

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

AÍDA GOMES DE FREITAS

**Estudo do gene AHSP (*Alpha Haemoglobin Stabilizing
Protein*) em células eritropoéticas**

Campinas - SP

2005

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AÍDA GOMES DE FREITAS

Estudo do gene AHSP (*Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein*) em células eritropoéticas

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 concentração Medicina Experimental.

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

Campinas - SP

2005

ii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F884e Freitas, Aída Gomes de
Estudo do gene AHSP (*Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein*)
em células eritropoéticas / Aída Gomes de Freitas. Campinas, SP :
[s.n.], 2005.

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

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

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	F884e
V	EX
TOMBO BC/	64198
PROC.	16.P.00076.D.5
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	13/06/05
Nº CPD	

Bibid: 35 2319

À minha mãe, Dionir Buarque de Gusmão Freitas por
todo seu amor, apoio e sacrifício e pelas lições de vida que
espero conservar.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fernando Ferreira Costa pela orientação, paciência e oportunidade concedida para a realização desta pesquisa.

À Camila Oresco pelo seu apoio e acompanhamento desde o início do trabalho.

À Dulcinéia Martins de Albuquerque, um exemplo de eficiência, disposição, bondade e carinho, que me fez continuar quando nada mais parecia funcionar.

À Adriana Duarte, Carolina Lanaro e Flávia Pinho pela amizade, compaixão e ajuda inestimáveis para a realização da parte experimental.

À Eliane por não me “dar o peixe”, mas, querer me “ensinar a pescar”.

À Ângela e Ártemis pelas palavras de compreensão e encorajamento.

À Denise Souza por dar o sangue pelo meu trabalho, literalmente.

À Nicola pela revisão do texto e por sua simpatia.

À Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo pela oportunidade e incentivo iniciais.

Às amigas Renata e Sílvia pelos momentos de descontração e amizade.

Aos amigos do laboratório Anderson, Andréia, André, Bárbara, Camila Almeida, Cecília, Danilo, Denis, Dilmara, Flávia Costa, Flávia Leonardo, Gustavo, Heloísa, Hέλvia, Lena, Luciana Hollanda, Luciana Moreira, Marcelo, Manoela, Marcos André, Michele, Patrícia Fávoro, Patrícia J. Frascareli, Raquel, Samuel, Sheley, Tarcísio, Tereza Sueko, Tiago Ferraz, Tiago Gomes, Ucha e todos aqueles que me apoiaram, instruíram ou contribuíram de alguma forma para tornar o laboratório um ambiente mais agradável.

Aos profissionais dos Laboratórios de Marcadores Celulares e de Rotinas Hematológicas do Hemocentro.

Aos profissionais do Apoio didático, do Setor de Recepção e Segurança e da Central de Esterilização de Materiais do Hemocentro.

À Denise do Setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas.

A minha irmã Adriana por todo o seu apoio, carinho e por acreditar em mim.

Aos meus amigos da república Beraca: Adriana, Ana Carolina, Clara, Débora, Marcos, Mariana, Mírian Costa, Miriam Marcatto, Natália, Kesia, Regiane e Silvana pelo amor e amizade que permanecerão para sempre.

Ao Ralph e à Sylvia, e toda a sua maravilhosa família: William, Juliana, Marcos, Mitzy, Erick, Andréa e Alex, que por amor cristão e bondade deram-me um verdadeiro lar em Campinas.

Ao meu querido Marco que surgiu de repente em minha vida para estar ao meu lado em um momento tão difícil, sempre com palavras de incentivo e carinho.

A Deus principalmente, por tudo o que tem feito em minha vida e por tudo o que ainda fará.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que viabilizaram o desenvolvimento desta pesquisa.

"Esta é a verdadeira alegria da vida: ser usado por um propósito reconhecido por você mesmo como sendo digno".

(George Bernard Shaw)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1. SILENCIAMENTO GÊNICO POR INTERFERÊNCIA DE RNA	26
1.1. <i>Construção do vetor de expressão contendo a seqüência interferente</i>	26
1.1.1. Síntese das fitas de dsRNA	26
1.1.2. Anelamento dos oligonucleotídeos por hibridização	27
1.1.3. Clonagem do dsRNA no vetor de expressão	29
1.2. <i>Transformação</i>	30
1.3. <i>Extração do DNA plasmidial</i>	30
1.4. <i>Reação de PCR para confirmação da construção</i>	31
1.5. <i>Seqüenciamento de DNA</i>	32
1.6. <i>Extração de DNA plasmidial em larga escala (Maxi-Prep)</i>	33
1.7. <i>Cultura de células da linhagem K562 com o RNA interferente</i>	34
1.7.1. <i>Transfecção</i>	35
2. PROLIFERAÇÃO E MATURAÇÃO DOS PROGENITORES ERITRÓIDES HUMANOS EM CULTURA LÍQUIDA DE DUAS FASES.....	36
3. CITOMETRIA DE FLUXO	39
3.1. <i>Quantificação de células contendo HbF</i>	39
3.2. <i>Análise do padrão dos marcadores de superfície de membrana glicoforina A e receptor de transferrina</i>	40
4. EXTRAÇÃO DE RNA.....	40
4.1. <i>Extração de RNA da cultura de células de linhagem K562</i>	40
4.2. <i>Extração de RNA da cultura líquida de duas fases dos progenitores eritróides</i> ...	41
5. SÍNTESE DNA COMPLEMENTAR (cDNA).....	42
6. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL – “REAL-TIME PCR”	43
RESULTADOS	49
1. HIBRIDIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	50
2. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	50
3. REAÇÃO DE PCR PARA VERIFICAÇÃO DA INSERÇÃO DA MOLÉCULA INTERFERENTE NO PLASMÍDIO.....	51
4. SEQUENCIAMENTO DA MOLÉCULA INTERFERENTE.....	51
5. ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA NA EXPRESSÃO DO GENE AHSP	52
5.1. <i>Cultura de células de linhagem K562</i>	52
6. SEQUENCIAMENTO DO GENE AHSP	54
7. CULTURA LÍQUIDA DE DUAS FASES DOS PROGENITORES ERITRÓIDES	54
7.1. <i>Análise da expressão gênica durante a diferenciação eritróide</i>	55
8. QUANTIFICAÇÃO DE HbF POR CITOMETRIA DE FLUXO	56

8.1. <i>Cultura de células de linhagem K562</i>	56
9. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR DURANTE A DIFERENCIAÇÃO ERITRÓIDE.....	57
10. EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE GLICOFORINA A E RECEPTOR DE TRANSFERRINA ..	58
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AHSP	<i>Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDNA	DNA complementar
CHCl₃	Clorofórmio
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CO₂	Dióxido de carbono
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxiribonucleotídeos trifosfato
dsRNA	RNA de dupla fita
EDRF	<i>Erythroid Differentiation-Related Factor</i>
EIF2α	Subunidade α do fator iniciador da tradução
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fe⁺²	Ferro
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HbA	Hemoglobina Adulta
HbA₂	Hemoglobina Adulta tipo 2
HbF	Hemoglobina Fetal
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro

NaOH	Hidróxido de Sódio
O₂	Oxigênio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PKR	<i>Protein Kinase Responsive</i>
RNAi	Interferência de RNA
RPM	Rotações Por Minuto
RISC	<i>RNAi-Induced Silencing Complex</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TM	<i>Temperature Melting</i>
Vs	<i>Versus</i>
ΔCT	Ct do gene alvo menos Ct do gene endógeno
ΔΔCT	ΔCT da amostra alvo menos ΔCT da amostra referência
2^{-ΔΔCT}	Fórmula aritmética para quantificação em PCR em tempo real

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

FIGURAS

FIGURA 1 - DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO NORMAL DAS CADEIAS GLOBÍNICAS.	18
FIGURA 2 - MECANISMO DE AÇÃO DA AHSP.	20
FIGURA 3 - SEQUÊNCIA GÊNICA DO AHSP.	28
FIGURA 4 - VETOR DE EXPRESSÃO PSILENCER 2.0-U6.	29
FIGURA 5 - MÉTODO DE CULTURA LÍQUIDA EM DUAS FASES DAS CÉLULAS PRECURSORAS ERITRÓIDES.	38
FIGURA 6 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.	46
FIGURA 7 - CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.	48
FIGURA 8 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10% DOS PRIMERS HIBRIDIZADOS.	50
FIGURA 9 - VISUALIZAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM GEL DE AGAROSE 2%.	50
FIGURA 10 - CONFIRMAÇÃO DE INSERÇÃO DA MOLÉCULA INTERFERENTE NO PLASMÍDIO ATRAVÉS DA PCR.	51
FIGURA 11 - SEQUENCIAMENTO DA MOLÉCULA INTERFERENTE.	51
FIGURA 12 - SEQUENCIAMENTO DO ÉXON 3 DO GENE AHSP.	55
FIGURA 13 - ELETROFORESE DA AMOSTRA DE RNA TOTAL EM GEL DE AGAROSE DENATURANTE.	56
FIGURA 14 - CÉLULAS ERITRÓIDES EM DIFERENTES TEMPOS DA FASE II DA CULTURA.	58

TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA FORMAR O DSRNA.	26
TABELA 2 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS NA PCR E SEQUENCIAMENTO PARA CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO.	32
TABELA 3 - PRIMERS UTILIZADOS PARA A CONFIRMAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA.	43
TABELA 4 - SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS NA PCR EM TEMPO REAL.	44
TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS PELA PCR EM TEMPO REAL E EFICIÊNCIA DAS REAÇÕES.	45
TABELA 6 - DADOS ADQUIRIDOS NO CITÔMETRO DE FLUXO.	56

GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE AHSP DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM K562.	52
GRÁFICO 2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE AHSP DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM K562.	53
GRÁFICO 3 - RAZÃO DA EXPRESSÃO ENTRE OS GENES AHSP E ALFA-GLOBINA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO ERITRÓIDE.	55
GRÁFICO 4 - EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE MEMBRANA POR CITOMETRIA DE FLUXO.	56

GRÁFICO 5 - CITOMETRIA DE FLUXO DE PRECURSORES ERITRÓIDES NO TEMPO 0 HORA.....	59
GRÁFICO 6 - CITOMETRIA DE FLUXO DE PRECURSORES ERITRÓIDES NO TEMPO 72 HORAS.	60
GRÁFICO 7 - CITOMETRIA DE FLUXO DE PRECURSORES ERITRÓIDES NO TEMPO 144 HORAS.	61
GRÁFICO 8 - CITOMETRIA DE FLUXO DE PRECURSORES ERITRÓIDES NO TEMPO 192 HORAS.	62
GRÁFICO 9 - CITOMETRIA DE FLUXO DE PRECURSORES ERITRÓIDES NO TEMPO 240 HORAS.	63
GRÁFICO 10 - CITOMETRIA DE FLUXO DE PRECURSORES ERITRÓIDES NO TEMPO 312 HORAS.	69

As síndromes talassêmicas constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas por mutações que afetam a síntese de uma ou mais cadeias globínicas, designadas de acordo com o tipo de cadeia cuja síntese está prejudicada. Nas β -talassemias ocorre supressão parcial ou total das cadeias β , o que provoca o excesso de subunidades livres de α -globinas instáveis, insolúveis e formam agregados chamados corpos de inclusão, responsáveis pela destruição de precursores eritróides. Os homocigotos para a β -talassemia que apresentam anemia grave, necessitam de transfusões sanguíneas regulares, o que produz acúmulo de ferro no organismo, afetando principalmente o fígado, o coração e as glândulas endócrinas.

Recentemente foi descrito o gene AHSP (*Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein*) que pode ter participação na síntese de hemoglobina. A proteína produzida por este gene forma um complexo estável quando ligado a α -globinas livres, funcionando como uma chaperona molecular evitando a precipitação das cadeias nas células. O papel desta proteína nas síndromes talassêmicas ainda não está esclarecido, embora haja evidências de que ela possa desempenhar função importante quando existe excesso de cadeias α como nas β -talassemias.

Com base nesses dados, propomos o estudo do efeito da supressão da expressão do gene AHSP em células da linhagem eritroleucêmica humana K562 (ATCC), através do silenciamento gênico por interferência de RNA e em culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduo portador da mutação no códon 75 do gene AHSP, para análise durante a diferenciação celular. As células mononucleares do indivíduo mutante e do controle foram obtidas a partir do sangue de doadores voluntários no ambulatório do

Hemocentro da UNICAMP e foram submetidas a um sistema de cultura de células em duas fases.

Através dos resultados obtidos foi possível observar que não houve a interferência esperada do gene AHSP nas condições testadas.

Os resultados obtidos também demonstraram expressão diferencial no gene AHSP na presença da mutação no códon 75 que talvez esteja relacionada com a evolução clínica na β -talassemia. Estes dados sugerem uma importante função do gene AHSP durante a diferenciação eritróide.

Thalassemia syndromes are a heterogeneous group of genetics diseases caused by mutations that affect the synthesis of one or more hemoglobin chains. In β -thalassemia partial or total suppression of β - chains occurs, provoking the excess of free α -globin chains, which are insoluble and form aggregates called inclusion bodies, responsible for the destruction of erythrocyte precursors. Homozigotes for β -thalassemia that present serious anemia, need regular blood transfusions, leading to the accumulation of iron in the organism, affecting mainly the liver, the heart and the endocrine glands.

Recently the AHSP gene was described which may have a participation in hemoglobina synthesis. The protein produced for this gene forms a stable complex with free α -globin, functioning as molecular chaperone. The role of this protein in the thalassemia syndromes hass still not been determined, although it may e predicted that it may play an important function when an excess of chains exists as in the β -thalassemias.

Based on these data we investigated in this project the effect of the suppression of the expression of AHSP by RNAi gene silencing in the human leukemic cell line, K562 (ATCC) and in cultures of mononuclear cells of the peripheral blood derived from donor with AHSP mutation at codon 75, for analysis during the cellular differentiation. For the analysis of the cellular differentiation, the cells, obtained from the blood of volunteers at the Hematology and Hemotherapy Center of the UNICAMP will be submitted to a system of culture of cells in two phases.

These results demonstrated that it was not possible obtain interference of the expression of AHSP.

These results also demonstrated differential expression in the AHSP gene when the mutation at codon 75 was presented and maybe was related with the clinical evolution in β -thalassemia. Based on this data, we proposed an important function of AHSP gene during the erythroid differentiation.

INTRODUÇÃO

As hemoglobinas humanas são tetrâmeros constituídos por duas cadeias polipeptídicas de globinas alfa (α e ζ) e duas cadeias não alfa (β , δ , γ e ϵ), cada uma contendo um grupo prostético heme e um derivado porfirínico contendo radical Fe^{+2} , que se liga reversivelmente à molécula de O_2 , formando a oxihemoglobina, responsável por seu transporte e transferência para os tecidos. A combinação da hemoglobina com o CO_2 produzido nos tecidos resulta na formação, também reversível, da carboxihemoglobina. Essas combinações entre O_2 e CO_2 com o grupo heme ocorre em células específicas denominadas hemácias, eritrócitos ou glóbulos vermelhos (Hoffman, 1991).

A síntese das cadeias globínicas é controlada por genes distintos, distribuídos em dois agrupamentos (*clusters*): o agrupamento α , composto por genes que codificam as cadeias α e ζ , compreende uma região de 30 kb no braço curto do cromossomo 16; e o agrupamento β , composto por genes que codificam as cadeias β , δ , γ e ϵ , com aproximadamente 50Kb, localizados no braço curto do cromossomo 11 (Figura 1A). De acordo com a composição desses agrupamentos tem-se a formação dos diferentes tipos de hemoglobinas.

Para que o tetrâmero formado seja funcional, a expressão gênica dos clusters α e β deve ocorrer de forma balanceada nos diferentes estágios do desenvolvimento humano: no estágio embrionário, quando são sintetizadas as hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$), e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$); no período fetal em que ocorre a produção da hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$) e durante a vida adulta quando são produzidas as hemoglobinas A ($\alpha_2\beta_2$) e A₂ ($\alpha_2\delta_2$). A substituição do predomínio de um tipo de hemoglobina por outro ocorre de forma sincronizada, fenômeno denominado *Switching* (Figura 1B).

