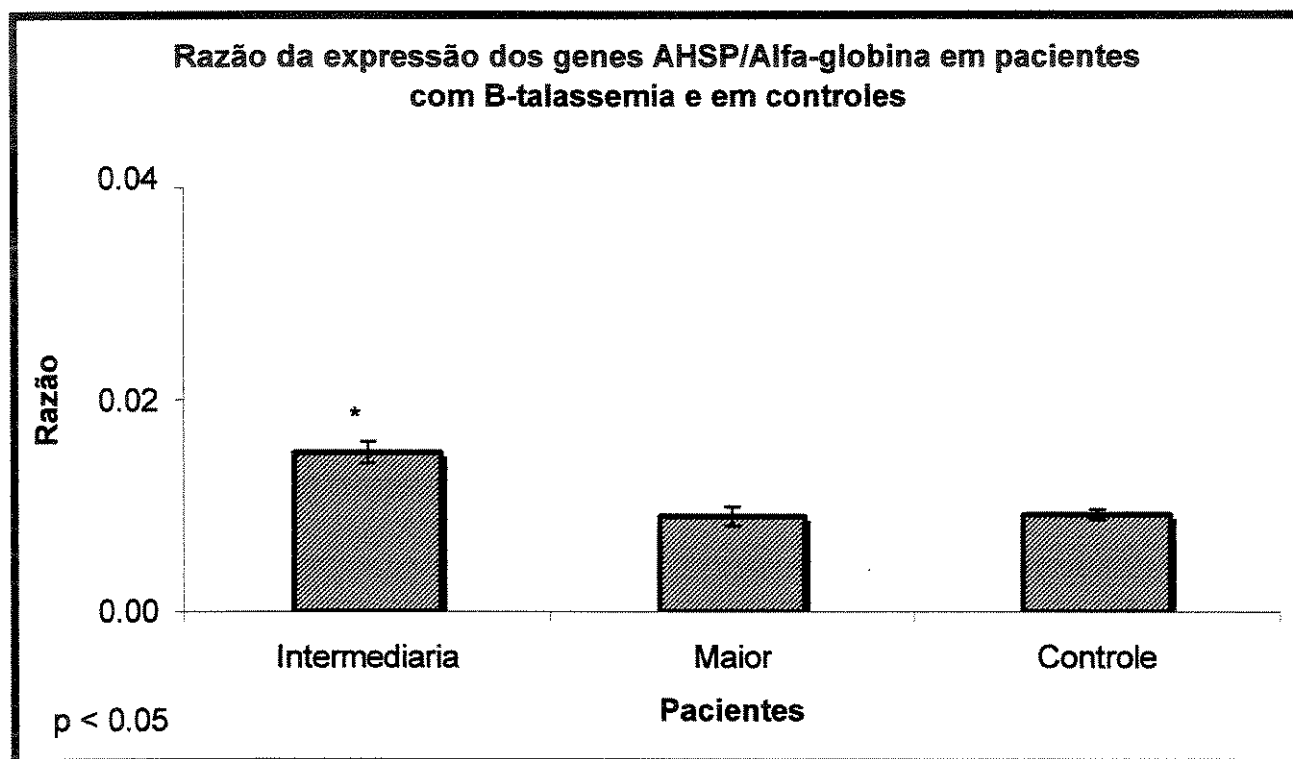


Gráfico 7- Análise da razão da expressão dos gene *AHSP* x α -globina em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles – Os dados demonstrados no gráfico e na tabela sugerem uma razão estatisticamente significativa em pacientes com β -talassemia intermediária ($p < 0,05$) do que a encontrada em pacientes com β -talassemia maior e controles ($p = 0,3$), embora esta diferença possa ser devida ao número de eritroblastos presentes em β -talassemia intermediária.

Tabela 9a– Análise da razão da expressão dos gene *AHSP* x α -globina em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles – Os dados demonstrados no gráfico e na tabela sugerem uma razão estatisticamente significativa em pacientes com β -talassemia intermediária ($p < 0,05$) do que a encontrada em pacientes com β -talassemia maior e controles ($p = 0,3$), embora esta diferença possa ser devida ao número de eritroblastos presentes em β -talassemia intermediária.

Pacientes	Níveis de expressão do	Níveis de expressão do gene	
	gene <i>AHSP</i> (Fold Change)	α -globin (Fold Change)	Razão $\pm$ Desvio Padrão
intermediária	26,26	1496,440	0,015 $\pm$ 0,0005
maior	10,39	1174,13	0,009 $\pm$ 0,0009
controles	13,30	1470,50	0,009 $\pm$ 0,0005

Tabela 9b – Análise da razão da expressão dos gene *AHSP* x α -globina em pacientes com β -talassemia e em indivíduos controles - Os dados demonstrados na tabela sugerem uma razão maior em pacientes com β -talassemia intermediária ($p < 0,05$) do que a encontrada em pacientes com β -talassemia maior e controles ($p = 0,3$). embora esta diferença possa ser devida ao número de eritroblastos presentes em β -talassemia intermediária.

Pacientes	Fenótipo	Genótipo	Expressão do gene <i>AHSP</i>	Razão <i>AHSP</i> / α -globina
1	β -talassemia maior	CD39 / IVS1-110	13,8	0,011
2	β - talassemia maior	IVS1-110 / IVS1-6	9,68	0,006
3	β - talassemia maior	CD39 / CD39	11,67	0,008
4	β - talassemia maior	CD39 / IVS1-6	5,45	0,005
5	β - talassemia maior	IVS1-1/IVS1-6	18,45	0,015
6	β - talassemia maior	CD39/IVS1-110	11,04	0,010
7	β - talassemia maior	CD39 / IVS1-6	2,65	0,006
8	β -talassemia intermediária	CD39 / CD39	29,65	0,014
9	β - talassemia intermediária	CD39 / IVS1-6	31,18	0,014
10	β - talassemia intermediária	CD39 / IVS1-6	24,53	0,017
11	β - talassemia intermediária	CD39 / CD39	24,86	0,019
12	β - talassemia intermediária	CD39 / IVS1-110	14,79	0,012

4- Análise estrutural do gene *AHSP*

Neste estudo fizemos a análise de DNAs de pacientes com β -talassemias e indivíduos controles na busca de mutações e polimorfismos no gene *AHSP*. Atualmente encontram-se depositados no dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp>), que se encontra incorporado ao sistema NCBI's, os polimorfismos descritos no gene *AHSP* ilustrado na tabela 10:

Tabela 10 – Relação de SNPs já descritos no gene *AHSP*

Posição	Polimorfismo	Observações
12347	G - A	Intron
12391	G - A	Intron
12798	T - A	Troca de aminoácido – perda de sítio de restrição para enzima <i>Fok I</i>
12895	T - G	Não provoca alterações
12991	T - C	Não provoca alterações

Para a busca de outros polimorfismos e mutações em amostras de pacientes com β -talassemia homozigótica foi amplificado do cromossomo 16 a região estrutural do gene *AHSP* por meio de PCR com *primers* específicos e os produtos gerados analisados por seqüenciamento automático de DNA, utilizando 4 (quatro) pares de *primers*, como descrito em materiais e métodos.

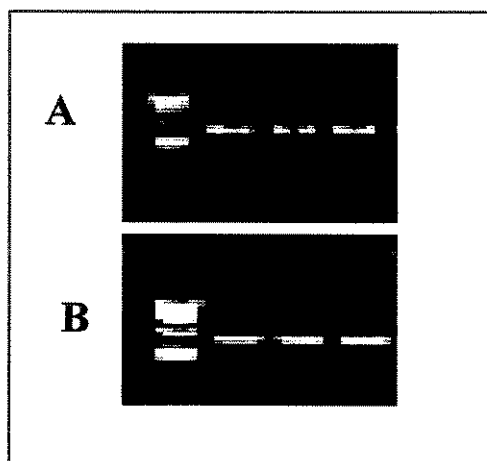


Figura 9 – Fragmentos do gene *AHSP* amplificados por PCR – Gel de agarose 1% com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi o ϕ X174 RF DNA/ Hae III (Invitrogen). Os fragmentos denominados (A) referem-se ao fragmento E₁ e (B) referem-se ao fragmento E₂.

Foram analisadas 36 amostras de pacientes homozigotos para β -talassemia, 07 amostras de pacientes com esferocitose hereditária, 03 amostras de pacientes com anemia falciforme e 22 amostras de voluntários. Dados de etnia, sexo ou idade não foram considerados em nenhum dos grupos.

Quatro alterações frequentes foram detectadas nos seqüenciamentos quando comparadas com a seqüência depositada no GeneBank. As alterações encontradas nas amostras analisadas estão listadas na tabela 11.

Os polimorfismos encontrados nas posições 12347 (figura 10) e 12391 (figura 11), com localização no 1º intron, não provocam alteração ou inserção de sítio de splicing, como confirmado com o seqüenciamento do cDNA de algumas amostras com estas alterações detectadas no DNA, e os encontrados nas posições 12895 (figura 12) e 12991 (figura 13), com localização no 3º exon, não provocam alteração de aminoácido nem inserção ou remoção de sítio de enzimas de restrição.

Foram realizadas análises quanto à predominância dos polimorfismos em pacientes ou em controles (tabela 12). Os polimorfismos 12347 e 12895 apresentaram predominância nas amostras de pacientes com β -talassemia ($p < 0,05$). Uma análise levando em consideração a predominância em conjunto dos polimorfismos foi realizada também (tabela 13). Os dados indicam que a presença dos polimorfismos 12347 / 12391 / 12895 em conjunto e dos polimorfismos 12347 / 12895 em conjunto podem estar relacionados com β -talassemia ($p < 0,05$), enquanto a presença dos polimorfismos 12347 / 12391 em conjunto mostram amostra não estar relacionados com β -talassemia ($p = 0,5$).

Relacionando a presença de SNPs com o genótipo para β -talassemia e os níveis de *AHSP* sugerem que os polimorfismos possivelmente não estão relacionados com melhor evolução clínica em β -talassemia (tabela 14) (SNPs 12347 $p = 0,6$; SNPs 12391 $p = 1$; SNPs 12895 $p = 1$).

Tabela 11 – Relação de polimorfismos e mutações encontradas nos indivíduos analisados neste estudo. A localização indica o local no gene onde ocorre o polimorfismo ou mutação e as observações referem-se à descrição da troca de nucleotídeo envolvido.

Alteração	Localização	Observação
12347	1º intron	-
12391	1º intron	-
12895	2º exon	Troca T por G – não provoca alterações de aminoácido
12991	2º exon	Troca T por C – não provoca alterações de aminoácido

Tabela 12 - Porcentagens de SNPs detectados na análise do DNA de pacientes homozigotos para β -talassemia e em controles. Os polimorfismos 12347 e 12895 parecem estar relacionados com -talassemia ($p < 0,05$).

SNPs	12347 he	12347 ho	12391 he	12391 ho	12895 he	12895 ho	12391 he	12291 ho
Pacientes	33%	30,5%	2,7%	-	41,6%	-	1%	-
Controles	15,6%	15,6%	18,75%	-	18,75%	-	1%	-
Total	48,6%	46,1%	21,45%	-	60,35%	2%	2%	-

Tabela 13 – Análise da presença de polimorfismos em conjunto – Os dados indicam que presença dos 3 SNPs em conjunto e dos SNPs 12347 /12895, podem estar relacionados com β -talassemia ($p<0,05$).

Amostras	12347/12391/12985	12347/12391	12347/12895	12391/12895	Sem SNPs
β -talassemia	30%	2,7%	11%	8,3%	16%
Controles	21,85%	6,25	3%	3%	43,75%

Tabela 14 - Análise comparativa de dados de expressão do gene *AHSP*, genótipo para β -talassemia e SNPs – Os dados indicam que não existe relação entre os SNPs no gene *AHSP* com seus níveis de expressão e, também não existe relação entre os SNPs e evolução clínica ou genótipo para β -talassemia.