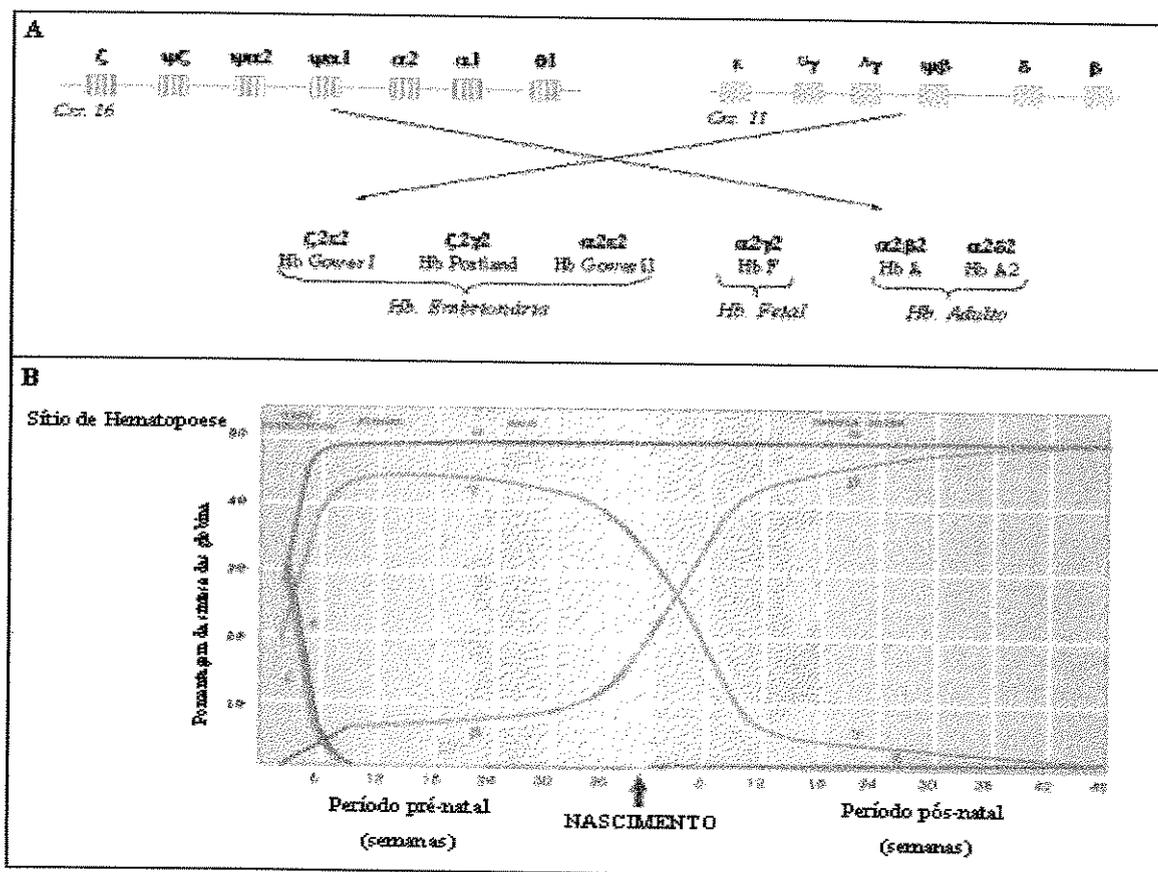


Figura 1 - Desenvolvimento Ontogênico Normal das Cadeias Globínicas.

(A) Composição e disposição dos genes nos *clusters* da α e β globina; (B) Produção das cadeias globínicas durante os estágios de desenvolvimento (Weathdrall, 2001).

Em indivíduos normais predomina a hemoglobina A (HbA) que constitui 95% do total da hemoglobina celular, enquanto a hemoglobina A₂ (HbA₂) é detectada em níveis entre 2 e 3% e a hemoglobina fetal (HbF) entre 0 e 1% (Stamatoyannopoulos, 1994).

As hemoglobinopatias são distúrbios hereditários causados por mutações nos genes responsáveis pela produção das cadeias globínicas. Genericamente, podem ser classificadas como: alterações estruturais - que afetam o polipeptídeo da globina sem afetar sua síntese, com a formação de hemoglobinas estruturalmente anômalas no interior das hemácias; alterações na síntese - ocorre a supressão parcial ou total da produção de uma ou

mais cadeias polipeptídicas; e as alterações que resultam na produção persistente de cadeias gama durante a vida adulta, denominada Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) (Forget, 1998).

As síndromes talassêmicas constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas por mutações que afetam a síntese de uma ou mais cadeias globínicas, sendo designadas de acordo com o tipo de cadeia cuja síntese está prejudicada (talassemia α , β , γ , $\delta\beta$ ou $\delta\beta\gamma$). A redução ou ausência total de uma das cadeias leva, nos homocigotos, ao acúmulo da outra cadeia que compõe o tetrâmero, causando sua precipitação no interior das hemácias, e conseqüente destruição precoce dessas células (Weatherall, 2001).

Várias alterações gênicas podem levar a uma redução da síntese de uma das cadeias de globina, como grandes deleções, pequenas deleções, inserções ou mutações pontuais com conseqüências diferentes de acordo com a região do gene atingida (Zago, 2004).

Na β -talassemia, há diminuição ou ausência de produção da cadeia β , que leva ao excesso de cadeias α e conseqüentemente à formação de agregados nos eritroblastos, que causam lesões na membrana e comprometem o metabolismo celular, causando sua morte (Weatherall, 2001 e Zago, 2004).

Miele, Manson e Clinton (2001) descreveram um RNAm de aproximadamente 501pb responsável pela síntese de uma proteína de 102 aminoácidos, com expressão relacionada à atividade hematopoética. O gene inicialmente denominado EDRF (*Erythroid Differentiation-Related Factor*) foi isolado a partir de eritroblastos de rato e de medula óssea humana.

Kihm *et al.*, (2001), investigando o fator de transcrição GATA-1, que se acredita fazer parte da regulação gênica durante o desenvolvimento das células da linhagem

eritróide (Takahashi *et al.*, 1999 e Tang *et al.*, 2001), identificaram uma possível função como estabilizador de α -globinas instáveis para o gene EDRF, renomeado como AHSP (*Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein*).

A proteína possivelmente seria requerida para estabilizar α -globinas, direcionando-as na ligação com β -globinas para a síntese de hemoglobina, formando um complexo estável quando ligado a α -globinas livres, funcionando como uma chaperona molecular, classe especial de proteínas cuja função é permitir que os polipeptídios recém-sintetizados adquiram sua estrutura final ativa ao interagir com o peptídio nascente (Ellis *et al.*, 1991) (Figura 2).

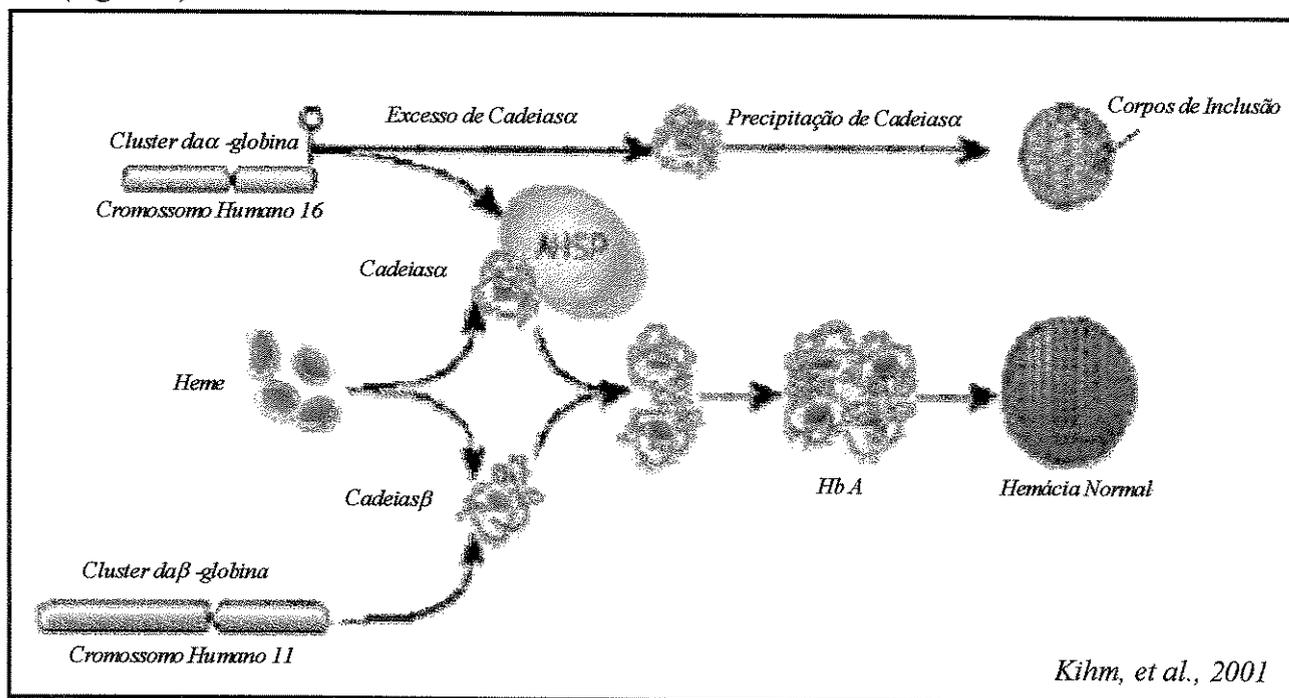


Figura 2 - Mecanismo de ação da AHSP.

Embora não seja ainda totalmente esclarecida a razão pela qual o gene da AHSP liga-se especificamente às cadeias de α -globinas, não interagindo com cadeias β ou com a hemoglobina A (Gell *et al.*, 2002), recentemente foi identificado através de estudos bioquímicos, o mecanismo molecular através do qual a AHSP estabiliza as α -globinas

evitando a citotoxicidade causada pela precipitação das cadeias (Feng *et al.*, 2004). É previsível, portanto que esta proteína tenha algum papel na fisiopatologia das síndromes talassêmicas.

Dos Santos *et al.* (2004) demonstraram que a AHSP está sendo constantemente expressa durante a diferenciação celular, possivelmente promovendo a estabilidade de cadeias α , confirmando uma importante função da AHSP durante a eritropoese, tendo sua expressão aumentada em estágios celulares com alto metabolismo de hemoglobina. Identificou também uma mutação no códon 75 que resulta na substituição de uma Asparagina (AAC) por uma Isoleucina (ATC). A troca de aminoácido pode modificar a conformação da proteína e conseqüentemente gerar instabilidade protéica ou causar inativação dos sítios de ligação das cadeias α (Dos Santos, 2004).

Kong *et al.*, (2004) propuseram uma função essencial para AHSP, na eritropoese normal, através de estudos bioquímicos realizados em ratos desenvolvidos para não expressar AHSP. Observou-se que os eritrócitos continham precipitados de hemoglobina e danos oxidativos exibindo apoptose aumentada. Demonstrando-se também que mudanças na expressão da AHSP poderiam interferir no mecanismo fisiopatológico da β -talassemia.

Fire e Mello (1998) observaram pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* um método de silenciamento específico de genes através RNA dupla fita (dsRNA), detectando a diminuição da expressão do gene homólogo ao dsRNA com a transfecção de poucas moléculas dupla fita. Este processo de silenciamento gênico foi então denominado interferência de RNA (RNAi), mecanismo pelo qual uma molécula de RNA dupla fita é capaz de induzir o silenciamento gênico em plantas e animais, através da degradação da molécula de mRNA homóloga ao gene que se quer silenciar. (MacManus, 2002; Chiu, 2002 e Elbashir, 2001).

O mecanismo de ação do silenciamento por RNAi consiste basicamente de duas etapas principais: fragmentação de uma molécula de dsRNA em moléculas de siRNA (*short interfering RNA*), por um complexo enzimático formado por uma ribonuclease ATP-dependente, e transferência dessas moléculas de siRNA para um segundo complexo enzimático, no qual irão direcionar a destruição do mRNA. Os siRNAs irão intermediar a interferência gênica, por guiar o complexo RISC (*RNAi-Induced Silencing Complex*).

Em mamíferos inicialmente observou-se que a presença de moléculas de dsRNA de longa extensão era capaz de desencadear uma resposta imunológica inespecífica, pela ativação da proteína PKR (*Responsive Protein Kinase*), inibindo a tradução de proteínas pela fosforilação da subunidade α do fator iniciador da tradução (EIF2 α) (Brummelkamp, 2002 e MacManus, 2002), resultando na supressão geral da síntese protéica e causando apoptose celular. A PKR é responsável também pela ativação direta da 2', 5'oligoA sintetase, enzima que sintetiza oligoadenilatos, e indireta da enzima RNase L, componente central do mecanismo de degradação de RNA (Bast, 2000 e MacManus, 2002). Pesquisas realizadas com células de mamíferos determinaram o uso de oligonucleotídeos com até 30 pb com seqüência complementar ao gene alvo para o silenciamento (Brummelkamp, 2002; MacManus, 2002 e Sui, 2002).

A RNAi é extremamente eficaz em células de mamíferos (Elbashir, 2001 e Wilda, 2002). A análise de células eritróides em que a produção da proteína AHSP esteja suprimida ou reduzida, ou alternativamente a análise da produção da proteína AHSP estruturalmente anormal é muito importante para esclarecer a função real desta proteína na eritropoese.

Muitas doenças hematológicas resultam da deleção, mutação ou ausência da função do gene. A aplicação da RNAi em células humanas pode permitir futuramente sua utilização em intervenções terapêuticas (Wang, 2003; Cioca, 2003 e Oliveira, 2003).

Que seja do nosso conhecimento, não existem dados da literatura abordando estes dois aspectos, principalmente em células humanas. Assim, estudos de supressão de expressão gênica com o emprego da RNAi e a análise do comportamento do gene AHSP com a mutação descoberta por Dos Santos (2004) são fundamentais para o conhecimento do papel da AHSP em hemoglobinopatias.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Induzir o silenciamento do gene AHSP e analisar a formação de hemoglobina e precipitação de cadeias α -globinas em células de linhagem eritróide humana.
2. Analisar a expressão do gene AHSP e da α -globina na diferenciação de células eritróides humanas em amostra com a mutação no códon 75 do gene AHSP, identificada por Dos Santos (2004), utilizando o sistema de cultura em duas fases.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. SILENCIAMENTO GÊNICO POR INTERFERÊNCIA DE RNA

1.1. Construção do vetor de expressão contendo a seqüência interferente

1.1.1. Síntese das fitas de dsRNA

A seqüência proposta nesse projeto contém 63 nucleotídeos de extensão, distribuídos como sugerido pelo fabricante do vetor que foi utilizado, em: 19 nucleotídeos, formando uma seqüência homóloga ao mRNA do gene da AHSP (Figura 3); 19 nucleotídeos, formando uma seqüência complementar à primeira; uma seqüência intercalar a estas, com 9 nucleotídeos de extensão, conhecida como “loop”, e seqüências situadas nas extremidades, referentes às enzimas de restrição *BamH I* e *Hind III*. Uma seqüência de 6 nucleotídeos T próximas ao final da molécula de siRNA funcionará como um sinal de finalização para a enzima RNA pol III. A seqüência 5'-GGAA-3' presente por último na fita *Forward* tem por objetivo otimizar o silenciamento gênico, funcionamento ainda não esclarecido pelas pesquisas já realizadas.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa MWG e estão listados na tabela 1. Foram escolhidas duas seqüências: uma específica para o gene da AHSP, que não apresentou homologia com outras seqüências dos genes expressos nas células utilizadas durante o estudo (Brummelkanp, 2002 e Sui, 2002), e outra complementar a primeira.

Tabela 1 - Seqüências de oligonucleotídeos para formar o dsRNA.

Os oligonucleotídeos foram hibridizados para formar o dsRNA e clonados no vetor de expressão.

AHSP RNAi (5' – 3')	
<i>Forward</i>	GATCCCGAGCGAGACAAGGCTCTGCTTCAAGAGAGCAGAGCCTTGTCTCGCTCTTTTTTGGAA
<i>Reverse</i>	AGCTTTCAAAAAAGAGCGAGACAAGGCTCTGCTCTCTTGAAGCAGAGCCTTGTCTCGCTCGG

1.1.2. Anelamento dos oligonucleotídeos por hibridização

Os oligonucleotídeos foram construídos com base na análise da seqüência gênica feita no *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e sua hibridização realizada a partir da preparação de 50ml de uma solução contendo 46ml do reagente de ligação fornecido pelo kit do vetor de expressão e 2ml de cada uma das diluições de oligonucleotídeos nas concentrações de 1µg/µl. A solução foi submetida a uma temperatura de 90°C por 3 minutos e resfriada gradualmente até 21°C por 3 horas.

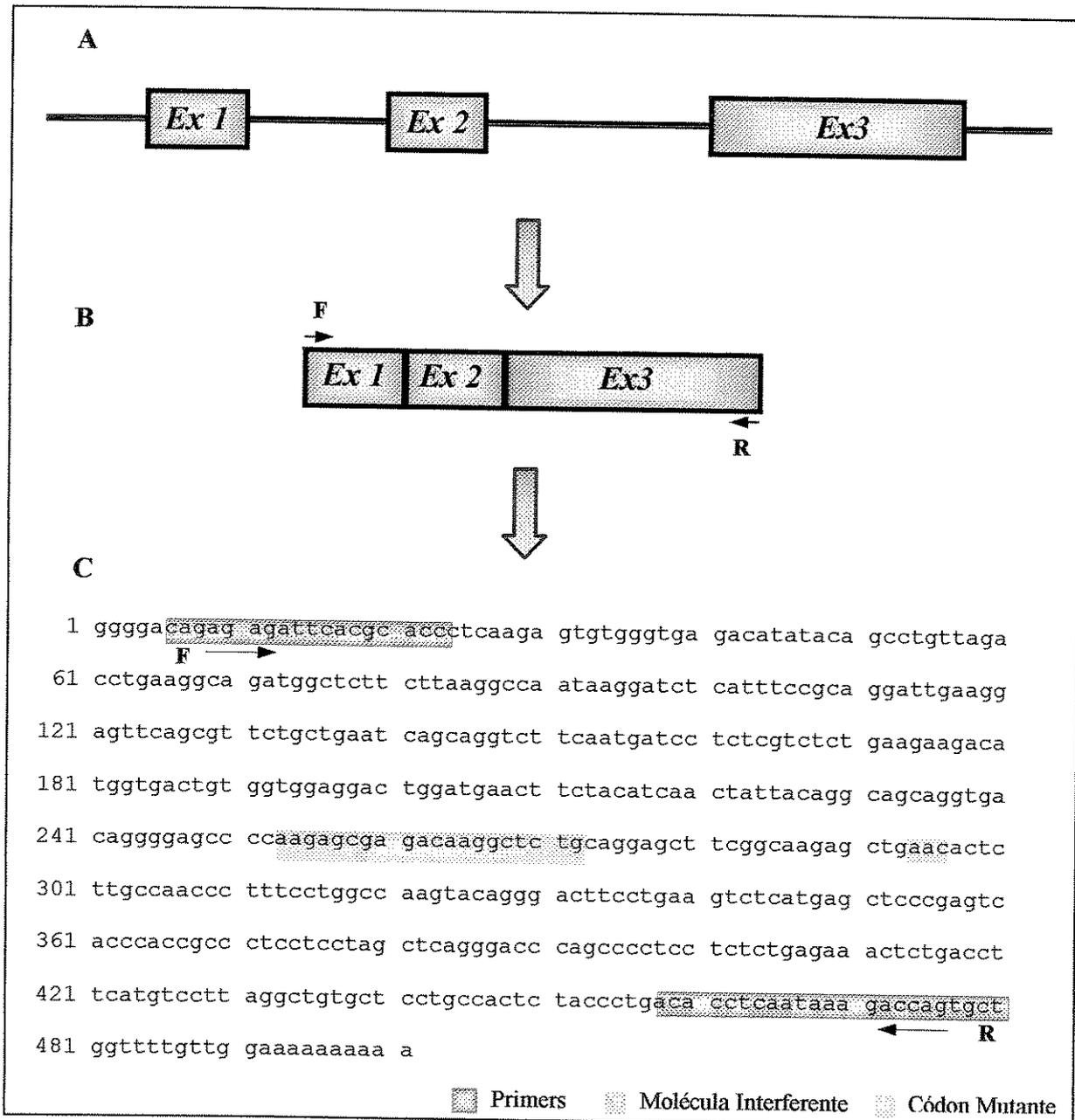


Figura 3 - Seqüência Gênica do AHSP.

(A) Representação gráfica da seqüência genômica do AHSP; (B) Representação gráfica da seqüência do mRNA do AHSP; (C) Seqüência do mRNA do AHSP com a representação: primers para amplificação e sequenciamento (verde); molécula derivada para utilização no RNAi (rosa); códon 75 mutante (laranja), substituição de uma Asparagina (AAC) por uma Isoleucina (ATC).

1.1.3. Clonagem do dsRNA no vetor de expressão

O fragmento de dsRNA com a seqüência codificadora da proteína de interesse foi inserido no vetor de expressão em mamíferos pSilencer 2.0-U6 (Ambion). Este plasmídeo comercial contém o promotor U6 Polimerase III e um gene de resistência à penicilina (Figura 4). O produto da hibridização foi diluído para uma concentração de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, segundo as recomendações do fabricante do vetor. A reação de ligação consistiu em uma mistura de $1\mu\text{l}$ do produto da hibridização com $1\mu\text{l}$ do vetor, $1\mu\text{l}$ da enzima T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech), $1\mu\text{l}$ de tampão ligase 10X (Amersham Pharmacia Biotech) e água deionizada para um volume final de $10\mu\text{l}$. A reação foi incubada por 16 horas a 37°C .

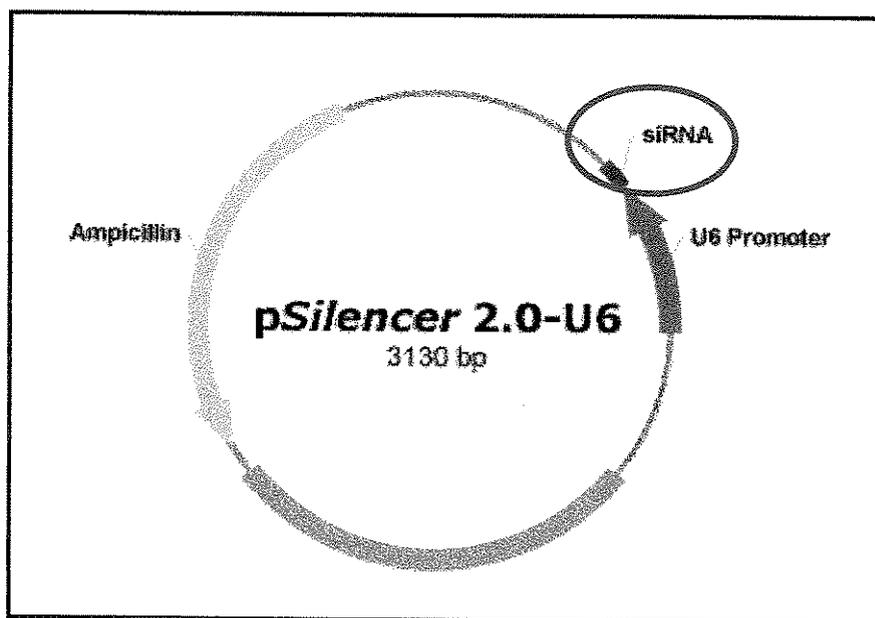


Figura 4 - Vetor de expressão pSilencer 2.0-U6.

A região em destaque corresponde ao sítio de inserção do dsRNA.

1.2. Transformação

A transformação em bactéria foi realizada misturando-se 10µl da reação de ligação com 200µl de bactéria competente da linhagem *Escherichia coli* DH5α. A mistura foi deixada no gelo por 5 minutos, depois incubada por 90 minutos a 42°C e novamente deixada no gelo por 5 minutos. Após este tempo, 800µl de meio LB (NaCl 10mM 0,5% de extrato de levedura e 1 % de tripton) foram acrescentados e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação de 300 RPM.

Em seguida 200µl da cultura de bactérias foram inoculados e espalhados com alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio sólido LB (NaCl 10mM 0,5% de extrato de levedura, 1 % de tripton e ágar 15g/l) com o antibiótico ampicilina na concentração de 100µg/ml, para seleção das colônias transformantes. As placas foram incubadas a 37°C por 16h.

1.3. Extração do DNA plasmidial

Colônias bacterianas resistentes à seleção pelo antibiótico ampicilina foram inoculadas em alíquotas de 2ml de meio Circle Grow (Bio 101) contendo 2ml de ampicilina, e incubadas durante 16 horas a 37°C sob agitação de 220 RPM. Após este período, transferiu-se 1ml das células para tubos eppendorfs, procedendo-se com a centrifugação a 12000 RPM por 20 segundos a -4°C. Ao precipitado adicionou-se 100µl de solução I (EDTA 0,5M, pH 8 e Tris-HCl 1M, pH 8) e após 5 minutos em temperatura ambiente adicionou-se 200µl de solução II (NaOH 10N e SDS 10%) e os tubos foram homogeneizados por inversão e deixados por 5 minutos no gelo.

Depois foram adicionadas 150ml de solução III (KOAc e ácido acético glacial) e os tubos foram invertidos cuidadosamente por 10 segundos e deixados por 5 minutos no gelo. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12000 RPM por 3 minutos a -4°C . O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionou-se 800ml de etanol absoluto gelado. A mistura foi incubada por 2 minutos à temperatura ambiente no escuro. Depois se precipitou o DNA por centrifugação a 12000 RPM por 2 minutos a -4°C .

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado pela adição de 1ml de etanol 70% e centrifugação a 12000 RPM por 1 minuto a -4°C . Após a remoção do sobrenadante, o precipitado foi deixado a temperatura ambiente de um dia para o outro para evaporar o etanol e depois ressuspendido em 50ml de água estéril.

1.4. Reação de PCR para confirmação da construção

Foi realizada uma ampliação gênica por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da seguinte forma: para um volume final de reação de 20 μl , foram adicionados 1 μl do DNA plasmidial (mini-prep), 2 μl de tampão 10X, 125 μM de cada dNTP, 1,6mM de MgCl_2 , 240nM dos primers T7 e pSilencer2.0 (Invitrogen), 0,06U da enzima *Taq* DNA polimerase. Os *primers* utilizados estão relacionados na tabela 2.

A PCR foi realizada em termociclador automático GeneAmp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems), num programa que consistiu em: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C , seguida de 30 ciclos de 25 segundos a 95°C para desnaturação, 35 segundos a 63°C para anelamento e 40 segundos a 72°C para extensão. Ao término dos ciclos, a reação permaneceu a 72°C durante 7 minutos para extensão final.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de Agarose 2% (Invitrogen), corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na PCR e seqüenciamento para confirmação da construção.

Primer	Sequência (5'-3')
T7	TTATACGACTCACTATAGGG
<i>PSilencer 2.0</i>	AGGCGATTAAGTTGGGTA

1.5. Seqüenciamento de DNA

A construção foi confirmada por seqüenciamento automático, técnica adaptada de Sanger *et al* (1977), utilizando-se *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA. À uma reação de 10µl de volume final, adicionou-se cerca de 30ng do produto amplificado, quantificado com o marcador de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), 1µl de *BigDye*, 1µl do primer T7 na concentração de 5µM.

Em termociclador automático as amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto seguido por 30 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 57°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

O produto desta nova reação foi precipitado da seguinte maneira: 2µl de acetato de amônio 7,5M e 50µl de etanol absoluto foram adicionados aos 10µl da reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente

protegido da luz, a amostra foi centrifugada à rotação máxima por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e adicionado a ele, 100µl de etanol 70%. Novamente centrifugou-se a amostra à rotação máxima por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado por inversão e a amostra foi aquecida a 65°C durante 5 minutos para secagem do tubo. O produto precipitado foi armazenado a -20°C, protegido da luz e para a eletroforese, adicionou-se 2,0µl de *loading buffer* (formamida deionizada, EDTA 25mM (pH 8,0) com *blue dextran* (50mg/ml) na proporção de 5:1). As amostras foram desnaturadas a 95°C e aplicadas em gel de poliacrilamida 2mm de espessura e separados por eletroforese em sequenciador automático (ABI Prism 377 DNA *Sequencer* Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

Após o sequenciamento, o resultado foi alinhado à seqüência do oligonucleotídeo solicitado, para confirmação da seqüência a ser transfecta, através da ferramenta BLAST 2 Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/>).

1.6. Extração de DNA plasmidial em larga escala (Maxi-Prep)

Foi selecionada uma colônia a partir da Placa de Petri contendo meio sólido LB e ampicilina na concentração de 100mg/ml e transferida para 10ml de meio Circle Grow com 100mg/ml de ampicilina. As bactérias cresceram em *Shaker* (Gallenkamp) *overnight* a 37°C sob agitação de 220 RPM. Em seguida esse pré-inóculo foi diluído (1:500) em 500ml de meio LB e ampicilina na concentração de 100mg/ml e deixada por 16 horas a 37°C sob agitação a 220 RPM. Após este período, a extração do DNA foi realizada utilizando-se o QIAGEN®Plasmid Mega kit (QIAGEN) seguindo as recomendações do

fabricante e a concentração determinada em espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia, USA), por leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260nm.

1.7. Cultura de células da linhagem K562 com o RNA interferente

Para o estudo da ausência de expressão da AHSP *in vitro*, o plasmídeo contendo o inserto a ser testado (siRNA), obtido a partir da Maxi-Prep, foi introduzido por transfecção em células eritroleucêmicas, K562. As células foram submetidas ao sistema de cultura de células descrito por Smith *et al* (2000): Hemina foi adicionada ao meio de cultura para induzir a diferenciação celular além de aumentar a produção de Hemoglobina Fetal, possibilitando desta maneira avaliar o efeito do bloqueio de síntese de AHSP e seu efeito sobre as cadeias de globina α .

A solução de Hemina foi preparada da seguinte forma: foram dissolvidos 32.5mg de Hemina bovina em 0.5ml de NaOH 1M por 30 minutos e misturados com 0.5ml de Tris base 0.5M, seguido por 10ml de soro albumina bovina. A mistura foi neutralizada pela adição de 0.5ml de HCl 1M.

As células K562 que cresceram em suspensão foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 2g/ml de bicarbonato de sódio, 100U/ml de penicilina G (ICN), 100 μ g/ml de estreptomicina (Invitrogen) e 1000 μ g/ml de fungizone (Invitrogen). A solução de Hemina foi adicionada ao meio de cultura para uma concentração final de 30 μ M.

1.7.1. Transfecção

Para as células K562 que cresceram em suspensão, a metodologia utilizada para a transfecção foi a eletroporação (Pahl *et al.*, 1991), onde a célula foi exposta a um pulso elétrico de alta voltagem e curta duração, que promoveu o aparecimento de poros temporários na membrana celular, através dos quais o DNA pôde penetrar na célula. Foi utilizado o equipamento BioRad Gene Pulser II (BioRad), com cubeta de eletroporação de 0,4cm (Bio Rad).

O método consistiu em lavar as células K562 duas vezes com meio RPMI 1640 por centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos a 25°C e ressuspendê-las em meio RPMI 1640. Foram preparadas 4 alíquotas de 500µl de células com uma concentração final de 10^7 células: com 20µg de DNA plasmidial, vetor com inserto para promover a interferência do AHSP; com 20µg de vetor com inserto específico para interferir a proteína GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase), usado como controle positivo; com 20µg de plasmídeo circular *pSilencer Negative Control* (Ambion), vetor que codifica um siRNA cuja seqüência não possui homologia com nenhum gene em humanos, ratos ou camundongos e uma alíquota que serviu de controle (amostra não submetida à transfecção). Cada uma dessas alíquotas foi transferida para uma cubeta de eletroporação.

As células com plasmídeo foram expostas a um pulso elétrico de voltagem de 0,25KV e capacitância de 975µF. Em seguida as células foram transferidas para garrafas de cultura com 100ml de meio RPMI 1640, 10% de soro bovino fetal e Hemina para uma concentração final de 30µM. As culturas foram incubadas a 37°C em estufa com 80% de umidade e 5% de CO₂ por um período de 60 horas após a adição de Hemina.

2. Proliferação e maturação dos progenitores eritróides humanos em cultura líquida de duas fases

Para a análise durante a diferenciação celular, células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de “buffy coat” (Pope *et al* 2000 e Fibach *et al*, 1989) de doadores saudáveis após consentimento (Anexo). O sangue foi inicialmente coletado em tubos heparinizados, transferidos para tubos Falcon estéreis e as células mononucleares foram isoladas por centrifugação a 1500 RPM por 30 minutos e a temperatura ambiente num gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1077g/ml-Sigma).

A camada de células da interface foi coletada em tubos Falcon estéreis, o plasma rico em plaquetas foi descartado e as células lavadas por três vezes em meio de cultura “*Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium*” (IMDM; Invitrogen) através de centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em meio de cultura IMDM (Invitrogen) e as células da cultura foram contadas em câmara de Neubauer com corante azul de *Trypan* para verificação da viabilidade celular e exclusão das células mortas.

As células foram cultivadas numa densidade de 1×10^6 céls/ml em meio IMDM (pH 7,4) suplementado com 10% de soro bovino fetal estéril (Invitrogen), 10% de meio condicionado coletado a partir da linhagem de células de carcinoma de bexiga 5637 e $1 \mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A (Sandoz). As culturas foram incubadas a 37°C , numa atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido por sete dias.

Após essa primeira fase da cultura, as células não aderentes foram coletadas e lavadas por duas vezes em meio de cultura IMDM (Invitrogen) por centrifugação a 1500 RPM durante 10 minutos à temperatura ambiente. O botão de células foi ressuspenso em

meio de cultura e foram verificadas a viabilidade e quantidade de células através de câmara de Neubauer com corante azul de *Trypan*.

As células foram colocadas novamente em cultura, em placas de 6 “wells” numa densidade de $0,4 \times 10^6$ céls/ml, em 5ml de volume final, contendo meio IMDM (Invitrogen) fresco suplementado com 30% de soro bovino fetal (Invitrogen), 1% de soro de albumina bovina deionizada (BSA-Sigma), 10^{-5} mol/L 2-mercaptoetanol (Sigma), 1,5nmol/L de glutamina (Gibco), 10^{-6} mol/L de dexametasona (Sigma), 300µg/ml de transferrina saturada com ferro (Sigma), 1U/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 25µg/ml de gentamicina (Invitrogen).

As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera de CO₂ 5% e O₂ 5% e ambiente úmido por mais 14 dias. A morfologia das células foi analisada através de lâminas de *citospin* coradas com Leishman e a viabilidade através da coloração com azul de *Trypan* em câmara de Neubauer.