Pacientes	Fenótipo	Genótipo	Expressão do gene <i>AHSP</i>	SNPs
1	β -talassemia Maior	CD39 / IVS1-110	13,8	12347 / 12391
2	β - talassemia Maior	IVS1-110 / IVS1-6	9,68	-
3	β - talassemia Maior	CD39 / CD39	11,67	12391 / 12895
4	β - talassemia Maior	CD39 / IVS1-6	5,45	12347 / 12895
5	β - talassemia Maior	IVS1-1/IVS1-6	18,45	12347
6	β - talassemia Maior	CD39/IVS1-110	11,04	12347
7	β - talassemia Maior	CD39 / IVS1-6	2,65	12391 / 12985
8	β -talassemia Intermediaria	CD39 / CD39	29,65	12347/12391/12895
9	β - talassemia Intermediaria	CD39 / IVS1-6	31,18	12347 / 12391 / 12895
10	β - talassemia Intermediaria	CD39 / IVS1-6	24,53	12347
11	β - talassemia Intermediaria	CD39 / CD39	24,86	12347 / 12895
12	β - talassemia Intermediaria	CD39 / IVS1-110	14,79	12347

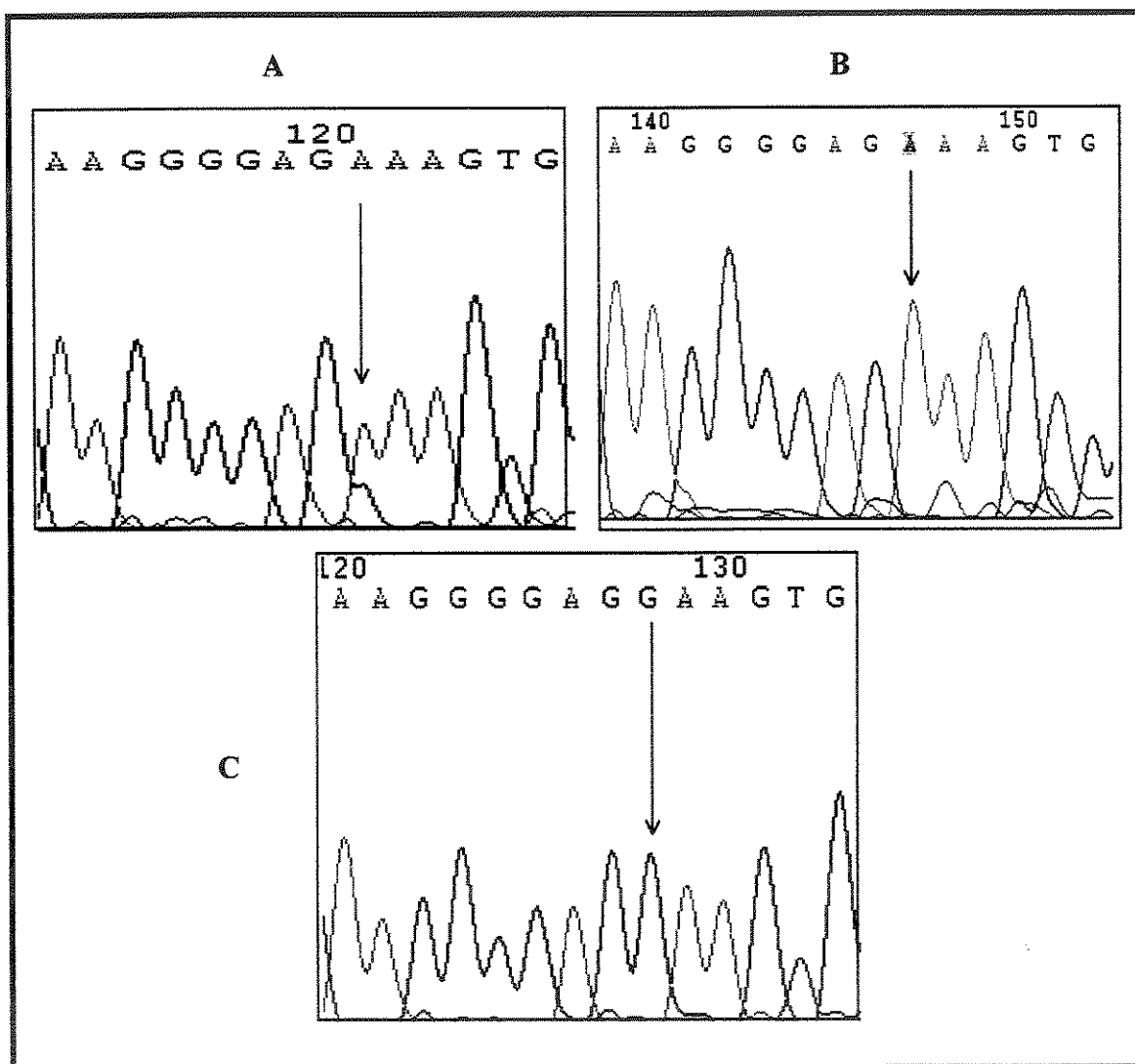


Figura 10 – Eletroferograma de seqüências – Polimorfismo região 12347 – As amostras que foram submetidas a seqüenciamento de fita sense e antisense em equipamento 377 ABI da Applied Biosystems. As seqüências fornecidas pelo eletroferograma, analisadas no software Chromas, foram comparadas com as depositadas no GeneBank. (A) refere-se ao polimorfismo em heterozigose, (B) refere-se ao polimorfismo em homozigose e (C) refere-se à seqüência normal. A seqüência demonstrada refere-se à fita sense.

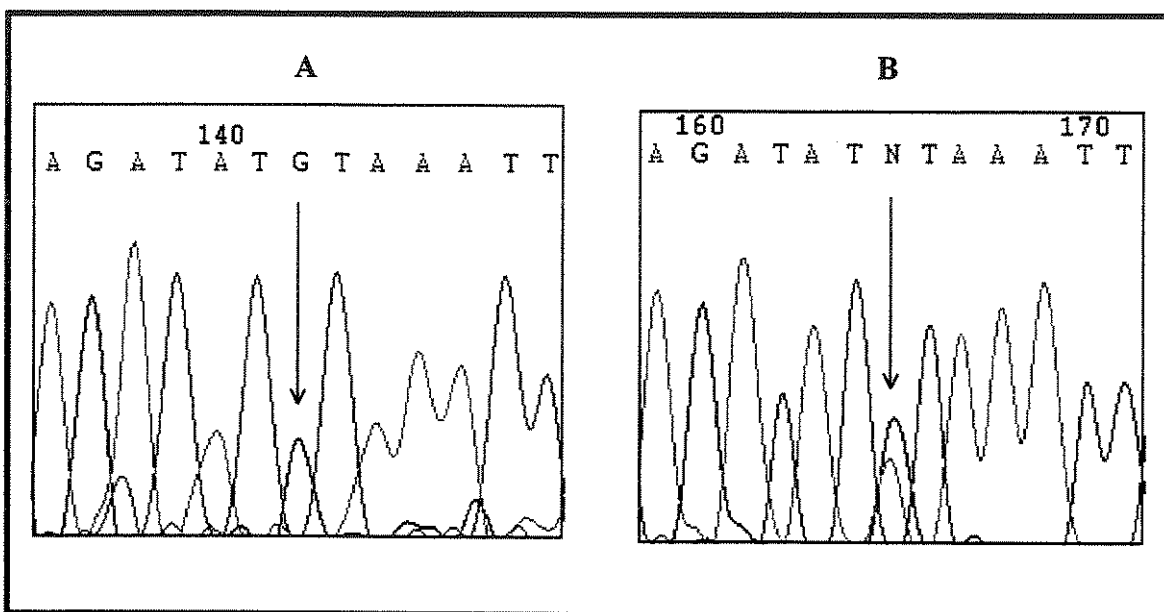


Figura 11 – Eletroferograma de seqüências – Polimorfismo região 12391 – As amostras que foram submetidas a seqüenciamento de fita sense e antisense em equipamento 377 ABI da Applied Biosystems. As seqüências fornecidas pelo eletroferograma, analisadas no software Chromas, foram comparadas com as depositadas no GeneBank. (A) refere-se à seqüência normal e (B) refere-se ao polimorfismo em heterozigose. A seqüência demonstrada refere-se à fita sense.

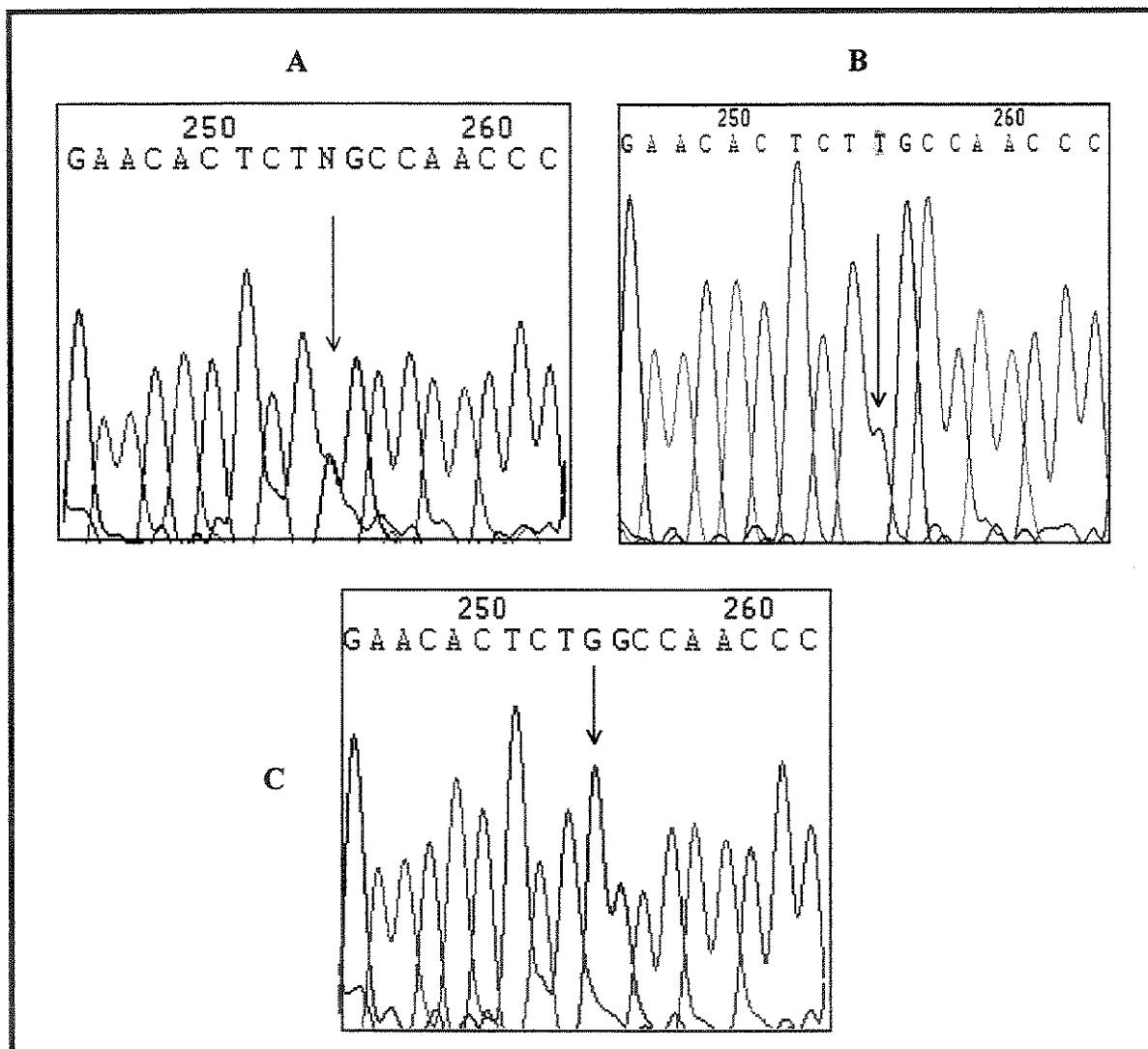


Figura 12 – Eletroferograma de seqüências – Polimorfismo região 12895 – As amostras que foram submetidas a seqüenciamento de fita sense e antisense em equipamento 377 ABI da Applied Biosystems. As seqüências fornecidas pelo eletroferograma, analisadas no software Chromas, foram comparadas com as depositadas no GeneBank. (A) refere-se a ao polimorfismo em heterozigose, (B) refere-se ao polimorfismo em homozigose e (C) refere-se à seqüência normal. A seqüência demonstrada refere-se à fita sense.

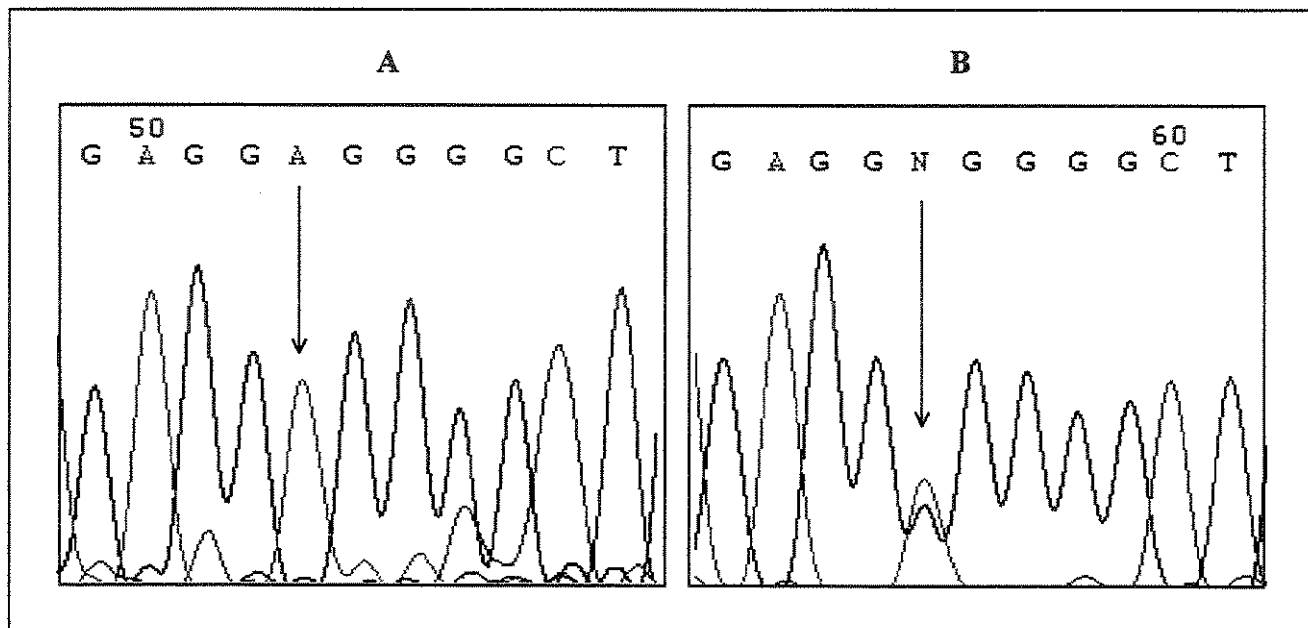


Figura 13 – Eletroferograma de seqüências – Polimorfismo região 12991 – As amostras que foram submetidas a seqüenciamento de fita sense e antisense em equipamento 377 ABI da Applied Biosystems. As seqüências fornecidas pelo eletroferograma, analisadas no software Chromas, foram comparadas com as depositadas no GeneBank. (A) refere-se à seqüência normal e (B) refere-se ao polimorfismo em heterozigose. A seqüência demonstrada refere-se à fita antisense.

Foi detectada uma mutação na região 12888 (figura 14), no 3° exon, que promove a modificação de uma Adenina para uma Timina, levando á substituição do aminoácido na posição 75 da cadeia polipeptídica de uma Asparagina por uma Isoleucina. Alterações de outro tipo, como modificações de sítio de restrição e modificação de sítio de *splice* não acontecem com a mudança do aminoácido.

Esta mutação foi detectada em uma amostra de paciente com β -talassemia intermediária atípica, por ter apenas um alelo com mutação no gene da β -globina. Dados hematológicos dos pais (tabela 15) demonstraram que a mãe apresenta características compatíveis com as observadas em pacientes com traço β -talassêmico (indivíduos heterozigotos para β -talassemia) e o pai demonstra dados hematológicos e de análise de DNA normais para o gene β -globina.

Uma análise preliminar da conformação da estrutura secundária de *AHSP* pela ferramenta “*Prof – Cascade Multiple Classifiers for Tertiary Structure Prediction*” disponível na internet (www.expasy.org) sugere, em comparação com a seqüência de aminoácidos consensu, que a proteína pode ter sua conformação alterada em virtude da substituição do aminoácido na mutação 12888 (tabela 16). Vale ressaltar que este tipo de simulação apresent 60% de confiabilidade.

Tabela 15 – Informações genéticas e hematológicas do paciente com mutação 12888 no gene *AHSP* – Os dados hematológicos indicam que o paciente e a mãe possuem traço talassêmicos. Os mesmos dados indicam que o pai é normal para β -talassemia. Os dados da análise do gene β -globina acompanham os dados hematológicos. (*) menor que 2%.

	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	β -globina
Paciente	7,9	27,4	67	19,3	4,0	5,2	CD39/N
Mãe	10,8	34,5	63,0	19,7	5,7	0,7	CD39/N
Pai	14,5	43,8	89,6	29,7	2	*	N/N

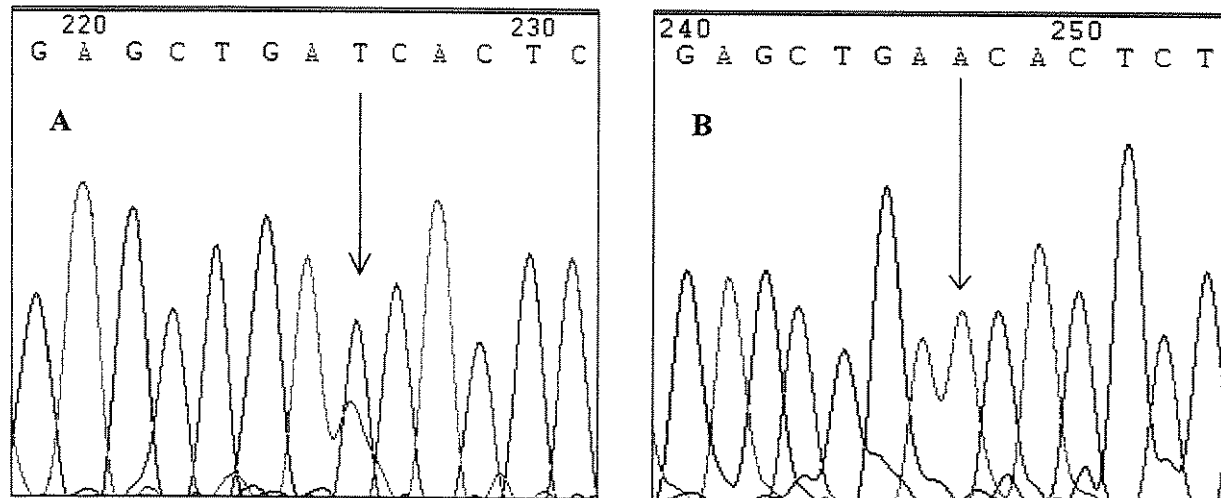
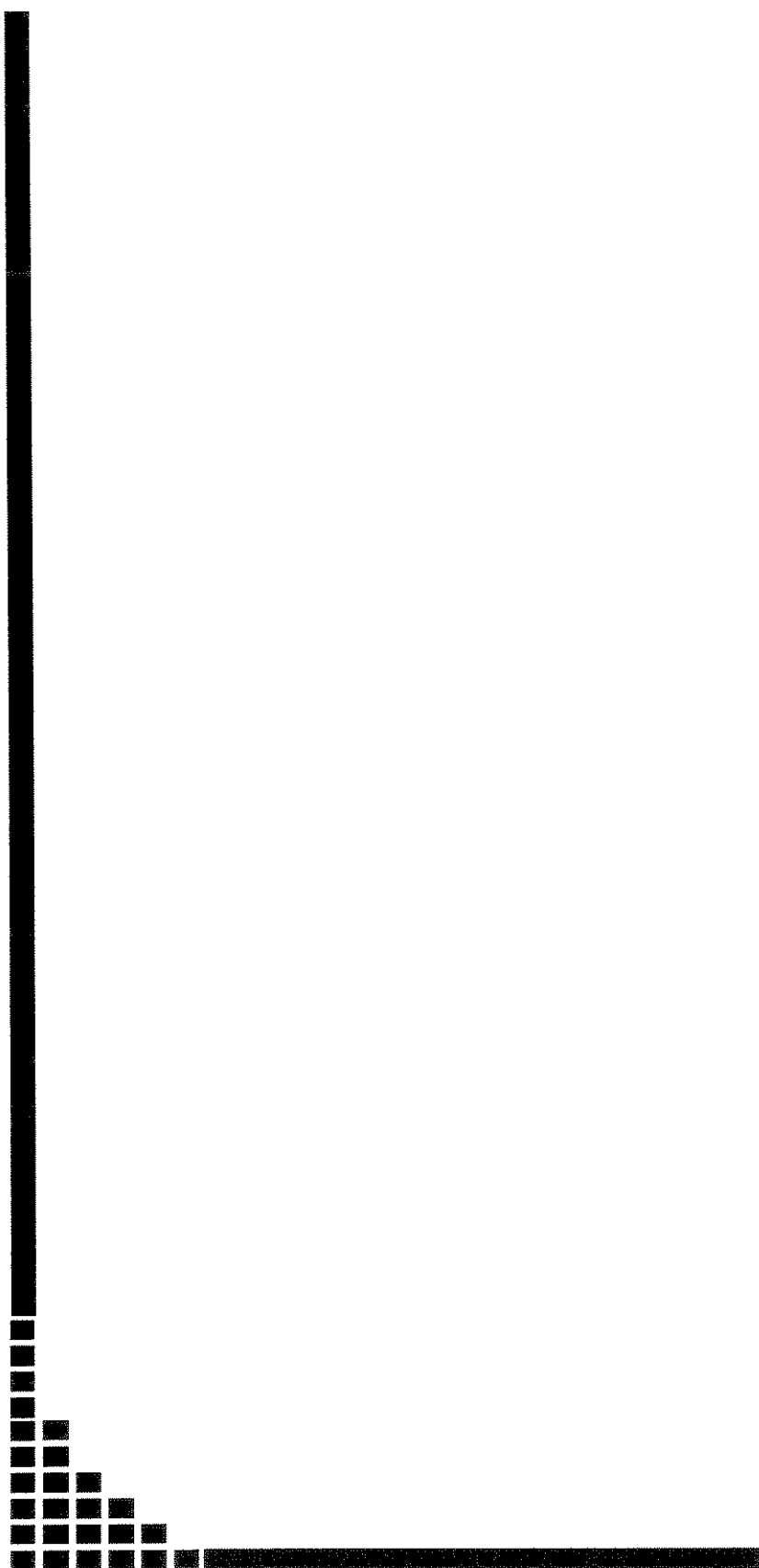


Figura 14 – Eletroferograma de seqüências - mutação região 12888 – As amostras que foram submetidas a sequenciamento de fita sense e antisense em equipamento 377 ABI da Applied Biosystems. As seqüência fornecidas pelo eletroferograma, analisadas no software Chromas, foram comparadas com as depositadas no GeneBank. (A) refere-se a seqüência com a mutação e (B) refere-se à seqüência normal.

Tabela 16 – Análise preliminar da estrutura secundária de AHSP com e sem mutação no sítio 12888 – Dados gerados a partir da ferramenta “*Prof- Cascade Multiple Classifiers for Secondary Structure Prediction*”. Em destaque mais claro está representado o aminoácido alterado pela mutação na base 12888 e, em destaque mais escuro estão os aminoácidos que parecem ser afetados pela mutação na posição 12888. (H) alfa hélice, (E) fita beta, e (C) Coil.

AHSP - Proteína Consensu						AHSP - Proteína Mutação sítio 12888											
M	H	0.635	D	C	0.715	R	H	0.974	M	H	0.637	D	C	0.716	R	H	0.969
A	H	0.806	M	C	0.502	Q	H	0.968	A	H	0.807	M	C	0.502	Q	H	0.964
L	H	0.860	V	E	0.438	E	H	0.960	L	H	0.861	V	E	0.435	E	H	0.963
L	H	0.826	T	E	0.558				L	H	0.826	T	E	0.555	L	H	0.827
K	H	0.793	V	E	0.543	N	H	0.829	K	H	0.793	V	E	0.539	I	H	0.925
A	H	0.614	V	H	0.694				A	H	0.615	V	H	0.699	T	H	0.804
N	C	0.694	E	H	0.697				N	C	0.693	E	H	0.702	L	H	0.923
K	H	0.775	D	H	0.576				K	H	0.777	D	H	0.580	A	C	0.789
D	H	0.868	W	H	0.758				D	H	0.869	W	H	0.761	H	C	0.893
L	H	0.897	M	H	0.819				L	H	0.897	M	H	0.822	P	H	0.773
I	H	0.917	N	H	0.885	F	H	0.876	I	H	0.917	N	H	0.887	F	H	0.879
S	H	0.898	F	H	0.836	L	H	0.928	S	H	0.898	F	H	0.838	L	H	0.933
A	H	0.774	Y	H	0.846	A	H	0.948	A	H	0.774	Y	H	0.848	A	H	0.955
G	H	0.570	I	H	0.883	K	H	0.961	G	H	0.571	I	H	0.885	K	H	0.963
L	H	0.811	N	H	0.831	Y	H	0.968	L	H	0.812	N	H	0.832	Y	H	0.969
K	H	0.886	Y	H	0.924	R	H	0.970	K	H	0.887	Y	H	0.924	R	H	0.971
E	H	0.911	Y	H	0.917	D	H	0.967	E	H	0.912	Y	H	0.918	D	H	0.967
F	H	0.923	R	H	0.852	F	H	0.955	F	H	0.924	R	H	0.853	F	H	0.955
S	H	0.913	Q	H	0.678	L	H	0.940	S	H	0.914	Q	H	0.680	L	H	0.940
V	H	0.900	Q	C	0.512	K	H	0.901	V	H	0.901	Q	C	0.512	K	H	0.902
L	H	0.841	V	C	0.679	S	H	0.746	L	H	0.843	V	C	0.680	S	H	0.746
L	H	0.699	T	C	0.875	H	C	0.554	L	H	0.702	T	C	0.876	H	C	0.554
N	C	0.526	G	C	0.912	E	C	0.674	N	C	0.524	G	C	0.913	E	C	0.674
Q	C	0.496	E	C	0.911	L	C	0.710	Q	C	0.494	E	C	0.911	L	C	0.709
Q	H	0.478	P	C	0.632	P	C	0.715	Q	H	0.481	P	C	0.633	P	C	0.714
V	C	0.552	Q	H	0.617	S	C	0.633	V	C	0.551	Q	H	0.618	S	C	0.631
F	C	0.765	E	H	0.701	H	C	0.628	F	C	0.766	E	H	0.701	H	C	0.627
N	C	0.904	R	H	0.895	P	C	0.576	N	C	0.904	R	H	0.896	P	C	0.575
D	C	0.911	D	H	0.941	P	C	0.547	D	C	0.911	D	H	0.941	P	C	0.547
P	C	0.875	K	H	0.958	P	C	0.600	P	C	0.876	K	H	0.958	P	C	0.600
L	C	0.812	A	H	0.962	S	C	0.801	L	C	0.812	A	H	0.963	S	C	0.802
V	C	0.807	L	H	0.967	S	C	0.954	V	C	0.808	L	H	0.968	S	C	0.955
S	C	0.804	Q	H	0.968	END			S	C	0.805	Q	H	0.969	END		
E	C	0.795	E	H	0.970				E	C	0.796	E	H	0.969			
			L	H	0.970							E	C	0.793	L	H	0.967



DISCUSSÃO

β -talassemia é uma doença hereditária promovida pela mutação no gene da globina β resultando na ausência de cadeias- β (β^0 -talassemia), ou apenas na redução da síntese de cadeias- β (β^+ -talassemia). As manifestações clínicas relacionadas com a β -talassemia são heterogêneas e caracterizadas primeiramente pelo desbalanço na síntese de cadeias globínicas (Collins, 1984).