Foram realizadas coletas diárias de células para verificação da morfologia e viabilidade celular, extração de RNA total e análise da diferenciação celular por citometria de fluxo. A figura 5 ilustra a metodologia.

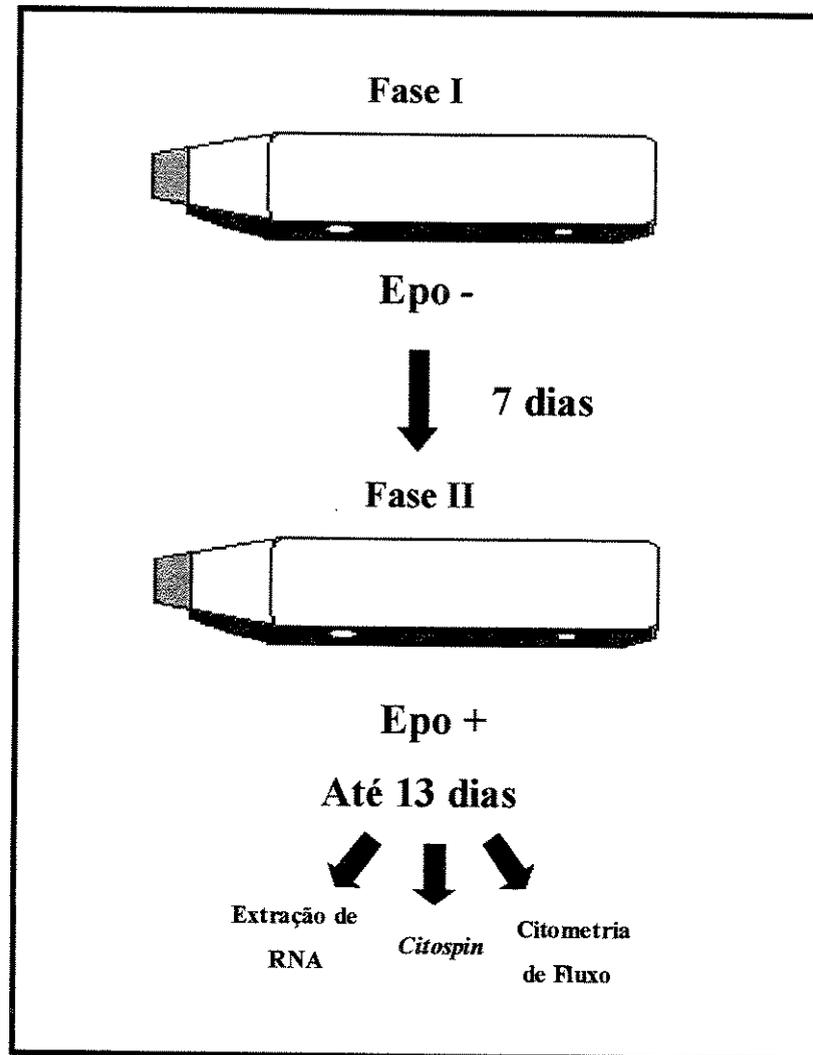


Figura 5 - Método de cultura líquida em duas fases das células precursoras eritróides. Na fase I as células mononucleares foram isoladas a partir do sangue periférico e cultivadas por 7 dias em meio de cultura IMDM contendo soro bovino fetal, ciclosporina A e meio condicionado coletado a partir da linhagem de células 5637 como fator de crescimento. Na fase II as células foram lavadas e cultivadas em meio de cultura IMDM contendo eritropoetina e incubadas por 13 dias.

3. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que consiste no reconhecimento de proteínas *in situ* utilizando-se um anticorpo marcado com um fluocromo, como a ficoeritrina (PE) ou isotiacianato fluoresceína (FITC). O fluocromo ao ser estimulado por um feixe de laser emite um fóton que é capturado por sensores no citômetro de fluxo, que faz análises tanto qualitativas como quantitativas (Owens *et al.*, 1995).

3.1. Quantificação de células contendo HbF

Para a análise da população de células positivas para a HbF inicialmente utilizamos o Kit Fix & Perm® Plus Cell Permeabilization (Caltag Laboratories), para a realização do método de marcação intracitoplasmática, através da fixação e permeabilização das células provenientes das culturas. As suspensões celulares foram misturadas a 50µl das soluções do Kit, de acordo com as instruções do fabricante e lavadas 2 vezes com PBS, por centrifugação a 1400 RPM e a temperatura ambiente. Esse processo torna as células permeáveis para a marcação intracelular.

Foram adicionados às células fixadas e permeabilizadas 3µl do anticorpo anti-HbF (Caltag Laboratories) e para uma segunda amostra de células foram adicionados 3µl do isotipo controle não relacionado (anticorpo mouse IgG) (Caltag Laboratories). As células contendo os anticorpos foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro e depois lavadas com PBS, por centrifugação a 1400 RPM à temperatura ambiente e ressuspensas em 1ml de uma solução de PBS, contendo BSA e azida sódica, mantidas sob refrigeração a 4°C, no escuro até a aquisição dos dados pelo citômetro de fluxo.

3.2. Análise do padrão dos marcadores de superfície de membrana glicoforina A e receptor de transferrina

A análise dos marcadores de superfície durante a diferenciação celular eritróide foi monitorada utilizando-se o anticorpo anti-glicoforina A conjugado com PE (Caltag Laboratories) e o anticorpo anti-receptor de transferrina conjugado com FITC (Caltag Laboratories). Para a dupla marcação dos antígenos de superfície celular, glicoforina A e receptor de transferrina (CD71), foram misturados 100µl de suspensão celular contendo 1×10^6 células com 5µl do anticorpo anti-glicoforina A e 5µl do anticorpo anti-receptor de transferrina, e incubadas no escuro a 4 °C por 30 minutos.

As células marcadas foram lavadas com solução de PBS, contendo BSA e azida sódica, fixadas com solução de paraformaldeído 1X e mantidas sob refrigeração a 4°C, no escuro até a aquisição dos dados pelo citômetro de fluxo.

4. Extração de RNA

4.1. Extração de RNA da cultura de células de linhagem K562

O RNA total das células K562 em cultura foi extraído com o kit *RNeasy Mini* (QIAGEN) segundo as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia, USA), através de leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260nm.

4.2. Extração de RNA da cultura líquida de duas fases dos progenitores eritróides

Na segunda fase da cultura, amostras de células foram coletadas para extração de RNA total após períodos pré-determinados de incubação. O RNA foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), uma solução monofásica de fenol e isocianato guanidina. Foi acrescentado 1ml de Trizol ao botão celular das amostras contendo de 4×10^6 a 1×10^7 células e as alíquotas foram homogeneizadas através de sucessivas pipetagens até que as amostras se tornassem bastante fluidas. O reagente Trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células durante a homogeneização e dissolve os componentes celulares.

A solução contendo Trizol foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para a dissociação completa dos complexos nucleoproteicos. Às amostras homogeneizadas foram acrescentados 200µl de clorofórmio (CHCl_3), agitadas vigorosamente, e novamente incubadas por mais 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 13500 RPM, em temperatura de 4°C. A fase aquosa, onde fica o RNA, foi recuperada, transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado por adição de 500µl de Isopropanol gelado. A solução foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 13500 RPM por 10 minutos a 4°C. Após a precipitação, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1ml de Etanol 75% ao RNA precipitado para remoção do excesso de sal. O RNA foi novamente lavado através da centrifugação a 11500 RPM por 5 minutos a 4°C.

As amostras de RNA total foram ressuspensas em água com dietilpirocarbonato (DEPC) e incubadas por 10 minutos à 55°C para a inativação de RNase e mantidas por 2 horas em gelo, para completa solubilização do RNA.

As amostras foram quantificadas através de leitura da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm e a integridade das amostras foi analisada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% com formaldeído.

5. Síntese DNA complementar (cDNA)

As amostras, de RNA total, extraídas tanto da cultura de células de linhagem K562 quanto da cultura líquida de duas fases dos progenitores eritróides, foram transcritas reversamente em DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA foi realizada a partir de aproximadamente 5µg de RNA das amostras utilizando-se o kit *SuperScript II* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de RNA total foram tratadas com *DNase I* por 15 minutos em temperatura ambiente, para a remoção de qualquer DNA contaminante. Após esse período a reação foi interrompida pela adição de EDTA, que atua como composto quelante de Mg^{++} , co-fator necessário para a atividade da *DNase*, e por aquecimento à 65°C por 5 minutos. Foram adicionados às amostras dNTPs, necessários para a formação da fita a ser sintetizada e o oligodT que se ligará à região poli-A do RNA mensageiro servindo de ancorador para que a *Transcriptase reversa* possa sintetizar a cadeia de cDNA. A reação foi inicialmente incubada por 50 minutos a 42°C, temperatura ideal para a atividade da enzima e depois incubada a 70°C por 15 minutos 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 região de aproximadamente 600pb do gene de β -actina para confirmação da síntese (tabela 3).

Tabela 3 - Primers utilizados para a confirmação da transcrição reversa.

Primer	Sequência (5'- 3')
β -Actina F_cDNA	TCACCGAGCGCGGCT
β -Actina R_cDNA	TAATGTCACGCACGATTCCC

6. PCR quantitativo em tempo real – “Real-Time PCR”

Aliquotas de cDNA foram utilizadas como molde em reações de PCR quantitativo em tempo real. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (Higuchi, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante, 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, MgCl₂, tampão, *AmpliTaq Gold*), contém também o corante SYBRGreen, componente intercalante de DNA dupla fita, necessário para a detecção da amplificação ciclo a ciclo.

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizada a análise relativa dos dados, onde a expressão dos genes analisados foi quantificada em relação a situações consideradas como referência, que constituíram as amostras calibradoras: RNA de células que não foram transfectadas com o plasmídeo, e o tempo zero do sistema de cultura líquida em duas fases. Todos os dados obtidos foram normalizados a partir da expressão do gene constitutivo β -actina.

Para a realização desta técnica foram desenhados primers específicos para os genes de interesse e para os genes endógenos (Tabela 4). Os primers foram desenhados com o uso do software “Primer Express” (Applied Biosystems).

Tabela 4 - Sequências dos primers utilizados na PCR em tempo real.

Gene	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')
α -globina	TGGTCCCCACAGACTCAGAGA	CGGCCTTGACGTTGGTCTT
β -globina	ATCTGTCCACTCCTGATGCAGTT	AGGCACCGAGCACTTTCTTG
γ -globina	CCAGCTGAGTGAAGTGCAGTGT	ACGGTCACCAGCACATTTCC
β -actina	AGGCCAACCGCGAGAAG	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA
BCR	CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT	CCTGCGATGGCGTTTAC
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	CCACTTGATTTTGGAGGGATCT
AHSP	TGATCC TCTCGTCTCTGAAGAAGAC	GCTGCCTGTAATAGTTGATGTAGAAGTT

A análise relativa dos dados é expressa pela derivação da fórmula aritmética $\Delta 2^{-\Delta\Delta CT}$, de onde obtemos os níveis de expressão gênica das amostras sempre em relação à amostra calibradora, de acordo com as instruções do fabricante (*Applied BioSystems*, 2001).

Para a determinação da melhor concentração de primer a ser utilizada na reação da PCR em tempo real, foi realizado um teste variando-se a concentração do primer e com a mesma quantidade de amostra. Foram adotadas as seguintes concentrações: 150nM, 300nM, 600nM e 900nM e o critério de seleção foi a não variação de amplificação utilizando-se a menor concentração de primer possível (Tabela 5).

Tabela 5 - Características dos produtos amplificados pela PCR em tempo real e eficiência das reações.

Primer/Gene	Concentração (nM)	Temperatura de Dissociação (°C)	Produto Amplificado (pb)	Slope	Correlação	Eficiência (%)
AHSP	900nM	77	79	-3,318291	- 0,990415	100
β -actina	150nM	81	79	-3,286772	- 0,997120	100
BCR	150nM	81	67	-3,328728	- 0,995570	99,8
α -globina	150nM	84	70	-3,305979	- 0,995373	100
β -globina	600nM	81	72	-3,305297	- 0,992772	100
γ -globina	150nM	81	81	-3,306649	- 0,996554	100
GAPDH	300nM	81	89	-3,302031	- 0,995569	100
AHSP	900nM	77	79	-3,318291	- 0,990415	100

No entanto, para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutiva, são necessárias condições ótimas de reação nas quais as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo, ocorrendo duplicação do conteúdo de DNA do ciclo anterior. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10^{(-1/slope)}$, onde slope significa o coeficiente de inclinação da curva (Pfaffl, 2001; Meijerink *et al.*, 2001).

Para obtenção de uma curva de eficiência, foram realizadas reações com amostra de cDNA diluída em escala logarítmica (2×10^0 , $2 \times 10^{0,5}$, 2×10^1 ... $2 \times 10^{2,5}$) e *primer* na concentração selecionada (Tabela 5).

As amostras a serem analisadas foram quantificadas em duplicata em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas ópticas que permitem a passagem de luz. As reações foram preparadas para um volume total de 25 μ l contendo de 5ng a

250ng de cDNA de acordo com o tipo celular utilizado, primer na quantidade estabelecida e 12,5µl de SYBRGreen Master Mix PCR (Applied Biosystems).

Os dados foram coletados na forma de emissão de fluorescência durante os ciclos da reação e analisados numa forma gráfica. Para quantificação da expressão, a definição dos valores acontece com a determinação do *threshold*, que representa o momento em que o sistema detecta a fluorescência das amostras. O ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação é denominado *threshold cycle*, ou *Ct* (figura 6). Quanto maior a expressão do gene, mais precocemente ele será amplificado e, conseqüentemente, menor será o *Ct*.

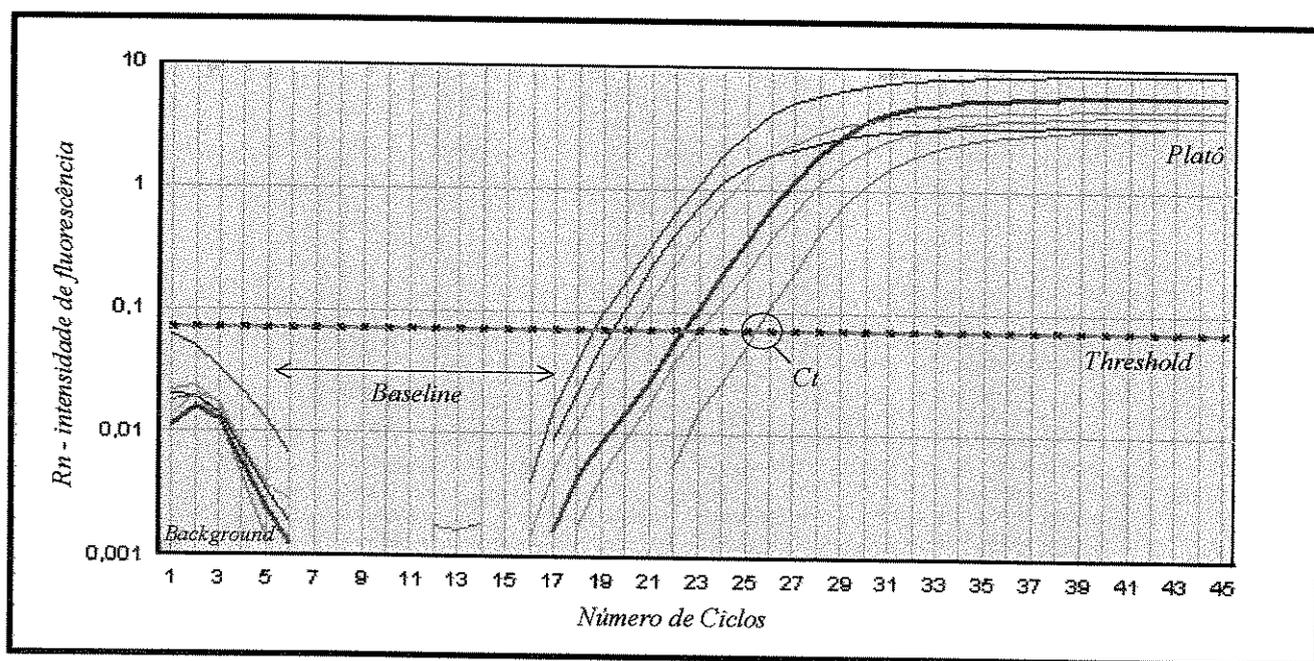


Figura 6 - Curva de amplificação de PCR quantitativo em tempo real.

A análise da morfologia das curvas indica que a reação ocorreu sem problemas. A curva deve ter uma morfologia sigmóide, mostrando a fase inicial, a fase exponencial e a fase de platô, onde a amplificação não é exponencial. Após esta análise é traçado o *threshold* e a partir dele coletados os dados em forma de *Ct*, ciclos onde a fluorescência na fase exponencial do PCR será convertida em dados de expressão gênica.

Estes dados foram exportados para uma planilha de *Excel (Microsoft Corporation)* e extraídas as médias das amostras feitas em duplicatas. A partir dessas médias, as amostras foram normalizadas com os dados do gene endógeno (beta-actina), o que consiste no primeiro passo da derivação aritmética denominado ΔCt (Ct da amostra com gene alvo menos Ct da amostra com gene constitutivo). Após a normalização dos dados, foi realizada a calibração dos mesmos utilizando as situações consideradas como referência, levando ao segundo passo da derivação aritmética denominada $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt da amostra a ser quantificada menos ΔCt da amostra calibradora). Os dados foram então normalizados, calibrados e convertidos em níveis de expressão pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde estima-se que a situação calibradora tem valor 1 (um) de expressão.

Foi realizado um controle para a certificação de que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por ampliações inespecíficas, através da análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento, que se baseia na Tm (*melting temperature*) específica de cada produto. A diferença de Tm é determinada pelo número e pela composição de nucleotídeos do produto de PCR presentes na reação. Cada gene analisado gera um *amplicon* e este uma temperatura de dissociação específica.

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 se intercala somente com DNA dupla-fita. Após o término da PCR adiciona-se uma variação da temperatura de 60°C à 95°C e logo após são coletados dados de fluorescência (Figuras 7A e 7B).

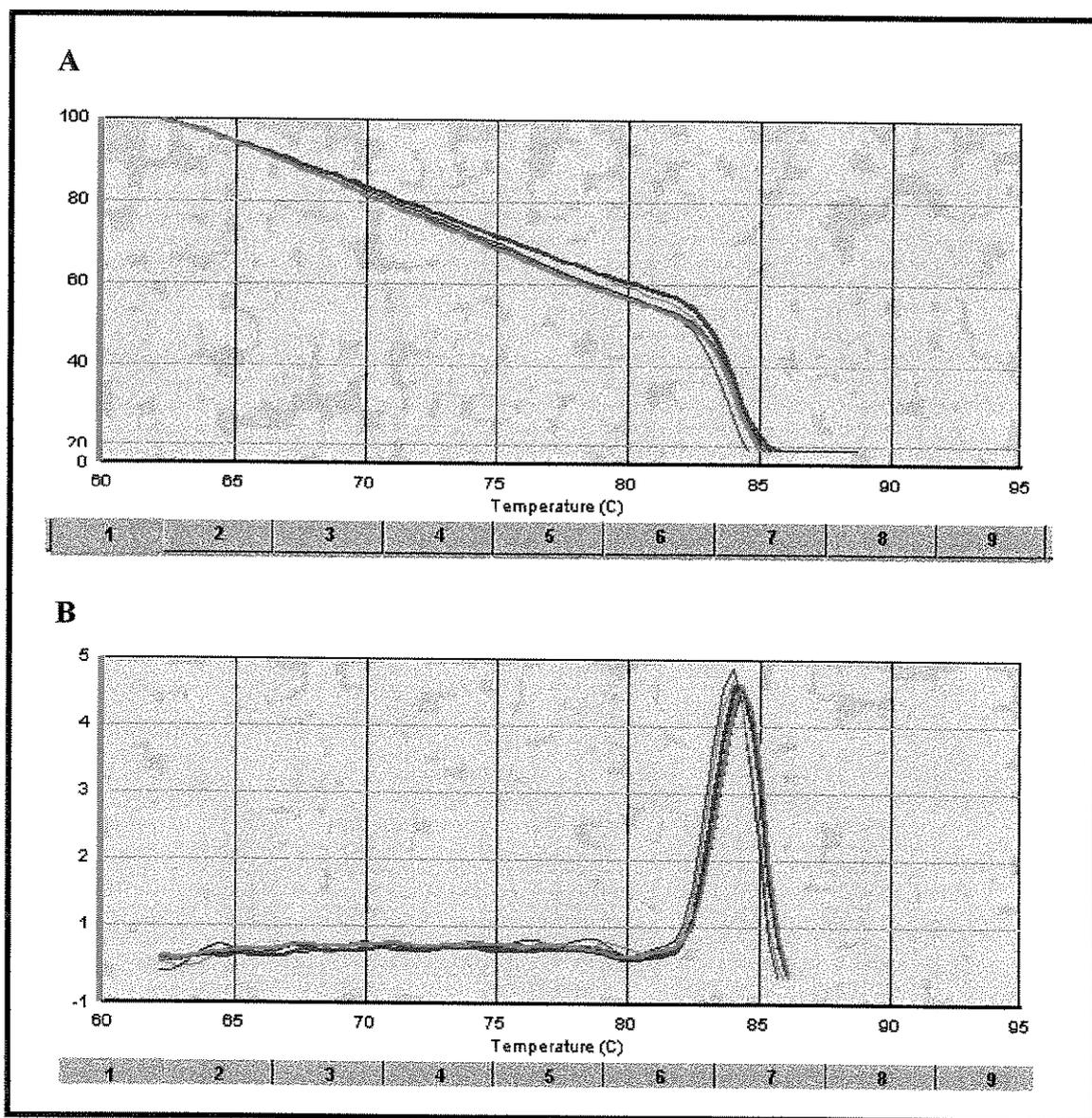


Figura 7 - Curva de dissociação de PCR quantitativo em tempo real.

Representação gráfica da derivativa negativa da curva de dissociação. A queda na fluorescência ou o pico observado na figura 7B representa a *TM* específica para cada conjunto de *primers*, e são utilizadas para analisar a ausência de contaminantes ou geração de produtos inespecíficos. (A) Representação da curva de dissociação com queda da emissão de fluorescência e (B) Derivativa negativa da representação gráfica anterior.

RESULTADOS

1. Hibridização dos oligonucleotídeos

Os dsRNAs foram obtidos a partir do pareamento de fitas simples de oligonucleotídeos. A hibridização foi confirmada através da visualização dos oligonucleotídeos em gel de poliacrilamida 10% (Figura 8).



Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% dos oligonucleotídeos hibridizados.

(M) Marcador Φ X174 RF DNA/*Hae*III Fragments (Invitrogen); (1) oligonucleotídeos hibridizados; (2) Sequência *forward* (3) Sequência *reverse*.

2. Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) em gel de agarose 2% com tampão TAE (Tris - Acetato - EDTA), corado com brometo de etídio (Figura 9).

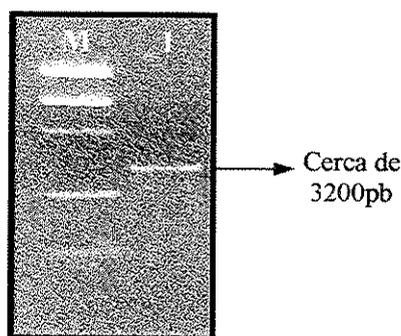


Figura 9 - Visualização do DNA plasmidial em gel de Agarose 2%.

(M) Marcador *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen); (1) Mini-Prep do DNA plasmidial.

Resultados

3. Reação de PCR para verificação da inserção da molécula interferente no plasmídeo.

Amplificação realizada com os *primers* T7 e *pSilencer 2.0* para confirmação da inserção da molécula interferente no plasmídeo. O produto amplificado (590pb) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

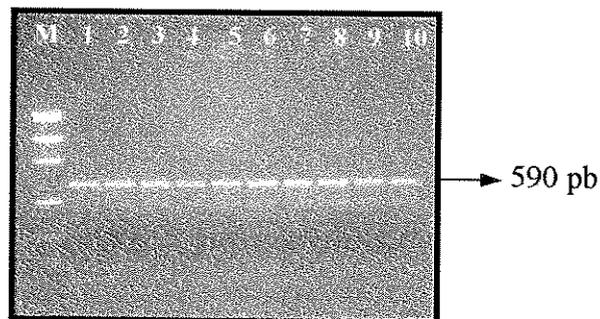


Figura 10 - Confirmação de inserção da molécula interferente no plasmídeo através da PCR.

(M) Marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen); (1-10) Clones selecionados.

4. Sequenciamento da molécula interferente.

Após a inserção no plasmídeo, a molécula foi sequenciada para confirmação da eficiência de transformação e verificação do produto a ser transfectado (Figura 11).

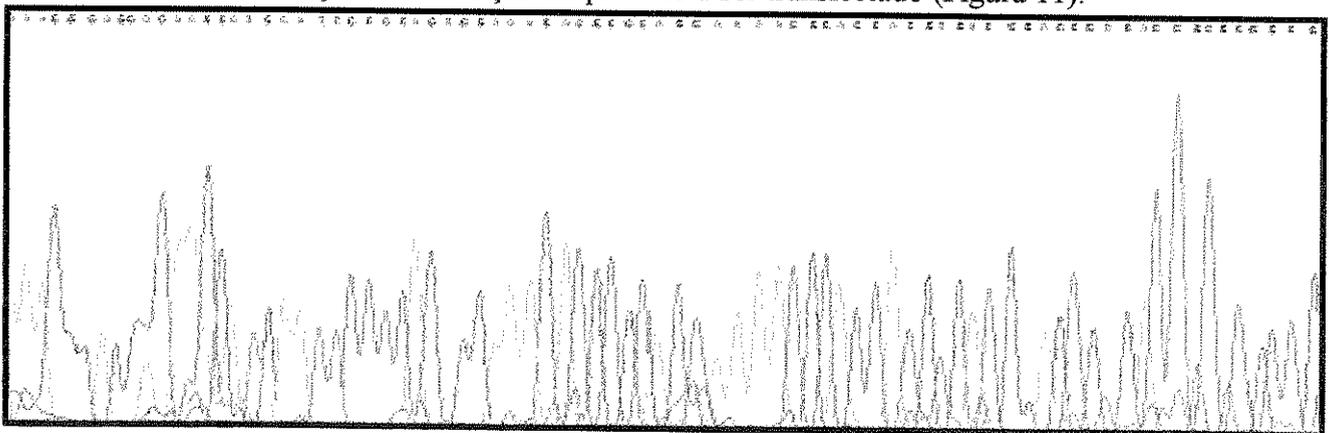


Figura 11 - Sequenciamento da molécula interferente.

5. Análise da interferência na expressão do gene AHSP

5.1. Cultura de células de linhagem K562

Cultura de células consiste em uma técnica amplamente utilizada para o estudo do metabolismo, fisiologia e desenvolvimento de células sob condições controladas; reflete o perfil *in vivo* da população celular estudada. A cultura de células K562 foi submetida à indução da diferenciação celular pela adição de Hemina (Smith *et al.*, 2000) para a análise de interferência do gene da AHSP. Os resultados obtidos não indicam uma diminuição significativa da expressão da AHSP (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 - Análise da expressão do gene AHSP durante a diferenciação celular em K562.

Após a transfecção do vetor com o dsRNA específico para a proteína, os níveis de expressão gênica da AHSP foram analisados, durante um período (até 60 horas), por PCR em tempo real em relação ao momento de transfecção (0h). Observa-se neste gráfico a interferência, com diminuição de cerca de 30% da expressão do gene AHSP, 44 horas pós transfecção. Resultados obtidos na 1ª cultura.

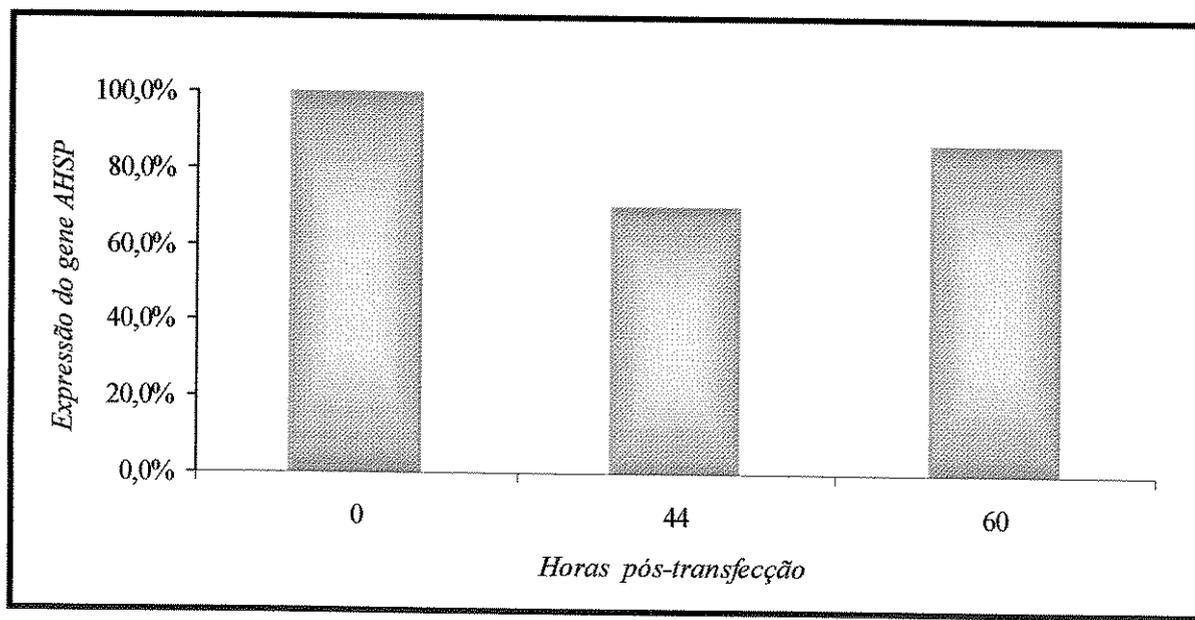
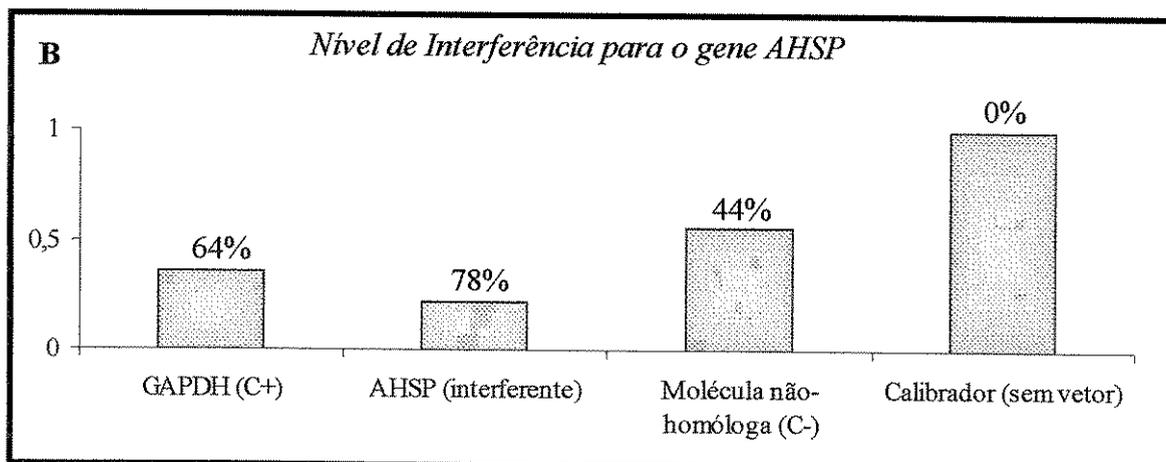
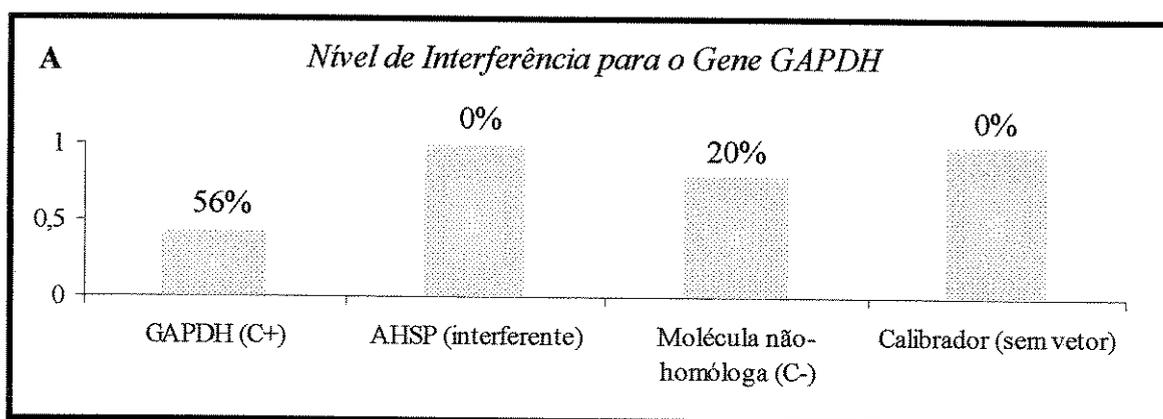


Gráfico 2 - Análise da expressão do gene GAPDH e AHSP durante a diferenciação celular em K562.

Numa 2ª cultura, foram avaliados os genes GAPDH e AHSP pós transfecção com a molécula interferente. **(A)** Amostras avaliadas demonstrando a porcentagem de interferência para o gene GAPDH, nas transfecções realizadas; **(B)** Amostras avaliadas demonstrando a porcentagem de interferência para o gene AHSP, nas transfecções realizadas.



6. Sequenciamento do Gene AHSP

Este procedimento foi utilizado para confirmação da mutação no códon 75 do gene AHSP, onde há a substituição de uma Asparagina (AAC) por uma Isoleucina (ATC) (Dos Santos, 2004), para utilização na cultura eritróide em duas fases. A seqüência obtida foi alinhada contra a seqüência do mRNA depositada no GenBank (número de acesso NM_016633).