A reduzida ou ausente síntese de cadeias- β com a síntese normal de cadeias- α resulta no acúmulo das cadeias com síntese normal. As cadeias- α livres são extremamente instáveis e precipitam nos precursores eritróides, formando corpos de inclusão. Estes são responsáveis por eritropoese ineficaz que caracteriza todas as β -talassemias. Enquanto o estado de anemia ocorre por consequência da eritropoese não efetiva, existe também um pequeno componente hemolítico que é descrito como o principal destruidor de hemácias contendo corpos de inclusão na circulação (Weathedrall, 2001).

Tradicionalmente, o genótipo para β -talassemia pode ser classificado em dois grupos:

- heterozigotos ou traço talassêmico ($\beta^0\beta$ e ou $\beta^+\beta$), também denominado de β -talassemia Menor, onde o paciente apresenta leve anemia microcítica hipocrômica, muitas vezes assintomática. e,
- homozigoto ($\beta^0\beta^0$, $\beta^+\beta^+$, $\beta^+\beta^0$), que pode ser classificado em β -talassemia Maior, onde o paciente apresenta uma anemia hemolítica grave e necessita de transfusões regulares, ou β -talassemia intermediária, situação onde a transfusão freqüente não é necessária.

Existem fatores conhecidos que podem modular cadeias- α livres, como a co-herança de α -talassemia ou Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF). Mas na ausência destes fatores, é de grande interesse da medicina determinar quais seriam os fatores que contribuiriam para a apresentação dos fenótipos do tipo Intermediário em pacientes β -talassêmicos homozigotos. (Gill et all, 1980).

É conhecido que o fator principal na fisiopatologia de β -talassemia é o grau, em quantidade, de cadeias- α livres, que precipitam e lesam as células eritróides. Alterações que reduzem a quantidade de cadeias- α livres, reduzindo conseqüentemente seus efeitos deletérios nos precursores eritróides, poderiam então atuar como modulador no fenótipo de β -talassemia (Thein, 1998).

Recentemente foi descrita por Kihm et al (2001) a proteína *AHSP* (*Alpha-Haemoglobin Stabilizing Protein*), uma proteína do tipo “chaperone” (proteínas com capacidade de se ligarem a outras proteínas), evitando degradação ou precipitação. No caso de *AHSP*, esta proteína tem capacidade de formar complexos estáveis quando ligada a α -globinas. Gell et al (2002) confirmaram sua especificidade por α -globinas em camundongos.

Este fato poderia ser derivado de um efeito bloqueador da oxidação e precipitação de cadeias α -globina livres, o que promoveria um mecanismo compensatório através do qual nos precursores de eritrócitos, os efeitos deletérios da precipitação de α -globinas seriam reduzidos durante a eritropoese normal.

Para analisar o comportamento do gene *AHSP* na diferenciação eritróide humana normal, foram realizados experimentos de quantificação de mRNA em amostras de células de cultura de diferenciação eritróide em duas fases, onde a primeira fase induz a proliferação de precursores hematopoéticos e a segunda fase, após a adição de eritropoetina, leva à estimulação da eritropoese.

Nossos resultados mostraram que a expressão do gene *AHSP* durante a diferenciação eritróide em humanos aumenta durante a diferenciação celular, com pico de expressão em estágios celulares com alta produção de cadeias globínicas. A redução nos níveis de expressão ocorre quando a célula começa a perder sua função nuclear e a síntese de hemoglobina é reduzida. Observamos também que a expressão do gene α -globina nesta células tem comportamento similar à expressão do gene *AHSP*.

Estes dados, em conjunto, sugerem que *AHSP* pode apresentar função importante na eritropoese normal pela estabilização de cadeias- α . Os dados da razão da expressão gênica *AHSP*/ α -globina mostram que provavelmente esta razão é bastante conservada durante todos os estágios da eritropoese.

Adicionalmente à determinação desta razão na expressão gênica durante todos os estágios de diferenciação eritróide pode ser uma possível ferramenta no estudo de possíveis anormalidades na expressão destes gene em hemoglobinopatias, como por exemplo nas β -talassemias.

Com o objetivo de investigar essa possível atuação do gene *AHSP* nas β -talassemias foram realizados estudos de expressão do gene *AHSP* em reticulócitos circulantes de pacientes com β -talassemia maior e intermediária e em indivíduos controles.

Os resultados obtidos da quantificação da expressão do gene *AHSP* mostraram níveis altos da expressão do gene, estatisticamente significantes, em pacientes com β -talassemia intermediária quando comparados com os dados de quantificação em pacientes com β -talassemia maior e controles, uma vez que os dados de quantificação da expressão do gene α -globina não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, sugerindo um nível de produção de cadeias- α similar entre os indivíduos estudados. Estes dados poderiam sugerir que a expressão do gene *AHSP* estaria correlacionada com a melhor evolução clínica de pacientes com β -talassemia.

No entanto, analisando a razão da expressão gênica *AHSP*/ α -globina, os dados não apresentam diferenças suficientes para acreditarmos que *AHSP* estaria envolvida na melhora clínica de pacientes com β -talassemia.

Os resultados mostram diferenças estatisticamente significativas na relação *AHSP*/ α -globina em pacientes com β -talassemia intermediária ($p < 0,05$). No entanto quando comparando com os outros grupos estudados a razão é similar ao evento observado nos resultados obtidos da cultura de duas feses, onde as células mais diferenciadas

apresentam redução nesta relação. Deste modo, o aumento observado pode ser devido ao maior número de eritroblastos nos pacientes com β -talassemia intermediária.

Além de estudos de expressão do gene *AHSP*, também foram investigadas a presença de mutações e polimorfismos no gene *AHSP*. Foram analisadas 68 amostras e detectados 4 polimorfismos situados nas regiões 12347 (A – G) e 12391 (A – G), localizadas no 1º intron e 12895 (T – G) e 12991 (T – C), localizadas no 3º exon. Os SNPs 12347 e 12895 mostraram relação com a presença de β -talassemia, bem como a presença em conjunto dos SNPs 12347 /12391 /12895 e 12347/12895.

Mesmo apresentando associação com a clínica de β -talassemia a análise de dados não mostrou correlação destes polimorfismos com os níveis de expressão do gene *AHSP*, evolução clínica e genótipo para β -talassemia. Estes polimorfismos podem não ser determinantes na expressão do gene *AHSP* nem na gravidade da clínica de β -talassemia, mas estudos futuros em um número maior de amostras e utilização de haplótipos poderia levar à uma melhor compreensão do fenômeno.

A partir das análises de DNA foi detectada uma mutação na base 12888 que modifica o aminoácido de número 75 (Asparagina por Isoleucina) e, de acordo com a análise preditiva da estrutura terciária da proteína, pode alterar a conformação da proteína, o que pode refletir em instabilidade protéica ou inativação dos sítios de ligação com cadeias- α .

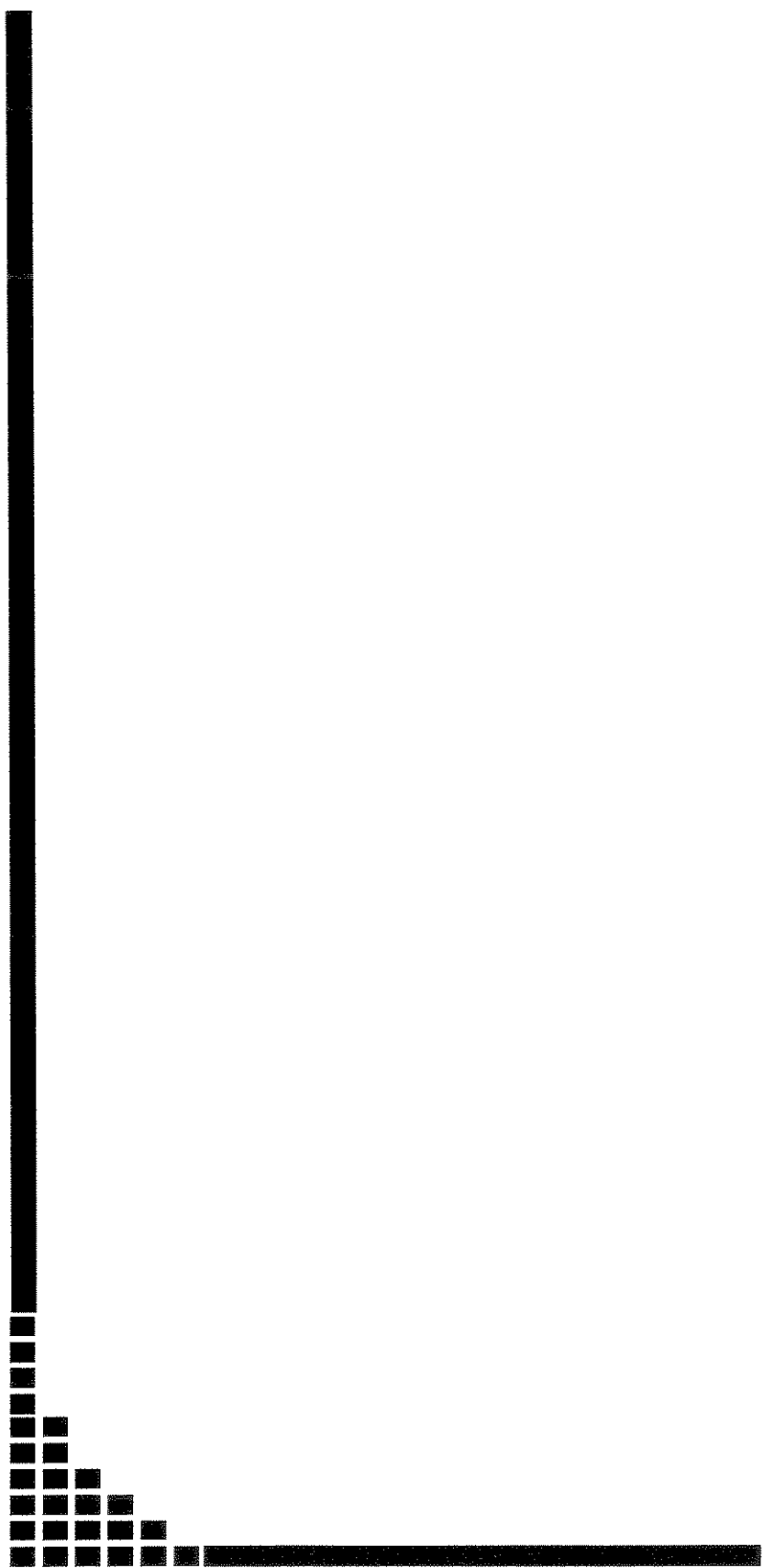
Esta hipótese é suportada pelo fato do paciente portador da mutação ser heterozigoto para β -talassemia, apresentando uma clínica intermediária atípica. Dados hematológicos e de DNA demonstram que o alelo para β -talassemia foi doado pela mãe, enquanto que o pai, normal para o gene da β -globina, foi o doador da mutação 12888. A interação do quadro talassêmico com a mutação em heterozigose no gene *AHSP* podem ser os responsáveis pelo quadro atípico da paciente.

Possivelmente o que estaria acontecendo nos eritrócitos do paciente em questão seria uma desestabilização da estrutura protéica de *AHSP*, levando a diminuição de formação de interações *AHSP*/ α -globina. As cadeias- α , como sugerido pelos ensaios em

cultura de células, necessitam da presença de *AHSP* para permanecerem estáveis até sua ligação com cadeias- β

Nossa hipótese perante a detecção desta mutação é de que como as cadeias- α não estão sendo estabilizadas por *AHSP* a quantidade de hemoglobina produzida diminui e a quantidade de deposição de cadeia- α aumenta, o que ocasionaria um quadro de anemia mais intensa do que a diagnosticada em traços talassêmicos, característica de quadro talassêmico intermediário.

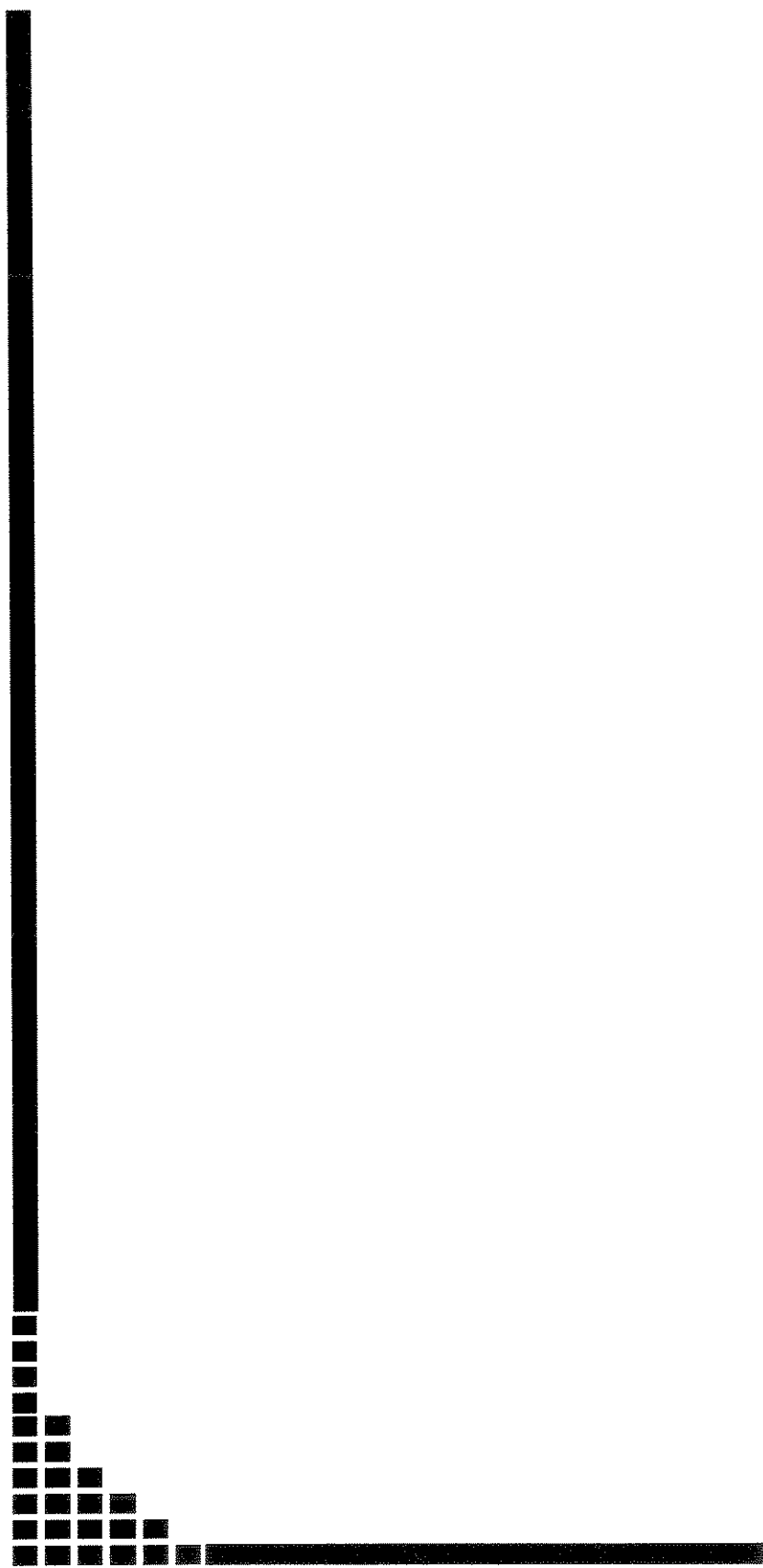
Acreditamos que os dados apresentados nesta tese são importantes por colaborarem na possível compreensão da estabilização de α -globinas para a formação normal de hemoglobinas e propõe dados base para a formulação de outros estudos para certificação da importância de *AHSP* na fisiopatologia da β -talassemia.



CONCLUSÕES

As conclusões que chegamos com este trabalho foram que:

1. *AHSP* está sendo expressa durante a diferenciação celular, possivelmente promovendo a estabilidade de cadeias- α para formação de hemoglobina, uma vez que em estágios celulares com alta síntese de α -globinas a expressão de *AHSP* também está aumentada e, quando a expressão de α -globinas é reduzida, reduzida também encontra-se a expressão de *AHSP*;
2. A expressão do gene *AHSP* em pacientes com β -talassemia maior e intermediária não parecem indicar que esta proteína possa ser um fator modulador de gravidade na doença, uma vez que a comparação da razão entre α -globina e *AHSP* entre talassemia intermediária e talassemia maior mostraram os mesmos níveis encontrados na análise da razão α -globina / *AHSP* comparando células mais jovens (eritroblastos policormatófilos) com células mais maduras (eritroblastos ortocromáticos), levando a hipótese que a diferença de expressão entre estes pacientes possa ocorrer pelo número aumentado de eritroblastos imaturos que pacientes com talassemia intermediária apresentam em função da expansão da medula óssea e, em alguns casos, ausência de baço;
3. *AHSP* apresenta SNPs que podem estar relacionados com a clínica de β -talassemias no grupo de pacientes analisados neste trabalho;
4. Alterações na estrutura protéica de *AHSP* sugerem que esta pode funcionar como um modulador de gravidade em β -talassemia, como demonstrado pela mutação 12888, a primeira mutação descrita no gene *AHSP*.



*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

ANTONIOU M., deBOER E., HABETS G., GROSVELD F. *The human β -globin gene contains multiple regulatory regions: identification of one promoter and two downstream enhancers.* **EMBO Journal**, 1988(7): 377-384.

BANK A. *The thalassemia syndrome.* **Blood**, 1978(51):369-384.

BUSTIN. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reactions assay.* **J. Mol. Endoc.**, 25: 169-193, 2000

CAPPELLINI, N., COHEN, A., ELEFHERIOUS, A., PIGA, A., PORTER, J. *Guidelines for the Clinical Management of Thalassemia.* **Thalassaemia International Federation (TIF)**, 2000, 111pp.

CICIDALLI G., KEREM H., RACHMILEWITS E.A. *Globin synthesis in severe and intermediate homozygous β -thalassemia in Israel.* **Ann. New York Acad. Sci.**, 1980 (344):132-140.

CODRINGTON J.F., LI H-W., KUTLAR F. et al. *Observations on the levels of HbA₂ in patients with different β -thalassemia mutations and a δ chain variant.* **Blood**, 1990 (76): 1246-1249.

COLLINS F.S., WEISSMAN S.M. *The molecular genetics of human hemoglobin.* **Process in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, 1984 (31): 315-465.

EMBURY, S.H., MILLER, J.A., DOZY, A.M., KAN, Y.W., CHAN, V. TODD, D. *Two different molecular organizations account for the single α -thalassemia-2 genotype.* **J. Clin. Invest.**, 1980, 66:1319-1325.

FIBACH, E. MANOR, D., OPPECHEIM, A and RACHAMILEWITZ, E.A. *Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid cultures.* **Blood**, 73: 100-103, 1989

FIBACH, E., BURKE, L.P., SCHECHTER, A.N., NOGUCHI, C., T. and RODGERS G.P. *Hydroxyurea increases fetal hemoglobin in cultures erythroid cells derived from normal individuals and patients with sickle cell anemia or β -thalassemia.* **Blood**, 81: 630-1635, 1993

GALLO E., MASSARO P., MINIERO R., DAVID D., TARELLA C. *The importance of the genetic picture and globin synthesis in determining the clinical and haematological features of thalassemia intermedia*. **Br. J. Haematol.**, 1979(41): 211-221.

GELL, D., KONG Y., EATON, S.A., WEISS, M.J., MACKAY, J.P. *Biophysical characterization of the alpha-globin binding protein AHSP*. **JBC**, 277(43): 40602, 2002

GILL F.M., KELLEHER J.F. *Beta-thalassemia major (Cooley's Anemia)*. In: Schwartz, E. (Ed.): **Hemoglobinopathies in Children**, PSG Publishing Company, Littleton Massachusetts, 1980, pp. 317-334.

GROSVELD F., VAN ASSENDELF G.B., BREAVES D.R., KOLLIAS G. *Position-independent, high-level expression of the human γ -globin gene in transgenic mice*. **Cell**, 1987 (51): 975-985.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R., *Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reactions*. **Bio/Technology**, 11: 1026-1030, 1993

HOFFMAN, R., BENZ, E.J., SHATTIL, A.J., FURIE B., COHEN, H.J. *Hematology- Basic Principles and Practice*. Churchill Livingstone Inc, 1991, pp. 252-300.

KATTAMIS, A.C., CAMASCHELLA, C., SILVERA, P., SURREY, S., FORTINA, P. *Human α -thalassemia syndromes: detection of molecular defects*. **Am. J. Hematol.**, 1996,53:81-91.

KIHM, A.J., KONG, Y., HONG, W., RUSSEL J.E., ROUDA, S., ADACHI, K., SIMON, M.C., BLOBEL, G.A., WEISS, M.J.: *An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin*. **Nature**. 417(6890): 758, 2002

KONG Y., KIHIM A.J., RUSSELL E., ADACHI K., HONG W., BLOBEL G.A., WEISS M.J. *Characterization of erythroid differentiation related factor (EDRF), a GATA-1-Regulated Molecular Chaperone for α -Globin protein*. **Blood**, 2001(98)11-1, 434a.

KULOZIK A.E., BAIL S., BELLAN-KOCH A. et al. *The proximal element of the β -globin locus control region is not functionally required in vivo*. **Journal of Clinical Investigation**, 1991 (87) 2142-2146.

MARTINS, CS, RAMALHO, AS, SONATI, MF, GONÇALVES, MS, COSTA,FF. *Molecular characterisation of beta-thalassemia heterozygotes in Brazil. J Med Genet.* 1993; 30(9): 797-798.

MEIJERINK, J., MANDIGERS, C., LOCHT, L.V., TÖNNISSEN, E., GOODSID, F. and RAEMAEEKERS J. *A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in Quantitative real-Time PCR. J. Mol. Diagnostics*, 3(2): 55, 2001

MIELE G., MANSON J., CLINTON M., *A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. Nature Medicine*, 2001(7)3: 361-364.

OLIVEIRA,H.P., **Hematologia Clínica. Princípios de fisiopatologia, estudo clínico, diagnóstico e orientação terapêutica das enfermidades do sangue no adulto e na criança.** 2ª ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 1983, 182-1888.

ÖNER R., ÖNER C., BIRBEN E., SÖZEN M., GÜMRÜK F., GÜRGEY A., ALTAY Ç. *β-Thalassaemia intermedia in a Turkish girl: homozygosity for G-A substitution at +22 relative to the β-globine cap site. British Journal of Haematology*, 2001(115): 90-94

ORKIN S.H. *GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. Blood*, 1992(80): 575-581.

OWENS, M.A. & LOREN, M.R. **Flow cytometry principles of clinical laboratory practice.** New York – EUA. Wiley Liss ed. 1995, 224pp.

PFAFFL, M.W.: *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucl. Acids research*, 29(9): 2003, 2001

PLONCZYNSKI M., HARDY C.L., SAFAYA S., HARRELL A., McCOY L., BRINSON A., AGWARANGBO L., STEINBERG M. *Induction of globin synthesis in K562 cells is associated with differential expression of transcription factor genes. Blood*, 1999(31):156-165.

POPE S.H., FIBACH E., SUN J., CHIN K., RODGERS G.P. *Two-phase liquid culture system models normal human adult erythropoiesis at the molecular level. Eur J Haematol*, 2000 (64) 292-303.

SALEH, A.W., DITS, A.J., GERBERS, A., VRIES, C., HILLEN, H.F.P., *Cytokines and soluble adhesion molecules in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. Acta Haematol.*, 100: 26-31, 1998.