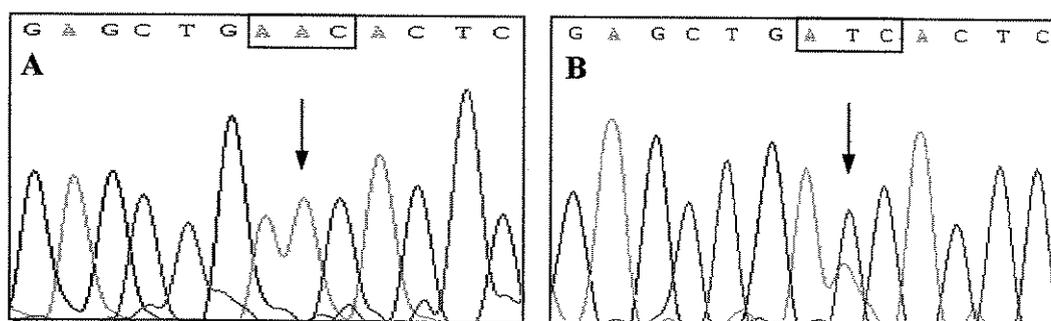


Figura 12 - Sequenciamento do éxon 3 do gene AHSP.

(A) Amostra utilizada como controle e (B) Amostra utilizada como mutante

7. Cultura líquida de duas fases dos progenitores eritróides

O sistema de cultura líquida em duas fases envolve o crescimento e a maturação de progenitores eritróides humanos. O cultivo de células mononucleares do sangue periférico em meio de cultura contendo os componentes necessários ao seu desenvolvimento permitiu a análise da expressão gênica dos genes em estudo, através da extração do RNA destas células e posterior transcrição.

A integridade das amostras pode ser verificada através da eletroforese em gel de agarose representada na figura 13.

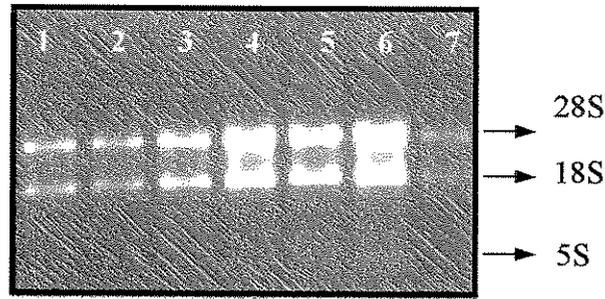
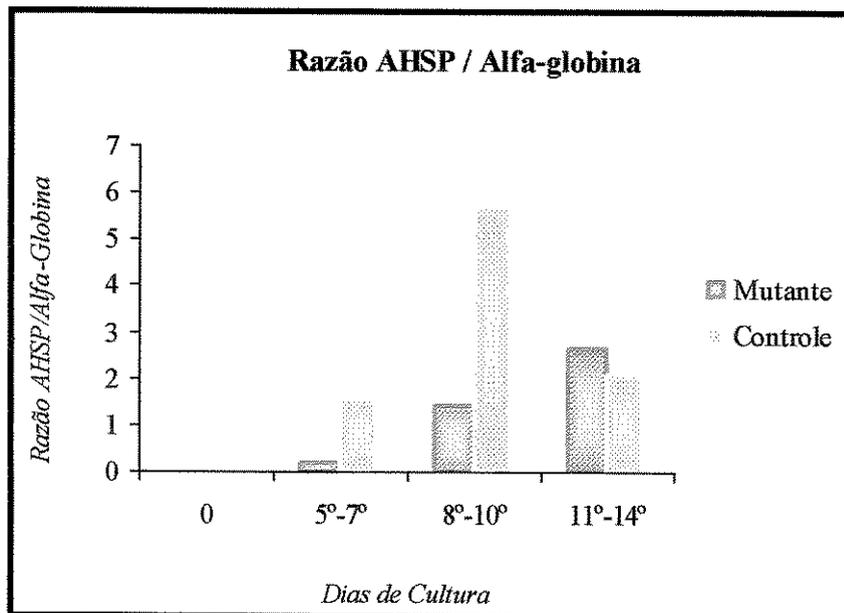


Figura 13 - Eletroforese da amostra de RNA total em gel de agarose denaturante. Amostras extraídas de cultura de K562 em diferentes horas de coleta. A figura demonstra a qualidade do RNA.

7.1. Análise da expressão gênica durante a diferenciação eritróide

Estes dados sugerem que na fase intermediária (8^o ao 10^o dia) da cultura a produção de AHSP mutante poderia estar reduzida quando comparada ao controle, demonstrado no gráfico 3 pela razão AHSP:Alfa-Globina.

Gráfico 3 - Razão da Expressão entre os Genes AHSP e Alfa-Globina durante a diferenciação eritróide.



8. Quantificação de HbF por Citometria de Fluxo

8.1. Cultura de células de linhagem K562

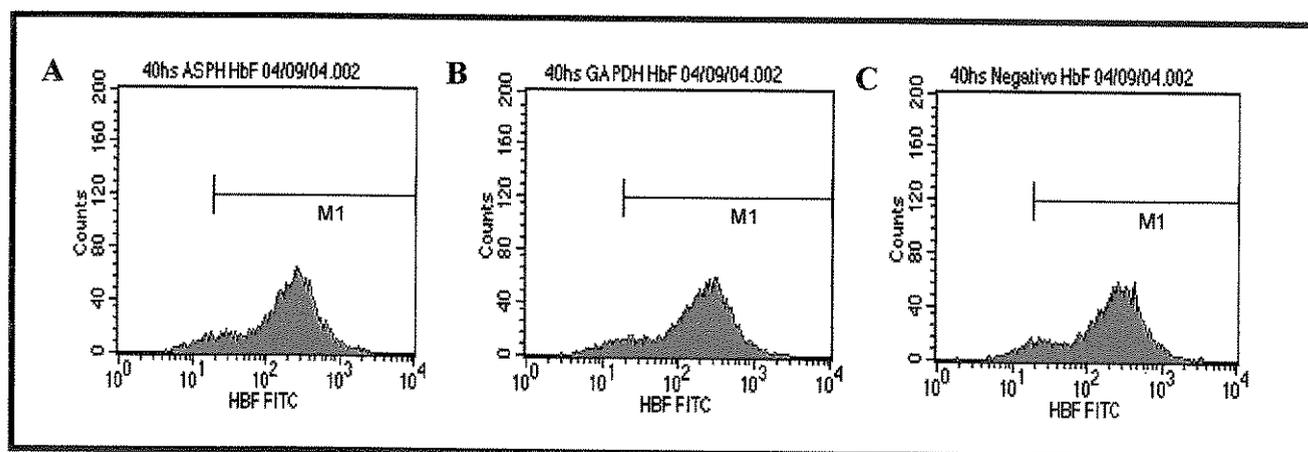
Na citometria de fluxo observou-se que a molécula interferente não exerceu influência no número de células portadoras de HbF, nem foi responsável pelo aumento da intensidade de fluorescência na população de células HbF positivas (Gráfico 5 e Tabela 6).

Tabela 6 - Dados adquiridos no citômetro de fluxo.

Cultura de Células	Células Positivas para HbF	Intensidade de Fluorescência
AHSP	86%	190.09
Controle positivo	87%	191.26
Controle Negativo	89%	159.66

Gráfico 4 - Expressão dos marcadores de membrana por Citometria de Fluxo.

A análise da diferenciação celular por citometria de fluxo em células K562, tratadas com Hemina, no tempo de 40hs em relação a transfecção. (A) Marcação para o Gene AHSP, (B) Marcação para o Gene GAPDH (C) Marcação para o Controle Negativo.



9. Análise da Morfologia Celular durante a Diferenciação Eritróide.

Células mononucleares coletadas nos diferentes tempos da fase II da cultura foram fixadas em lâminas de microscopia através de centrifugação (*citospin*) e coradas com Leishman (1000X) para o acompanhamento da diferenciação celular.

A análise da morfologia celular demonstrou células de linhagem eritróide desde a fase de blastos até os estágios finais de diferenciação. Não observamos diferenças na morfologia das células durante a diferenciação eritróide da amostra mutante em relação à amostra controle.

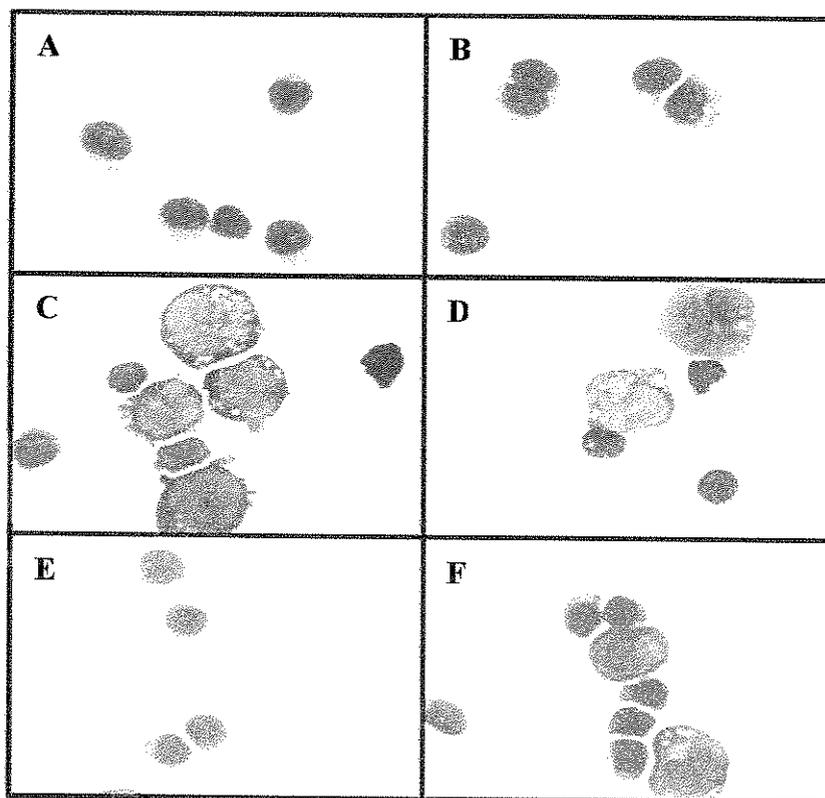


Figura 14 - Células eritróides em diferentes tempos da fase II da cultura.

(A) Amostra Controle 0h; **(B)** Amostra Mutante 0h; **(C)** Amostra Controle 192h; **(D)**

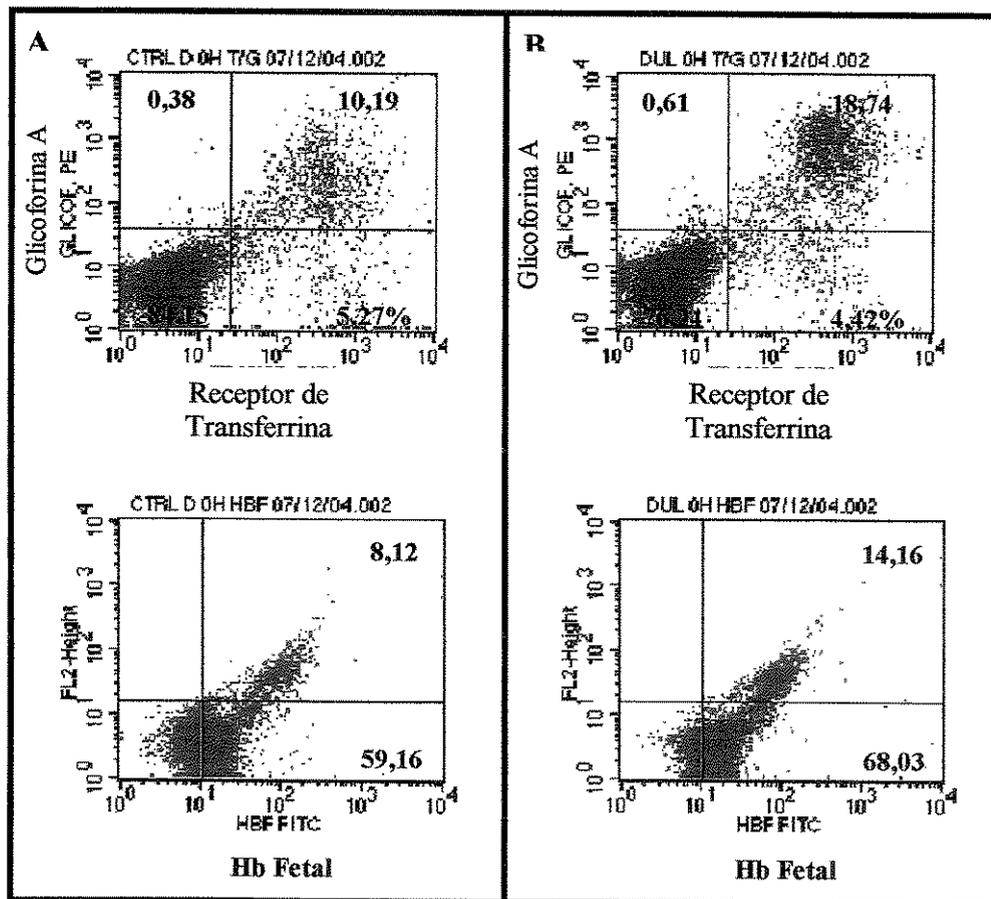
Amostra Mutante 192h; **(E)** Amostra Controle 240h; **(F)** Amostra Mutante 240h.

10. Expressão dos marcadores de Glicoforina A e Receptor de transferrina

A análise quantitativa da expressão dos marcadores de superfície celular, demonstrada através da porcentagem de células positivas para a Glicoforina A e de células positivas para Receptor de Transferrina, nos permitiu observar a diferenciação dos progenitores eritróides em cultura líquida de duas fases. Os dados estão expressos na forma de gráficos de pontos (Gráficos 5A e 5B).

Gráfico 1 - Citometria de fluxo de precursores eritróides no tempo 0 hora.

(A) Representação gráfica para a amostra controle; (B) Representação gráfica para a amostra mutante. Não houve diferença no padrão dos marcadores de superfície celular entre mutante e controle.



Resultados

Gráfico 6 - Citometria de fluxo de precursores eritróides no tempo 72 horas.

(A) Representação gráfica para a amostra controle; (B) Representação gráfica para a amostra mutante. Não houve diferença no padrão dos marcadores de superfície celular entre mutante e controle.

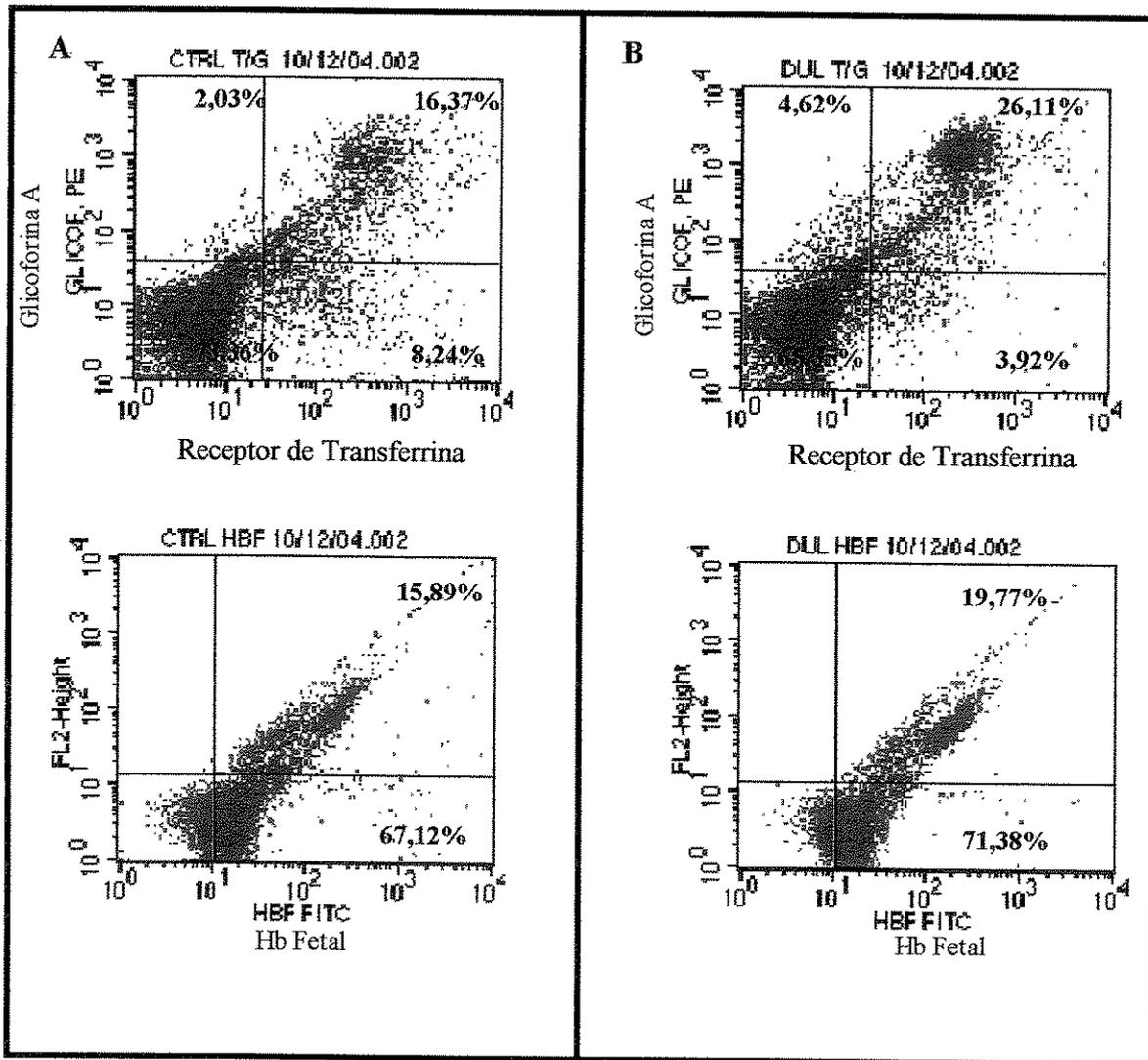


Gráfico 7 - Citometria de fluxo de precursores eritróides no tempo 144 horas.

(A) Representação gráfica para a amostra controle; (B) Representação gráfica para a amostra mutante. Observamos que a partir deste tempo, há um aumento na expressão do receptor de transferrina nas células do controle em relação ao mutante, indicando a presença de maior número de células jovens, podendo ser observado até o final da diferenciação eritróide.

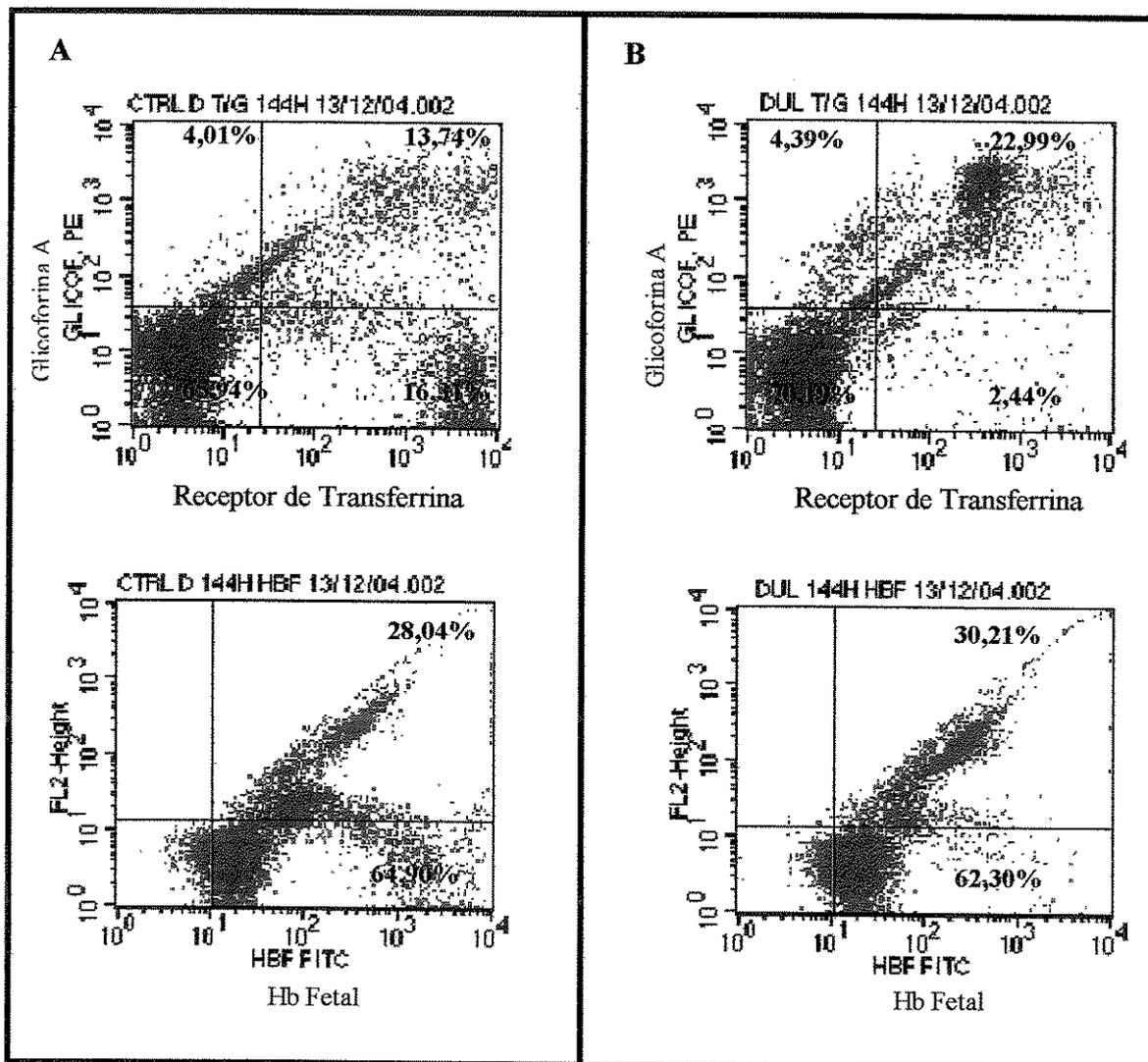


Gráfico 8 - Citometria de fluxo de precursores eritróides no tempo 192 horas.

(A) Representação gráfica para a amostra controle; (B) Representação gráfica para a amostra mutante.

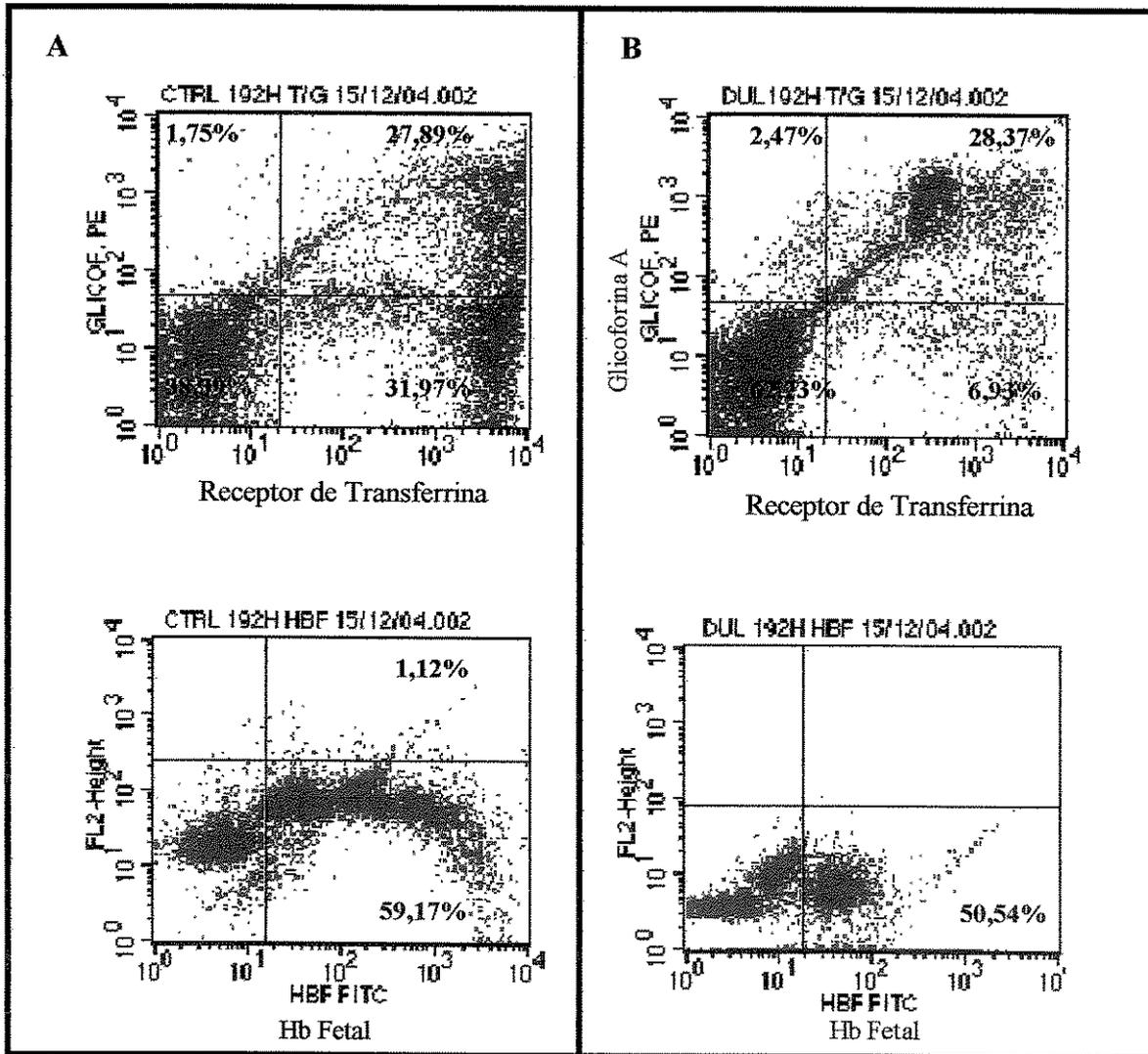


Gráfico 9 - Citometria de fluxo de precursores eritróides no tempo 240 horas.

(A) Representação gráfica para a amostra controle; (B) Representação gráfica para a amostra mutante.

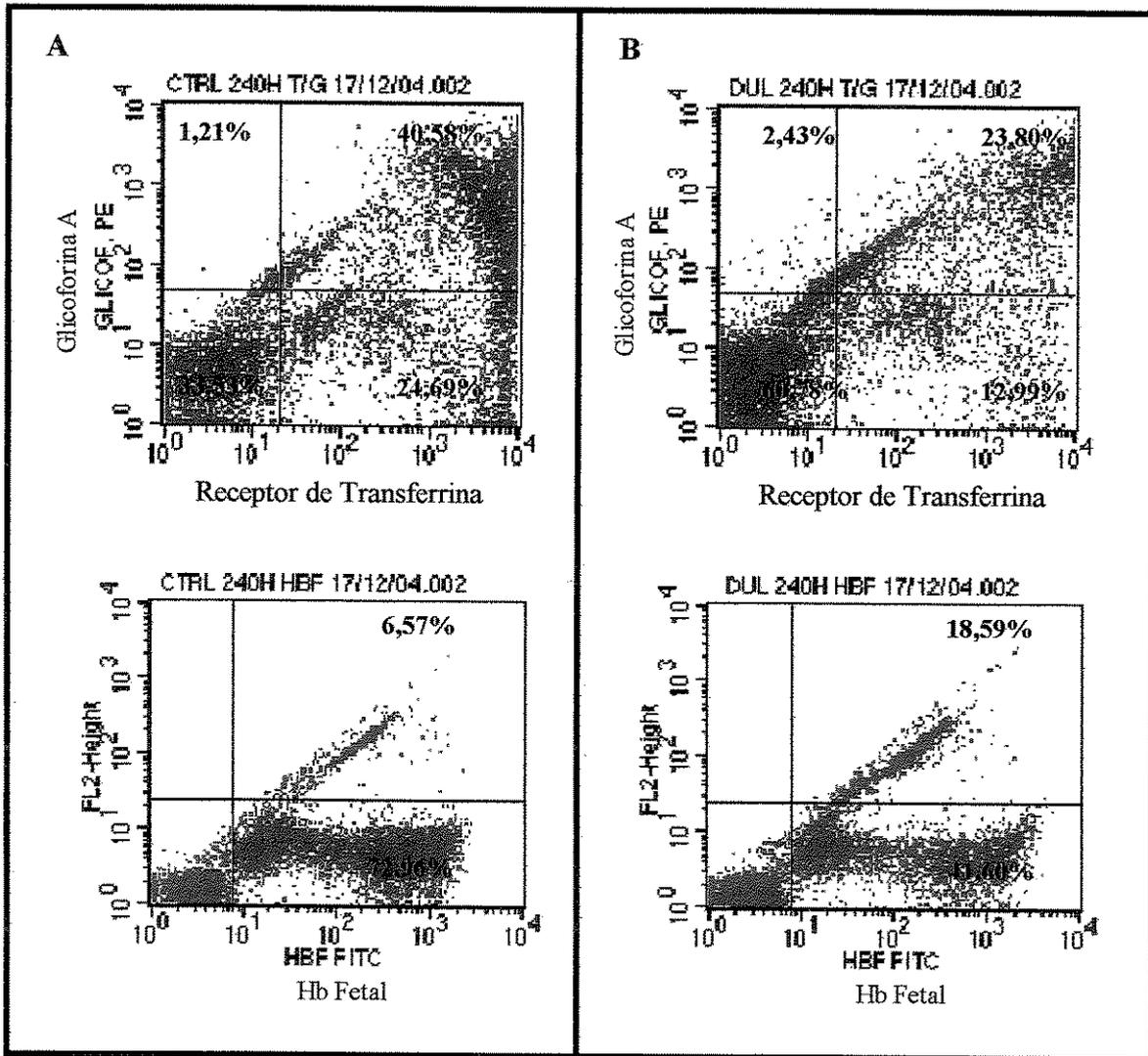
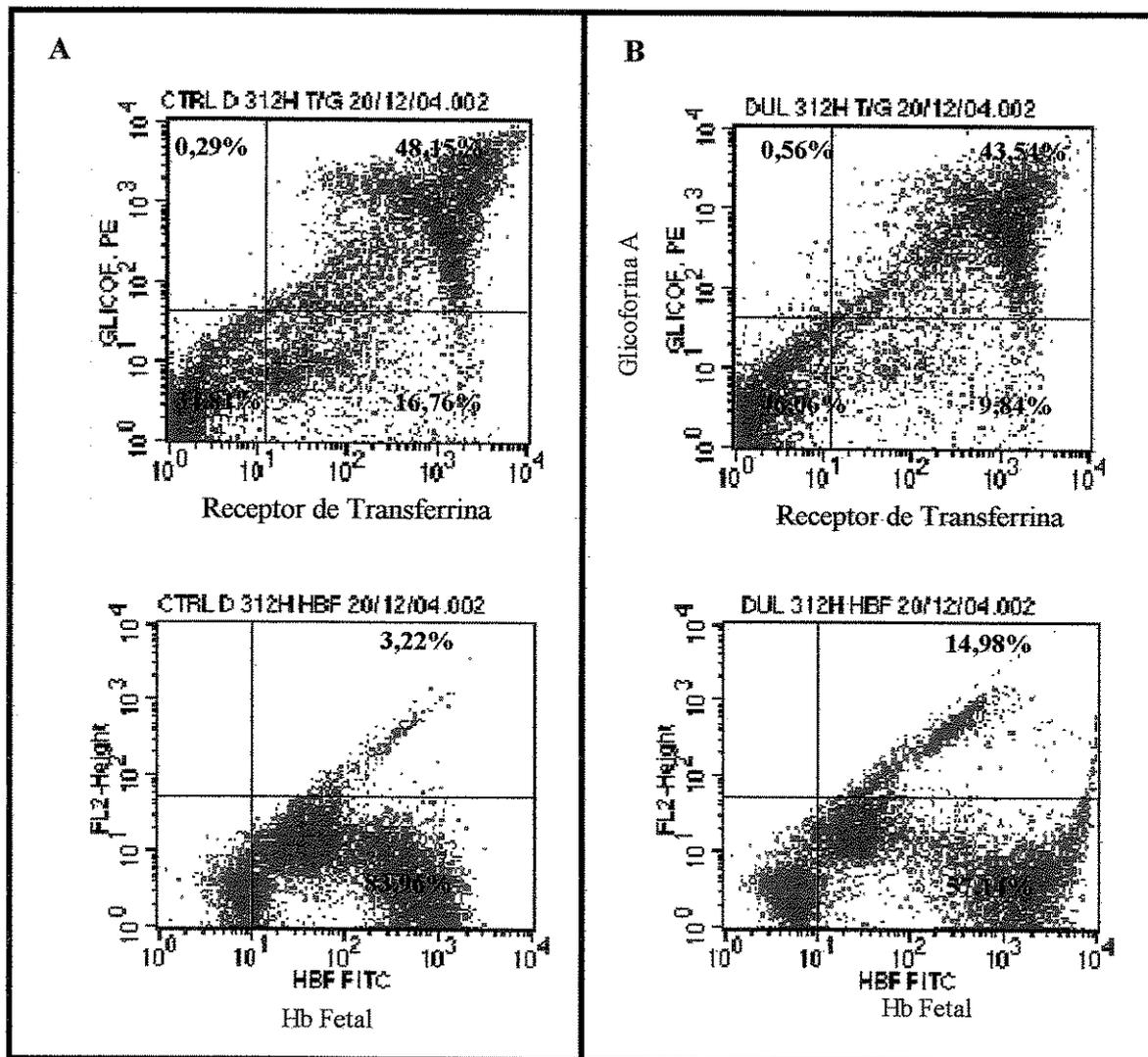


Gráfico 10 - Citometria de fluxo de precursores eritróides no tempo 312 horas.