SARGENT T.G., LLOYD J. *The Human γ -globin TATA and CACCC elements have key, distinct roles in suppressing β -globin gene expression in embryonic/fetal development. The Journal of Biological Chemistry*, 2001(276)45, 41817-41824.

SHAEFFER, JR. *Turnover of excess hemoglobin α -chains in β -thalassemic cells is ATP-dependent. The Journal of Biological Chemistry*, 1983(21)10, 13172-13177.

SHAEFFER, J.R. *ATP-dependent proteolysis of hemoglobin α -chains in β -thalassemic hemolysates is ubiquitin-dependent. The Journal of Biological Chemistry*, 1988(27)7, 13663-13669.

SHIRIHAI O.S., GREGORY T., YU C., ORKIN S.H., WEISS M.J. *ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. EMBO Journal*, 2000(19)11: 2492-2502.

STEINBERG, M.H., FORGET B.G., HIGGS, D.R., NAGEL, R.L. *Disorders of Hemoglobin. Genetic, Pathophysiology, and Clinical Management*, Cambridge University Press, 2001, pp 231-356.

THEIN S.L. *β -Thalassaemia. Bailliere's Clinical Haematology*, 1998(11)1: 91-126.

THEIN S.L., OLD J.M., WAINSCOT J.S. et al. *Population and genetic studies suggest a single origin for the Indian deletion β^0 thalassemia. British Journal of Haematology*, 1984 (57): 271-278.

VARAWALLA N.Y., OLD J.M., SARKAR R., et al. *The spectrum of β -thalassemia mutations on the Indian subcontinent: the basis for prenatal diagnosis. British Journal of Haematology*, 1991(78): 242-247.

WEATHEDRALL D.J. *Abnormal haemoglobins and thalassemia*. In: Hoofbrand, A.V., Brain, M.C, and Hirsh, J. (Eds): *Recent Advances in Hematology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1977, pp. 43-67

WEATHEDRALL D.J., CLEGG J.B. *The thalassemia syndrome*. 4nd Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2001

WEATHEDRALL D.J., CLEGG J.B. *The thalassemia syndrome*. 2nd Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.

WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., WOOD W.G., OLD J.M., HIGOS D.R., PRESLEY L., DARBRE P.D. *The clinical and molecular heterogeneity of thalassemia syndromes*. Ann. New York Acad. Sci., 1980 (344): 83-100.

WICKRAMASINGHE S.N., HUGHES M. *Ultrastructural studies of erythropoiesis in β -thalassaemia trait*. British Journal of Haematology, 1980(46): 401-407.



ANEXOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Projeto : “Estudo da expressão do gene *Ahsp* (*Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein*) na diferenciação eritróide em cultura e em pacientes com β -talassemia”

OBJETIVOS DO TRABALHO: Estudar o efeito do gene *AHSP* (Proteína estabilizadora de hemoglobina alfa), nos aspectos clínicos de pacientes com beta-talassemia;

JUSTIFICATIVA: Recentemente foi descoberto um gene novo, o *AHSP* , que parece poder modificar os sintomas da talassemia beta. Se isso for verdade, algumas pessoas, dependendo de alterações nesse gene, poderiam ter sintomas piores que as outras. Nesse projeto, nós pretendemos investigar se isso é verdade. Para isso, como você tem talassemia beta, estamos pedindo sua colaboração. Caso você não queira participar, não terá qualquer problema. Em nada será alterado o seu tratamento no Hemocentro e no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Caso você concorde em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine duas vias desse termo. Uma das vias será entregue a você.

Estou ciente de que para participar do estudo que me foi explicado, será coletado de 10 a 20 ml sangue periférico (mais ou menos 10 colheres de sopa). Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento. Estou ciente que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se alguma alteração for encontrada no meu material genético , os pesquisadores irão me explicar o que foi encontrado e o que isso significa. O meu material será guardado no laboratório e se alguma outra pesquisa sobre beta talassemia puder ser feita com esse material, primeiramente o estudo deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a aluna de Mestrado **Camila Oresco dos Santos (F: 3788-8611)**, pesquisadora responsável pelo estudo ou **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (F: 37888734)**, médico responsável pelo estudo, ambos do Hemocentro – UNICAMP. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do **Comitê de Ética em Pesquisa da FCM, UNICAMP, F: 37888936**. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Nome do paciente:.....

Idade:..... anos **RG:** **HC:**.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):..... **RG:**.....

Grau de parentesco:..... **Endereço:**.....

.....
Assinatura do paciente

.....
Assinatura do pesquisador legal

Campinas,...../...../.....



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Projeto : “Estudo da expressão do gene *Ahsp* (*Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein*) na diferenciação eritróide em cultura e em pacientes com β -talassemia”

OBJETIVOS DO TRABALHO: Estudar o efeito do gene *AHSP* (Proteína estabilizadora de hemoglobina alfa), nos aspectos clínicos de pacientes com beta-talassemia;

JUSTIFICATIVA: Recentemente foi descoberto um gene novo, o *AHSP*, que parece poder modificar os sintomas da talassemia beta. Se isso for verdade, algumas pessoas, dependendo de alterações nesse gene, poderiam ter sintomas piores que as outras. Nesse projeto, nós pretendemos investigar se isso é verdade. Para isso, como você que não tem talassemia beta, estamos pedindo sua colaboração para participação como controle nesta pesquisa. Caso você não queira participar, não terá qualquer problema. Em nada será alterado o seu tratamento no Hemocentro e no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Caso você concorde em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine duas vias desse termo. Uma das vias será entregue a você.

Estou ciente de que para participar do estudo que me foi explicado, será coletado de 10 a 20 ml sangue periférico (mais ou menos 10 colheres de sopa). Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento. Estou ciente que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se alguma alteração for encontrada no meu material genético, os pesquisadores irão me explicar o que foi encontrado e o que isso significa. O meu material será guardado no laboratório e se alguma outra pesquisa puder ser feita com esse material, primeiramente o estudo deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a aluna de Mestrado **Camila Oresco dos Santos (F: 3788-8611)**, pesquisadora responsável pelo estudo ou **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (F: 37888734)**, médico responsável pelo estudo, ambos do Hemocentro – UNICAMP. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM, UNICAMP, F: 37888936. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Nome:.....
Idade:..... anos RG: HC:
Endereço:.....
Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....
RG: Grau de parentesco: Endereço:

.....
Assinatura do paciente

.....
Assinatura do pesquisador legal

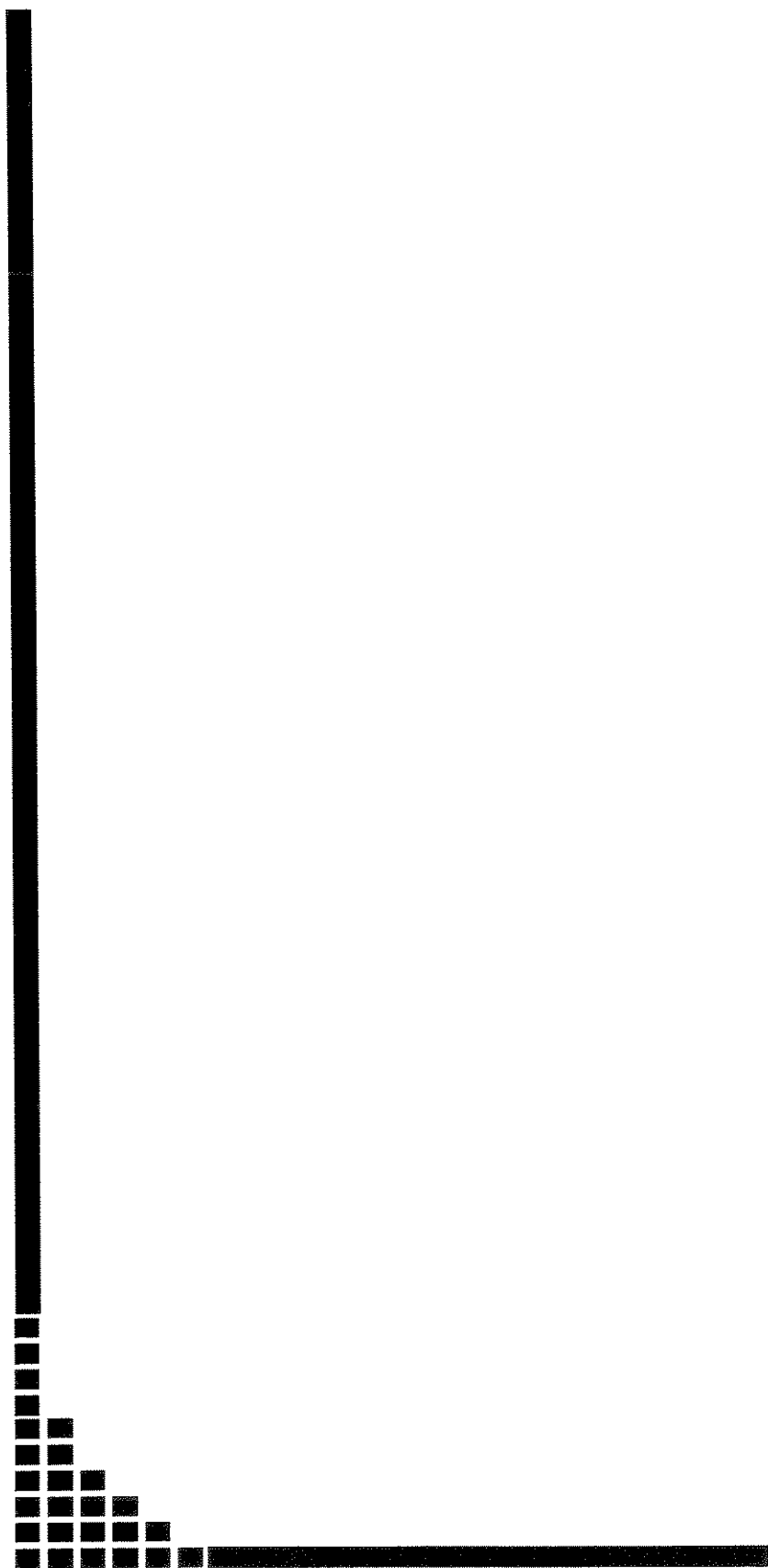
Campinas,...../...../.....

Nº	Genótipo	Fenótipo	Polimorfismos e Mutação				
			12347	12391	12895	12888	12991
1	CD39/CD39	B-T Intermediária					
3	CD39/N	B-T Maior					
2	IVS1-110/IVS1-6	B-T Intermediária					
3	CD39/IVS1-6	B-T Intermediária					
4	CD39/CD39	B-T Intermediária					
5	CD39/CD39	B-T Maior					
6	IVS1-110/IVS1-6	B-T Maior					
7	IVS1-110/+20	B-T Intermediária					
8	IVS1-1/IVS1-6	B-T Maior					
9	CD39/IVS1-1	B-T Maior					
10	CD39/IVS1-6	B-T Maior					
11	CD39/IVS1-6	B-T Maior					
12	IVS1-110/IVS1-6	B-T Maior					
13	IVS1-110/IVS1-6	B-T Maior					
14	IVS1-6/-87	B-T Intermediária					
15	CD39/CD39	B-T Maior					
16	CD36/IVS1-110	B-T Maior					
17	CD39/-110	B-T Maior					
18	CD39/IVS1-6	B-T Intermediária					
19	IVS1-6/IVS1-6	B-T Intermediária					
20	IVS1-6/IVS1-6	B-T Maior					
21	del. 4 bs cd 41/42	B-T Maior					
22	CD39/IVS1-110	B-T Maior					
23	CD39/CD39	B-T Maior					
24	CD39/IVS1-6	B-T Intermediária					
25	IVS1-110/IVS1-110	B-T Maior					
26	CD39/IVS1-110	B-T Maior					
27	CD39/CD39	B-T Maior					
28	CD39/IVS1-110	B-T Maior					
29	CD39/IVS1-111	B-T Maior					
30	CD39/CD39	B-T Maior					
31	CD39/CD39	B-T Maior					
32	CD39/IVS1-1	B-T Maior					
33	CD39/IVS1-110	B-T Maior					
34	CD39/CD39	B-T Maior					
35	CD39/IVS1-6	B-T Maior					
36	IVS1-110/IVS1-110	B-T Maior					

Legenda	
	s/ SNP
	homozigoto
	heterozigoto

Nº	Classificação Clínica	Polimorfismos				
		12347	12391	12895	12888	12991
1	Doador					
2	Doador					
3	Anemia Falciforme					
4	Doador					
5	Doador					
6	Doador					
7	Esferocitose Hereditária					
8	Doador					
9	Anemia Falciforme					
10	Anemia Falciforme					
11	Doador					
12	Doador					
13	Doador					
14	Doador					
15	Doador					
16	Doador					
17	Doador					
18	Doador					
19	Doador					
20	Doador					
21	Doador					
22	Doador					
23	Doador					
24	Doador					
25	Doador					
26	Doador					
27	Esferocitose Hereditária					
28	Esferocitose Hereditária					
29	Esferocitose Hereditária					
30	Esferocitose Hereditária					
31	Esferocitose Hereditária					
32	Esferocitose Hereditária					

Legenda	
	s/ SNP
	homozigoto
	heterozigoto



APÊNDICES

Expression of α -hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis

Camila Oresco dos Santos, Adriana S. S. Duarte,
Sara Teresinha Olalla Saad, and Fernando Ferreira Costa

State University of Campinas— Center of Hemotherapy and Hematology, Campinas, São Paulo, Brazil

(Received 11 September 2003; revised 14 October 2003; accepted 5 November 2003)

α -Hemoglobin stabilizing protein (AHSP) is an abundant, erythroid-specific protein that forms a stable complex with free α -hemoglobin but not with β -hemoglobin or hemoglobin A. As such, AHSP is required for normal erythropoiesis, probably acting by blocking the deleterious effects of free α -hemoglobin precipitation. In order to study the levels of expression of the AHSP gene during the different phases of erythropoiesis, we carried out a two-phase liquid culture of erythroid cells and real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood from control volunteers was cultured with erythropoietin to stimulate differentiation. The different stages of erythropoiesis were confirmed by morphologic and flow cytometric analysis. The results showed a progressive increase in AHSP gene expression following the expression of α -globin gene, during maturation of the red blood cell precursors, confirming the probable important function of this protein during normal erythropoiesis. © 2004 International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Inc.

Miele et al. [1] described the expression of a mouse gene (named erythroid differentiation-related factor [*EDRF*]) in hematopoietic cells. Kihm et al. [2] reported that this gene produces a protein that serves as a molecular chaperone for free α -globin, providing a potential compensatory mechanism through erythroid precursors to neutralize the deleterious effects of α -globin precipitation in mouse. This protein was named α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP).

AHSP specifically binds to the α -chains of hemoglobin but not to the β -chain or to tetrameric hemoglobin. Consistent with a role for AHSP in regulating coordinated globin expression, gene targeting studies in mice showed that ablation of AHSP function leads to erythrocyte abnormalities that also are observed in β -thalassemia [3].

When present in excess over β -globin, its normal binding partner, α -globin can have severe cytotoxic effects that are the major deleterious effects contributing to the pathophysiology of β -thalassemia. Conversely, studies in mice [3] have shown that AHSP may act as a chaperone to prevent the harmful aggregation of α -globin during normal erythroid cell development and in diseases of globin-chain imbalance. However, the expression of AHSP gene in humans during erythropoiesis is unknown.

In the present study, using two-phase liquid culture of erythroid cells we demonstrate a coordinate expression of AHSP and α -globin mRNA during erythroid differentiation.

Materials and methods

Two-phase liquid culture of erythroid cells

Blood from normal volunteers was cultured using a two-phase liquid culture procedure, as described in the following [4,5]. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood samples by centrifugation on a gradient of Ficoll-Hypaque and cultured for 7 days (phase I) in IMDM medium (Gibco) supplemented with 20% fetal calf serum (Gibco), 1 μ g/mL cyclosporin A (Sandoz), and 10% conditioned medium collected from bladder carcinoma 5637 cultures. Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and 92% humidity. After 7 days, nonadherent cells were recultured in phase II medium, IMDM supplemented with 30% fetal calf serum (Gibco), 1% deionized bovine serum albumin (BSA; Sigma), 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol (Sigma), 1.5 nmol/L glutamine (Gibco), 1 U/mL iron saturated transferrin (Sigma), 10⁻⁶ M dexamethasone, 5 ng/mL human stem cell factor (SCF; Calbiochem), 1 U/mL human recombinant erythropoietin (Epo; Cilag), 2.5 μ g/mL Fungizone (Gibco), 50 μ g/mL streptomycin (Gibco), and 25 μ g/mL glutamycin (Gibco). Cell samples were collected from phase II cultures at 0, 4, 5, 7, 8, 10, 11, and 13 days to evaluate the cell numbers and viability by trypan blue exclusion for future total RNA extraction and for flow cytometric and morphologic analyses. For morphologic cell analyses, cytopsin slides were prepared wet,

Offprint requests to: Fernando F. Costa, M.D., Ph.D., Hemocentro—UNICAMP, State University of Campinas, R. Carlos Chagas, no. 480, CEP: 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil; E-mail: ferreira@unicamp.br

stained with Leishman, and examined with an Eclipse E-600 microscopic (Nikon) using the software Image Pro-Express 4.0 (Media Cybernetic, LP) to morphologically analyze the cell differentiation stage. Expression of cell surface markers using flow cytometry was evaluated by dual staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-transferrin receptor and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-glycophorin A (Dako, Glostrup, Denmark) for 30 minutes at 4°C, in the dark. The cells were washed with phosphate-buffered saline and suspended in 1% paraformaldehyde prior to analysis. Data from 10,000 events were acquired for analysis using Cell Quest Software (Becton-Dickinson). Nonspecific staining was established from the corresponding isotype control and subtracted from the corresponding percentage positive population.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA extraction was performed using Trizol reagent (Invitrogen), a monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate that improves cell lysis and dissolves cell components. Samples of 5×10^6 cells were pelleted and resuspended in 1 mL of Trizol and incubated for 5 minutes at room temperature. Chilled chloroform (0.5 mL) was added to the suspension, which was incubated for 5 minutes at room temperature and centrifuged at 13,500 rpm to achieve phase separation (organic phase from aqueous phase). The aqueous phase, containing the RNA, was transferred to a new Eppendorf tube, and RNA was recovered by precipitation with isopropyl alcohol. The RNA integrities were analyzed by electrophoresis in 1.2% denaturing agarose gel and the RNA concentration was quantified using a GeneQuant UV spectrophotometer (Pharmacia).

Five-microgram RNA samples were incubated with 1 U DNaseI (Invitrogen) for 15 minutes at room temperature, and EDTA was added to a final concentration of 2 mM to stop the reaction. The enzyme was subsequently inactivated for 10 minutes at 65°C. The DNaseI-treated RNA samples were reverse transcribed with 200 U SuperScript II (Invitrogen) for 50 minutes at 42°C. Two units of RNase H (Invitrogen) were subsequently added, and the samples were incubated at 37°C for 20 minutes. The cDNA samples were quantified using a GeneQuant UV spectrophotometer (Pharmacia).

Real-time polymerase chain reaction

Real-time polymerase chain reaction (PCR) using SYBR Green dye is based on the direct detection of the PCR product, as monitored by measuring the increase in fluorescence caused by the binding of SYBR Green dye to double-stranded DNA. An increased amount of PCR product will result in an increase in SYBR Green I dye fluorescence, which is collected during the course of the reaction. The resulting real-time analysis enables a more accurate quantification of nucleic acids [6–10].

Quantification of *AHSP* gene expression and α -globin gene expression by real-time PCR was performed with a 5700 Applied Biosystems system. Amplification of *AHSP* was performed with the Master Mix SYBR Green I reagent (Applied Biosystems). Quantification of β -actin expression was used as an internal control for the amount and quality of cDNA.

To quantify gene expression, a mathematical model, using calibration data ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$), was used. For cell culture studies, expression measured at 0 (zero) hours was used for calibration data. For this mathematical model, determination of the crossing threshold (C_t) was necessary for each transcript. C_t was defined as the point at which the fluorescence rises appreciably above the background

fluorescence. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for nonspecific amplification. Two replicas were run on the plate for each sample, and each sample was run twice, independently.

Synthetic oligonucleotide primers were designed using Primer-Express software (Applied Biosystems) and synthesized by Invitrogen. The sequences of the primers are listed in Table 1.

All samples were assayed in duplicate in a semi-skirted PCR 96-well reaction plate (Sorenson, BioScience Inc.) with eight-strip PCR tube caps (SSI) and performed in a 25- μ L volume containing 20-ng cDNA, 12.5- μ L SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems), 1.7 μ M *AHSP* primer, 1.2 μ M β -actin, and 1.2 μ M α -globin primer. To confirm accuracy and reproducibility of real-time PCR, intra-assay precision was calculated according to the equation: $E^{(-1/\text{slope})}$, where the PCR efficiency was calculated [11,12]. The investigated transcripts showed high real-time PCR efficiency rates: *AHSP* 96.5%; α -globin 94.5%; and β -actin 100% in the investigation range of 500 ng to 2 ng cDNA input ($n = 2$) with high linearity (Pearson correlation coefficient $r > 0.95$).

Statistical analysis

The nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to evaluate gene expression [13].

Results

Two-phase liquid culture of erythroid cells

The culture procedure used was separated into two phases. In phase I, peripheral blood mononuclear cells were cultured for 1 week in the presence of a combination of growth factors, but without Epo. In phase II, following exposure to Epo, the cells proliferated and matured within 2 weeks into orthochromatic cells.

Cytospin preparations of cells at various stages of phase II are depicted in Figure 1A. Proerythroblasts begin to be discernible on days 3 to 4 as large, round, smooth cells that, following staining with Leishman, demonstrate deep blue cytoplasm and a large central nucleus. As these cells multiply they form clusters. During the intermediate phases, cells gradually give way to an increasing proportion of basophilic erythroblasts (days 5–7) and polychromatic and orthochromatic cells (days 8–10). In late phase II (days 11–14), erythroid cells continue to proliferate and mature into orthochromatic cells.

Table 1. Primer sequences for performance of real-time quantitative PCR

Name	Primer sequence
α -globins-RT-F	5'-TGGTCCCCACAGACTCAGAGA -3'
α -globins-RT-R	5'-CGGCCTTGA CGTTGGTCTTT -3'
β -actin-RT-F	5'-TCACCGAGCGCGGCT -3'
β -actin-RT-R	5'-TAATGTCACGCACGATTTC -3'
<i>AHSP</i> -RT-F	5'-TGATCCTCTCGTCTCTGAAGAAGAC -3'
<i>AHSP</i> -RT-R	5'-GCTGCCTGTAATAGTTGATGTAGAAGTT -3'

The differentiation in phase II was quantitatively determined by flow cytometry using an FITC-conjugated anti-transferrin receptor antibody and a PE-conjugated anti-glycophorin A antibody (Fig. 1B). Results demonstrated that cell differentiation toward the erythroid lineage occurred

during the culture, as reflected by the increase in the percentage of transferrin receptor positive cells and percentage of glycophorin A-positive cells (0.03% and 0.11% on day 0, respectively, increasing to 65.20% and 14.94% on day 14, respectively), as previously described [4,5].