(A) Representação gráfica para a amostra controle; (B) Representação gráfica para a amostra mutante.



DISCUSSÃO

A AHSP é uma proteína específica da linhagem eritróide, que parece atuar como uma chaperona molecular para α -globina (Kihm *et al.*, 2001). Gell *et al.*, (2002) confirmaram em camundongos a propriedade da AHSP em formar complexos estáveis ao ligar-se especificamente às α -globinas, neutralizando os efeitos deletérios da precipitação de cadeias α durante a eritropoese normal e possivelmente melhorando estados patológicos onde a precipitação de cadeias α leva ao dano nos eritrócitos. Recentemente foi demonstrado que a AHSP está sendo constantemente expressa durante a diferenciação celular, possivelmente promovendo a estabilidade de cadeias α , com um aumento progressivo de expressão nos estágios do desenvolvimento eritróide em que há maior metabolismo celular, confirmando uma importante função da AHSP durante a eritropoese (Dos Santos *et al.*, 2004).

O domínio de técnicas relacionadas com o melhor conhecimento do DNA passou a possibilitar o diagnóstico pré-natal de anomalias genéticas e a identificação dos portadores de genes de risco, sendo o resultado importante não apenas para a β -talassemia, onde há a redução ou ausência na produção de cadeias β , levando ao aumento e conseqüentemente à precipitação de cadeias α no interior das hemácias, mas também para outras doenças para as quais se buscam benefícios terapêuticos.

A RNAi é um processo de silenciamento gênico específico iniciado por um dsRNA homólogo a uma seqüência presente no gene a ser silenciado (Guo *et al.*, 1995). A técnica parece ser promissora para o estudo de função gênica e tem demonstrado grande eficiência em diferentes linhagens de células humanas (Sui *et al.*, 2002) e em estudos, *in vitro*, de células de mamíferos.

As moléculas siRNAs são capazes de reconhecer e degradar mRNAs através da complementariedade de bases no processo celular de RNAi. O método utilizado neste trabalho para gerar siRNAs, baseado no vetor de expressão pSilencer 2.0-U6 para transcrição *in vivo* da molécula interferente, contém o promotor U6 humano que foi extensivamente usado para expressar siRNAs em células de mamíferos (Paul *et al.*, 2002). Uma vez inserido nas células o siRNA é expresso e se torna funcional.

O processo de introdução de ácidos nucleicos em células por métodos não virais é definido como transfecção. As técnicas desenvolvidas para a transferência de genes podem ser classificadas como: métodos químicos, como a introdução por lipossomos artificiais, sistema menos traumático para células, sendo utilizado principalmente em células do tipo aderente, ou físicos, como a eletroporação, método utilizado neste projeto por ser bastante descrito na literatura o seu uso com a linhagem celular K562.

A interferência de RNA com 100% de eficiência objetivada neste estudo para que pudéssemos confirmar a relação bioquímica da proteína AHSP com a cadeia α da hemoglobina não foi obtida. Vários fatores podem ter influenciado os resultados finais: (1) o desenho dos oligos que poderiam gerar moléculas com interferência de até 50% (Khvorova, 2003); (2) a transfecção com o vetor, após análise de toxicidade, mostrou-se imprópria para ser utilizado em células de mamíferos, por provocar cerca de 90% de morte celular após 24 horas de sua realização, podendo estar relacionada ao método de purificação do vetor (QIAGEN®Plasmid Mega kit) que não elimina contaminação por endotoxinas bacteriana; (3) o fato do vetor não apresentar um mecanismo de seleção por transfecção, que exclui células que não possuem vetor como, por exemplo, sítios em sua sequência de DNA que codifique uma proteína que confira resistência às células que possuem o vetor.

Diante destes fatores, muitas culturas de células de linhagem eritroleucêmica K562, tratadas com 30 μ M de Hemina, agente indutor de produção de hemoglobina fetal, foram realizadas na tentativa de padronizar as condições ótimas permitidas de interferência.

Duas culturas foram realizadas com relativo sucesso. Com a primeira pudemos avaliar o período de cultivo necessário para constatar a interferência do gene AHSP, revelando cerca de 30% de interferência de dsRNA. Na segunda, de acordo com a literatura, 3 sequências clonadas que constituem: (1) controle negativo, uma sequência não homóloga ao genoma de mamífero; (2) controle positivo, a sequência do gene da GAPDH e (3) a sequência do gene AHSP foram introduzidas nas células por transfecção através de eletroporação. Utilizamos também células eletroporadas sem vetor, como controle do processo de transfecção.

Com relação aos dados demonstrados no gráfico 2, avaliando a expressão do gene GAPDH, o controle positivo teve 56% de interferência para o gene homólogo e o gene AHSP não sofreu interferência; resultados considerados satisfatórios. No entanto, o plasmídeo com inserto não homólogo (controle negativo) induziu uma interferência de 20% para o gene GAPDH, o que não era esperado, podendo sugerir um artefato da técnica.

No gráfico 3, a amostra transfectada com a sequência clonada do AHSP teve interferência de 78% para o gene homólogo. Mas, em contrapartida, os controles também apresentaram interferência; com índices de 64% e 44% para o gene GAPDH e controle negativo, respectivamente.

Não há uma única explicação para justificar os resultados acima descritos, mas um conjunto de fatores podem ter influenciado na obtenção destes dados, desde a escolha dos oligonucleotídeos até a linhagem celular, que apresenta baixa expressão para o gene AHSP.

Com relação ao segundo objetivo proposto, avaliamos através da PCR em tempo real, a expressão dos genes AHSP e α -globina, durante a diferenciação eritróide em cultura líquida de duas fases, de uma amostra denominada mutante (doador que apresenta a mutação no códon 75 do gene AHSP – Dos Santos, 2004) e uma amostra controle (doador sem a mutação descrita acima), seqüenciadas previamente.

Observamos um perfil de expressão dos genes α -globina e AHSP semelhante quando comparado aos resultados obtidos previamente por Dos Santos *et al.* 2004, no entanto o pico de expressão de α -globina foi no 8º ao 10º dia de cultura no trabalho citado, ao passo que a amostra controle apresentou uma expressão maior de α -globina na fase final de diferenciação celular (11º ao 14º dia), justificada pela análise da citometria de fluxo na qual essa amostra apresenta um padrão de diferenciação celular tardio, indicado por um elevado número de células positivas para o receptor de transferrina, bem como um maior número de células F, caracterizando a presença de células jovens.

Contudo, a amostra que possui a mutação no códon 75 do gene AHSP, na qual ocorre a substituição de uma asparagina por uma isoleucina, apresentou um padrão semelhante ao descrito por Dos Santos no seu estudo com cultura de duas fases controle.

A análise da expressão do gene AHSP mostrou padrões diferentes entre células com e sem a mutação, principalmente no tempo intermediário da cultura (8º ao 10º dia). A expressão de AHSP parece ser reduzida nas células com mutação. Este fato, se confirmado, indicaria que a mutação, de alguma forma, poderia reduzir a expressão gênica. No entanto, este fato não parece afetar a produção de hemoglobina fetal, como demonstrado pelo estudo da citometria de fluxo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que:

- ✧ Não houve a interferência esperada do gene AHSP nas condições testadas, já que os valores apresentados demonstraram que a expressão do gene estava diminuída tanto no controle positivo, quanto no controle negativo; sugerindo uma melhor avaliação das condições propostas para o procedimento, conforme discutido anteriormente.

- ✧ Em cultura líquida de 2 fases da amostra mutante para o códon 75 do gene AHSP, através da análise de citometria de fluxo, o número de células positivas para o receptor de transferrina diminui durante a diferenciação eritróide, no entanto, a quantidade de hemoglobina fetal por célula, avaliada pela intensidade de fluorescência emitida, aumenta. Da mesma forma, os dados indicam uma possível redução na expressão do gene AHSP nos estágios intermediários de diferenciação celular quando avaliada por PCR em tempo real. Uma possibilidade para este fato seria uma interferência da mutação na expressão gênica ou estabilidade do RNA mensageiro.

- ✧ Estes dados necessitam confirmação em maior número de casos e entre tipos de mutações espontâneas ou induzidas *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUMMELKANP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.* **Science**, 296: 550-553, 2002.
- BUSTIN, S. A. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.* **Journal of Molecular Endocrinology**, 25:169-93, 2000.
- CHIU, Y. RANA, T. M. *RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA.* **Molecular Cell**, 10: 549 – 561, 2002.
- CIOCA, D.P., AOKI, Y., KIYOSAWA, K. *RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines.* **Cancer Gene Therapy**, (10) 2: 125-133, 2003.
- COLLINS F.S., WEISSMAN S.M. *The molecular genetics of human hemoglobin.* **Process in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, 31: 315-465, 1984.
- COSTA, F.F.; ZAGO, M. A. *Bone marrow and peripheral blood globin chain synthesis in sickle cell beta zero thalassaemia.* **Journal of Medical Genetics**, 23(3):252-255, 1986.
- DOS SANTOS, C. O. **Estudo da Expressão do Gene AHSP (*Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein*) na Diferenciação de Eritrócitos em Cultura e em Pacientes com Beta-Talassemia** - Campinas, 2004. (Dissertação - Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- DOS SANTOS, C. O., DUARTE, A. S., SAAD, S. T., AND COSTA, F. F. *Expression of alpha-hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis.* **Experimental Hematology**, 32: 157-162, 2004.

- ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YACIN, A.; WEBER, K.; TSCHI, T. *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.* **Nature**, 411: 494 – 498, 2001.
- ELLIS, R.J.; VAN DER VIES, S.M. *Molecular chaperones.* **Annual Review of Biochemistry**, 60: 321-347, 1991.
- FENG, L.; GELL, D. A.; ZHOU, S.; GU, L.; KONG, Y.; LI, J.; HU, M.; YAN, N.; LEE, C.; RICH, A. M.; ARMSTRONG, R. S.; LAY, P. A.; GOW, A. J.; WEISS, M. J.; MACKAY, J. P.; SHI, Y. *Molecular mechanism of AHSP-mediated stabilization of alpha-hemoglobin.* **Cell**, 119: 629-640, 2004.
- FORGET, B. G. *Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin.* **Annals of The New York Academy of Sciences**, 858: 38-44, 1998.
- GELL, D.; KONG, Y.; EATON, S. A.; WEISS, M. J.; MACKAY, J. P. *Biophysical characterization of the α - Globin binding protein α - haemoglobin stabilizing protein.* **The Journal of Biological Chemistry**, 277: 40602-40609, 2002.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., AND WATSON, R. 1993. *Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions.* **Biotechnology**, 11:1026–1030, 1993.
- HOFFMAN, R., BENZ, E. J. SHATTIL, A. J., FURIE, B. COHEN, H. J. **Hematology – Basic principles and practices.** Churchill Livingstone Inc, p. 252-300, 1991.
- KIHM, A. J., KONG, Y., HONG, W., RUSSEL, J. E., ROUDA, S., ADACHI, K., SIMON, M. C., BLOBEL, G. A., AND WEISS, M. J. *An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin.* **Nature**, 417: 758-763, 2002.

- KOLLIA P., FIBACH E., NAJJAR S.M., SCHECHTER A.N., NOGUCHI C.T.
Modifications of RNA processing modulate the expression of hemoglobin genes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93: 5693-5698, 1996.
- KONG, Y.; ZHOU, S.; KIHM, A. J.; KATEIN, A. M.; YU, X.; GELL, D. A.; MACKAY, J. P.; ADACHI, K.; FOSTER-BROWN, L.; LOUDEN, C. S.; GOW, A. J.; WEISS, M. J. *Loss of alpha-hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates beta-thalassemia. The Journal of Clinical Investigation*, 114: 1457-1466, 2004.
- KHVOROVA, A., LESCOUTE, A. WESTHOF, E., JAYASENA, S.D. *Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. Nature Structural & Molecular Biology*, 9:708-712, 2003.
- MACMANUS, M. T.; SHARP, P. A. *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nature Reviews Genetics*, 3: 737-746, 2002.
- MEIJERINK, J., MANDIGERS, C., VAN DE LOCHT, L., TONNISSEN, E., GOODSID, F. AND RAEMAEEKERS, J. *A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. The Journal of Molecular Diagnostics*, 3, 55–61, 2001.
- MIELE, G.; MANSON, J.; CLINTON. *A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. Nature Medicine*, 7: 361 – 3664, 2001.
- OLIVEIRA D. M., GOODELL, M. A. *Transient RNA interference in hematopoietic progenitors with functional consequences. Gênesis*, 36(4):203-208, 2003.
- PADDISON PJ, CAUDY AA, HANNON GJ. *Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(3):1443-1448, 2002

- PAUL, C.P., GOOD P.D., WINER I., ENGELKE, D.R. *Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nature Biotechnology*, 20: 505–508, 2002.
- PFAFFI MW, *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research*, 29:2002–2007, 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*, 31:156 –165, 1999.
- 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. European Journal Haematology*, 64: 292-303, 2000.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. COULSON, A R. *DNA sequencing with chain inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 618-619, 1977.
- SMITH, RD; MALLEY, JD; SCHECHTER, AN. *Quantitative analysis of globin gene induction in single human erythroleukemic cells. Nucleic Acids Research*, 24: 4998-5004, 2000.
- STAMATOYANNOPOULOS, G.; MAJERUS, P. W.; PERLMUTTER, R.M. VARMUS, H. **The molecular basis of blood diseases.** W.B Saunders Company. p. 199 - 211
- SUI, G.; SOOHO, C.; AFFAR, E.;GAY, F.; SHI, Y.; FORRESTER, W. C.; SHI, Y. *A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 5515 – 5520, 2002.
- TAKAHASHI, S.; KOMENO, T.; SUWABE, N.; YOH, K.; NAKAJIMA, O.; NISHIMURA, S. *Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroide and megakaryocytic cells in vivo. Blood*, 92: 434-442, 1999.

- TANG, X. B., LIU, D.P., LIANG, C. C. Regulation of factor GATA-1 at the gene and protein level. **Cellular and molecular life Sciences**. 58: 2008-2017, 2001
- WANG, Q. C., NIE Q. H., FENG, Z. H. *RNA interference: Antiviral weapon and beyond* **World Journal of Gastroenterology**, 9(8):1657-1661, 2003.
- WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J.B. **The Thalassaemia Syndromes**. Blackwell. Science, 2001. p.287-326
- WICKRAMASINGHE S.N., HUGHES M. Ultrastructural studies of erythropoiesis in β -thalassaemia trait. **British Journal of Haematology**, 46: 401- 407, 1980.
- WILDA, M. FUCHS, U.; WÖSSMANN, W. BORKHARDT, A. *Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by interference (RNAi.)* **Oncogene**, 21: 5716 –5724, 2002.
- ZAGO, M. A. Talassemias. In Zago, M. A., Falcão, P. R., Pasquini, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 310-314.
- ZOUEVA, O. P.; RODGERS, G. P. *Inhibition of β protein 1 expression enhances β -globin promoter activity and β -globin mRNA levels in the human erythroleukemia (K562) cell line.* **Experimental Hematology**, 32: 700–708, 2004.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Estudo do gene AHSP (*Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein*) em células eritropoéticas

Investigador principal: Aida Gomes de Freitas

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa, cujo objetivo geral é induzir o estudo da expressão do gene AHSP para analisar os efeitos dessa ausência em pessoas normais.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA:

Esses estudos poderão levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado sobre o quadro clínico da β -talassemia. Autorizo o Hemocentro da UNICAMP a utilizar o sangue que doarei para o que for necessário, incluindo o aproveitamento de uma porção do meu sangue, que é normalmente descartada, para pesquisas nessa instituição. Entendo que a participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar de qualquer pesquisa. O meu material será utilizado apenas para este estudo.

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a aluna de mestrado **Aida Gomes de Freitas (Fone: 3788-8611)**, pesquisadora responsável pelo estudo ou Prof. **Dr. Fernando Ferreira Costa (Fone: 3788-8734)**, médico responsável pelo estudo, ambos do Hemocentro – UNICAMP. Posso desistir de participar desse estudo em qualquer momento e se tiver reclamação sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, telefone (19) 3788-8936**.

O sigilo será mantido durante todo o estudo através da utilização de um código para a identificação dos indivíduos participantes e que toda a informação médica, assim como o resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa serão submetidos aos regulamentos das instituições participantes, referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

PROCEDIMENTO:

Os riscos associados à doação de sangue são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas no local da coleta. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta normal de sangue, geralmente da veia do braço, procedimento realizado por profissional treinado e devidamente habilitado. O material usado será descartável.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Estudo do gene AHSP (*Alpha Haemoglobin Stabilizing Protein*) em células eritropoéticas

Investigador principal: **Aida Gomes de Freitas**

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante

Assinatura do participante

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável. Declaro que todo o material e dados obtidos serão utilizados apenas neste protocolo de pesquisa e que esta foi submetida à aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Assinatura do pesquisador