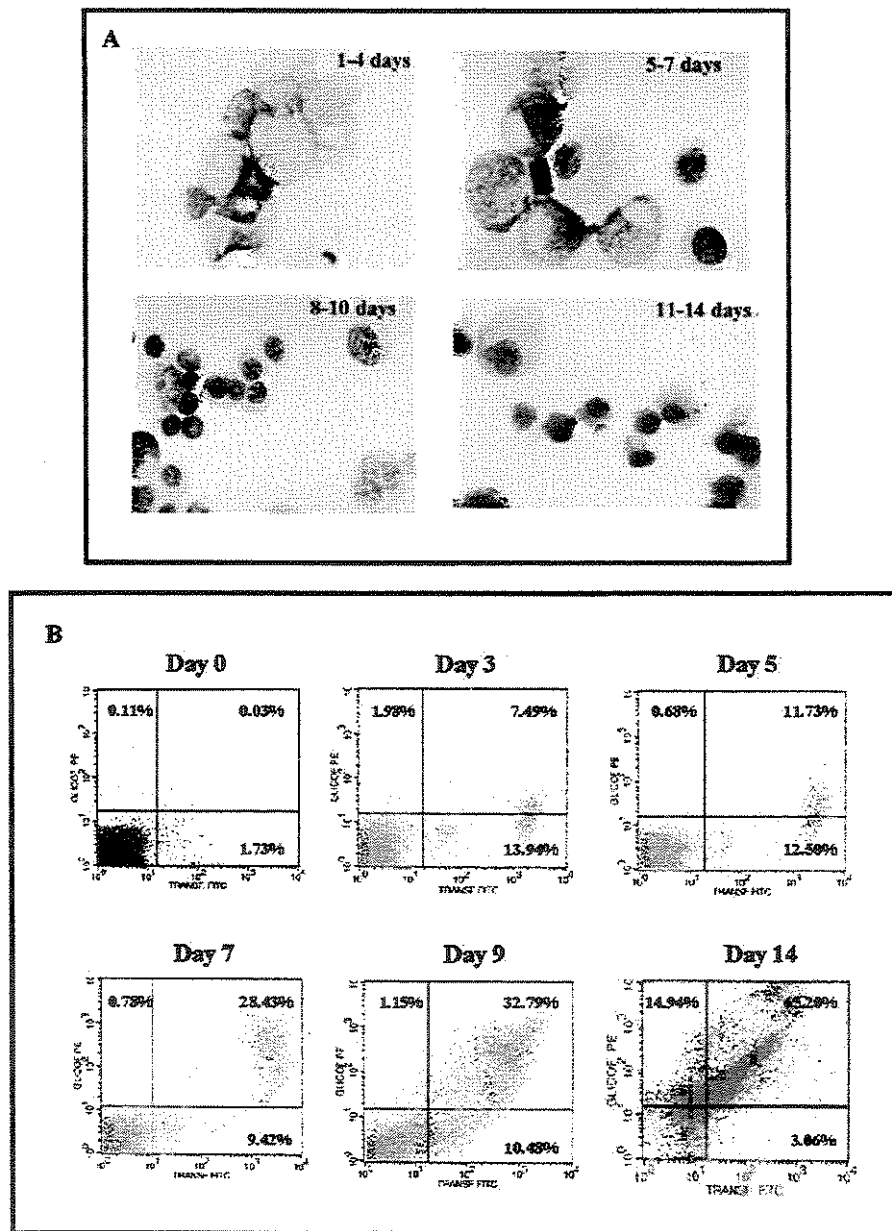


Figure 1. Two-phase liquid culture method used for culturing human erythroid precursor cells. Mononuclear cells were isolated from human peripheral blood and cultured for 7 days in phase I medium containing fetal calf serum, cyclosporin A, and growth factors. Cells were then washed and cultured in phase II medium containing erythropoietin. (A) Cells taken from phase II culture on days 0, 4, 5, 7, 8, 10, 11, and 13 ($\times 1000$) were stained with Leishman and analyzed with an Eclipse E-600 microscope (Nikon), using the software Image Pro-Express 4.0 (Media Cybernetic, LP) to determine the cell stage by morphology. In the initial phase (days 0–4), proerythroblast cells predominate. Intermediate phases (days 5–7) demonstrate the presence of basophilic erythroblasts; On days 8–10, the presence of polychromatic and orthochromatic cells is observed. In the late phase (days 11–14), orthochromatic cells predominate. (B) Representative flow cytometric analysis of cells obtained during phase II culture. Cell differentiation was determined using FITC-conjugated anti-transferrin receptor antibody (x-axis) and PE-conjugated anti-glycophorin A antibody (y-axis). The percentage of transferrin-positive cells and glycophorin A-positive cells demonstrates the cell differentiation during phase II culture for each sample.

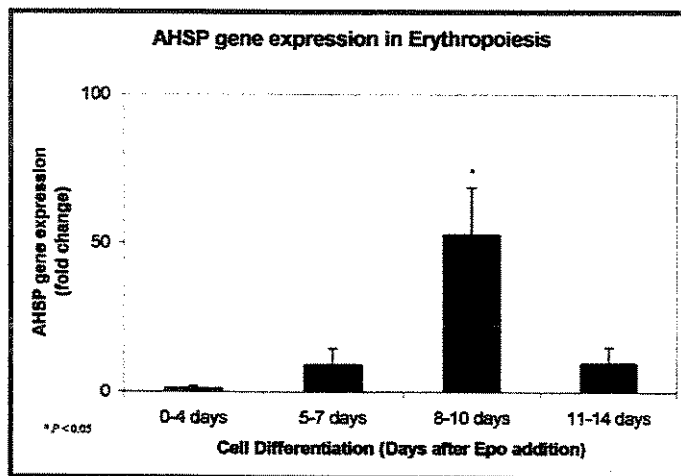


Figure 2. *AHSP* gene expression during erythroid differentiation in two-phase cell culture. The higher levels of expression ($p < 0.05$) were detected predominantly in polychromatic and orthochromatic erythroid cells (8–10 days after Epo addition). The assay was performed in a 25- μ L volume containing 20-ng cDNA, 12.5- μ L SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems), and the following primer concentrations: 1.7 μ M *AHSP* primer and 1.2 μ M β -actin primer.

Gene expression during erythroid differentiation in two-phase cell culture

To quantify the levels of expression during erythropoiesis, blood samples obtained from volunteers were submitted to two-phase cell culture with Epo to stimulate cell differentiation ($n = 5$). As described, morphologic and flow cytometric studies (Fig. 1) were used to determine differentiation stages using anti-transferrin receptor and anti-glycophorin A antibodies.

The results indicated increasing expression of the *AHSP* gene (Fig. 2) and of the α -globin gene (Fig. 3) during

cell maturation ($p < 0.05$). The highest expression was observed during the polychromatic and orthochromatic stages (8–10 days after Epo addition), followed by a decrease in expression in more mature cells (11–14 days after Epo addition).

The *AHSP*/ α -globin ratio was calculated to confirm whether there is a correlation between *AHSP* gene expression and α -globin gene expression (Fig. 4). The results indicated that expression of the *AHSP* gene is related to the level of expression of α -globins and that the ratio of *AHSP*/ α -globin gene expression is similar during erythroid development, with a slight, but not significant, decrease during the later stages of differentiation ($p = 0.3$).

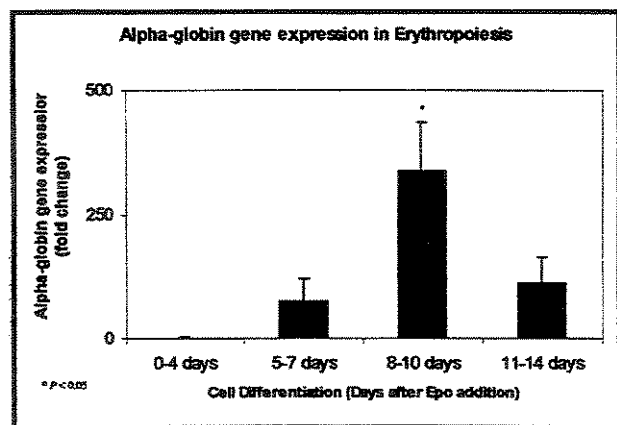


Figure 3. α -Globin gene expression during erythroid differentiation in two-phase cell culture. The higher levels of expression ($p = 0.05$) were detected predominantly in polychromatic and orthochromatic erythroid cells (8–10 days after Epo addition). The assay was performed in a 25- μ L volume containing 20-ng cDNA, 12.5- μ L SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems), and the following primer concentrations: 1.2 μ M α -globin primer and 1.2 μ M β -actin primer.

Discussion and Conclusion

Lower levels of β -globin production in β -thalassemia with normal synthesis of α -globin result in an imbalance in globin chain synthesis. Free α -globin chains are highly unstable and readily precipitate, damaging membrane structures and triggering the apoptotic cell death of erythroid precursors. The effect of unregulated expression of individual globin chains may be severe; consequently, it has long been thought that additional factors within the cell may assist in the processing of the free globin chains and their assembly into mature hemoglobin [14].

The identification of any such factor proved elusive for a long time. However, it has recently been shown that the *AHSP* gene is an erythroid-specific molecular chaperone for free α -hemoglobin in mice [3]. Data presented here strongly indicate that *AHSP* gene expression, in human erythroid cells, is related to α -globin gene expression.

To analyze the expression of *AHSP* gene during erythropoiesis, a two-phase liquid culture system was carried out

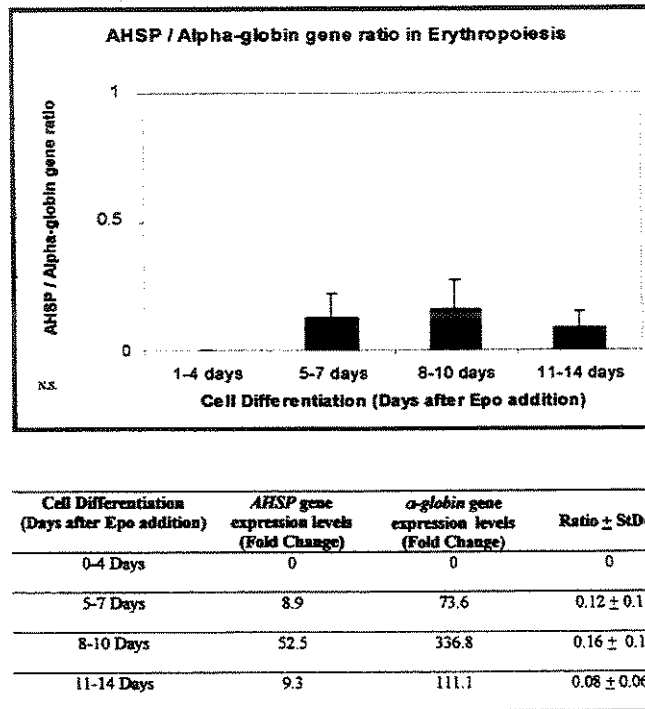


Figure 4. AHSP gene/ α -globin gene expression ratio in erythropoiesis. Graph and table show that the ratio of AHSP gene/ α -globin gene was not significantly different during erythropoiesis ($p = 0.3$).

[4,5]. This technique is based on two stages. The first stage induces the proliferation of hematopoietic precursors; the second stage, following addition of Epo, stimulates erythropoiesis. Several samples were collected at differentiation to analyze gene expression during distinct cell stages of human erythropoiesis.

The pattern of AHSP gene expression during human erythropoiesis indicates increasing levels of expression during cell differentiation, the highest expression at the stage where hemoglobin synthesis is more intense. A reduction in expression levels occurs when the cells lose their nuclear function and hemoglobin synthesis is reduced. α -Globin gene expression in these cells occurred with the same pattern. Previous data clearly showed that AHSP protein binds to α -globin chains but not to β -globin chains or to tetrameric hemoglobin [2].

These findings suggest that AHSP may have an important role in normal erythropoiesis by stabilizing α -globin. The data presented herein indicate that, in normal erythropoiesis, the ratio of AHSP/ α -globin gene expression probably is conserved during all stages of erythropoiesis. Determination of the ratio of AHSP/ α -globin gene expression during all stages of erythroid development may provide a useful tool to study the possible abnormalities of the expression of this gene in hemoglobinopathies.

Most cellular proteins in eukaryotic cells are targets for degradation by the 26S proteasome, a eukaryotic ATP-dependent protease, usually after they have been covalently

attached to ubiquitin in the form of a polyubiquitin chain. Proteasome functioned as a degradation signal, preventing the accumulation of abnormal protein and the formation of toxic inclusion bodies, followed by cell death [15]. Some studies have shown that an ATP-dependent system, in association with the presence of ubiquitins, is required for proteolysis of α -chains in β -thalassemia hemolysates [16,17]. AHSP is a molecular chaperone and a member of the small heat shock protein family (sHSP), probably leading free α -globins to proteolysis by an ATP-dependent protease system. Our data contribute to the hypothesis that AHSP may play an important role in the pathophysiology of β -thalassemia, decreasing ineffective erythropoiesis caused by the precipitation of free α -globin. Furthermore, the procedures described here may represent a valuable tool for study of the action of this protein as a possible additional factor interfering in the clinical evolution of these patients.

Acknowledgment

The authors thank FAPESP and CAPES for financial support. The authors also thank Dr. Nicola Conran for reviewing the manuscript.

References

1. Miele G, Manson J, Clinton M. A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med*. 2001;7:361.

2. Kihm AJ, Kong Y, Hong W, et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free α -haemoglobin. *Nature*. 2002;417:758.
3. Gell D, Kong Y, Eaton SA, Weiss MJ, Mackay JP. Biophysical characterization of the α -globin binding protein AHSP. *J Biol Chem*. 2002;277:40602.
4. Pope SH, Fibach E, Sun J, et al. Two-phase liquid culture system models normal human adult erythropoiesis at the molecular level. *Eur J Haematol*. 2000;64:292.
5. Kollia P, Fibach E, Najjar SM, et al. Modifications of RNA processing modulate the expression of hemoglobin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:5693.
6. Smith RD, Li J, Noguchi CT, et al. Quantitative PCR analysis of HBF inducers in primary human adult erythroid cells. *Blood*. 2000;95:863.
7. Deprez RHL, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, et al. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depend on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem*. 2002;307:63.
8. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reactions assay. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:169.
9. Higuchi R, Fickler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993;11:1026.
10. Sun CF, Lee CH, Cheng SW, et al. Real-time quantitative PCR analysis for α -thalassaemia-1 of Southeast Asian type deletion in Taiwan. *Clin. Genet*. 2001;60:305.
11. Pfaffi MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res*. 2001;29:2003.
12. Meijerink J, Mandigers C, Locht LV, et al. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn*. 2001;3:55.
13. Conover WJ. *Practical Non-parametric Statistic*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1980.
14. Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, et al. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1987.
15. Murata S, Chiba T, Tanaka K. CHIP: a quality-control E3 ligase colg with molecular chaperones. *J Biol Cell Biol*. 2003;35:572.
16. Shaeffer JR. Turnover of excess hemoglobin α -chains in β -thalassemic cells is ATP-dependent. *J Biol Chem*. 1983;258:13172.
17. Shaeffer JR. ATP-dependent proteolysis of hemoglobin α -chains in β -thalassemic hemolysates is ubiquitin-dependent. *J Biol Chem*. 1988;263:13663.