

MÁRCIA REGINA DE SOUZA COSSA WENNING

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM
RETICULÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA DA
HEMOGLOBINA H**

CAMPINAS

2007

MÁRCIA REGINA DE SOUZA COSSA WENNING

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM
RETICULÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA DA
HEMOGLOBINA H**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Fisiopatologia Médica, na área de
concentração em Medicina Experimental.

ORIENTADORA: PROF^a DR^a MARIA DE FÁTIMA SONATI

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a MARICILDA PALANDI DE MELLO

CAMPINAS

Unicamp

2007

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

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

W487e Wenning, Márcia Regina de Souza Cossa
Expressão gênica diferencial em reticulócitos de pacientes com
doença da hemoglobina H / Márcia Regina de Souza Cossa Wenning.
Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Maria de Fátima Sonati
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Globina alfa. 2. Talassemia alfa. 3. Fosfatidilinositol 4-
fosfato-5-quinase. 4. Hemoglobin H disease I. Sonati, Maria de
Fátima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Differential gene expression in reticulocytes of
Hemoglobin H disease patients**

Keywords: • Alpha globin
• α -Thalassemia
• Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
• Hemoglobin H disease

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati
Prof Dr Edmilson Ricardo Gonçalves
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Prof Dr Aderson da Silva Araújo
Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

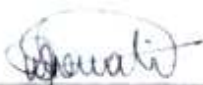
Data da defesa: 30 - 07 - 2007

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria de Fátima Sonati

Membros:

Professora Doutora Maria de Fátima Sonati



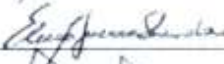
Professora Doutora Carmen Silvia Passos Lima



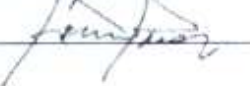
Professor Doutor Edmilson Ricardo Gonçalves



Professora Doutora Elvira Maria Guerra Shinohara



Professor Doutor Aderson da Silva Araújo



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

Data: 30/07/2007

*Dedico este trabalho,
Ao Eduardo, meu filho
Ao Carlos, meu esposo
Eurydice, meu pai..*

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Maria de Fátima Sonati, pela grande competência e dinamismo na orientação ao longo da pós-graduação.

À Profa Dra Maricilda Palandi de Mello, pela co-orientação e colaboração pacientemente oferecida no início desse trabalho.

À Banca Examinadora, por dedicarem seu tempo na avaliação crítica da tese.

À Maria Lucila H. Macedo e Fernanda Soardi, pela pronta ajuda com o *Differential Display*.

Ao Tiago Gomes de Andrade, pelo auxílio com a Biblioteca Subtrativa.

À Dulcinéia Martins de Albuquerque, com grande reconhecimento, pela ajuda em vários momentos desse projeto.

À Carolina Lanaro e Shelley, pela colaboração em várias oportunidades.

Ao Anderson Cunha, pelas sugestões e críticas oportunas.

Ao Marcelo, do Laboratório de Genômica e Expressão do Instituto de Biologia da Unicamp, pela análise bioinformática dos dados.

Aos colegas do laboratório de Hemoglobinopatias, Daniela, Tânia, Magnun, Fernanda, Vânia, Denise, Elza, Andréa e Susan, pela colaboração em muitos momentos e também pela agradável convivência durante todos esses anos.

Aos colegas do Hemocentro, Camila Oresco, Carla, Angela, Helô, Lena, Flávia Costa, Flávia Pinho e Marcos, pela ajuda em várias oportunidades e pela amizade.

Aos meus amigos da PUC-Campinas, Márcia, Cris, Lúcia, Sheila, Neusa, Dulce, pelo grande apoio e incentivo.

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

A todos que de alguma forma contribuíram para sua realização.

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	19
2- OBJETIVOS	28
3- MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1- Amostras Biológicas	31
3.2- Extração de RNA	33
3.3- <i>Differential Display</i>	34
3.3.1- Síntese de cDNA.....	35
3.3.2- Verificação da síntese de cDNA.....	35
3.3.3- Amplificação por PCR.....	36
3.3.4- Análise dos produtos do <i>Differential Display</i>	36
3.3.5- Isolamento e reamplificação.....	37
3.3.6- Clonagem dos fragmentos diferenciais.....	37
3.3.7- Mini-preparação e confirmação do inserto.....	37
3.3.8- Seqüenciamento dos plasmídeos selecionados.....	38
3.4- Identificação de transcritos diferencialmente expressos através da Biblioteca Subtrativa Supressiva	40
3.4.1- Princípio do Método.....	41
3.4.2- Síntese e amplificação de cDNA para SSH.....	43
3.4.3- Purificação do cDNA e digestão com <i>RsaI</i>	44

3.4.4- Ligação dos adaptadores.....	45
3.4.5- Hibridizações.....	44
3.4.6- Amplificação por PCR.....	46
3.4.7- Clonagem e Sequenciamento.....	47
3.4.8- Análise das seqüências diferencialmente expressas das bibliotecas.....	48
3.5- PCR quantitativo em tempo real.....	48
3.5.1- Desenho dos <i>primers</i>	51
3.5.2- Padronização da concentração dos <i>primers</i>	53
3.5.3- Curva de dissociação.....	53
3.5.4- Análise da eficiência da amplificação.....	53
3.6- Análise dos resultados.....	53
4- RESULTADOS.....	55
4.1- DDRT-PCR.....	56
4.2- Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH).....	58
4.3- Validação da expressão gênica por qRT-PCR.....	60
5- DISCUSSÃO.....	71
6- CONCLUSÃO.....	78
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8- ANEXOS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Threshold cycle</i> – “ciclo de limiar”
DDRT-PCR	<i>Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
DEPC	<i>diethyl pyrocarbonate</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dnase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxinucleotideo trifosfato
DO	densidade ótica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EST	<i>expressed sequence tags</i>
Hb	hemoglobina
LCR	<i>Locus Control Region</i>
μl	microlitros
ml	mililitros
min	minutos
mM	milimolar
ng	nanogramas
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pmol	picomol
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real

RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNAse	ribonuclease
rpm	rotações por minutos
Seg	segundos
SSH	<i>Subtractive Suppression Hybridization</i>
U	unidades

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Genótipos e aspectos clínicos e laboratoriais da talassemia α	23
Tabela 2- Dados hematológicos e bioquímicos dos pacientes com Doença da Hb H.....	32
Tabela 3- Seqüência dos <i>primers</i> utilizados no DDRT-PCR e no sequenciamento.....	40
Tabela 4- Relação dos <i>primers</i> utilizados para análise da expressão gênica dos genes selecionados.....	52
Tabela 5- Transcritos diferencialmente expressos detectados pela DDRT-PCR.....	57
Tabela 6- Transcritos detectados pela SSH e selecionados para validação.....	59
Tabela 7- Resultados da expressão do genes da PIP5KIIA e da globina β por qRT-PCR.....	60
Tabela 8- Resultados da expressão dos genes relacionados à PIP5KIIA e à globina β por qRT-PCR.....	63

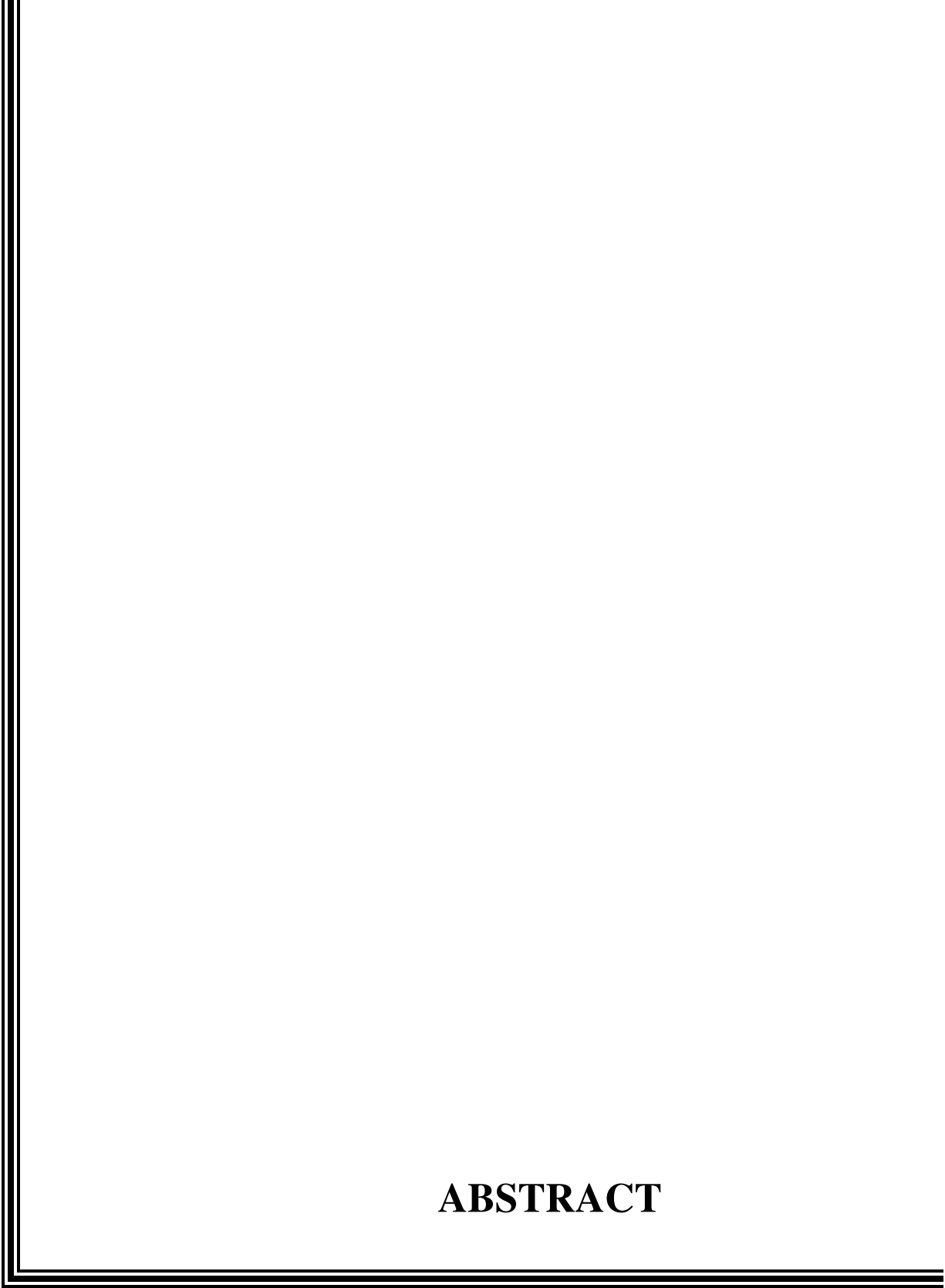
LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Cinética da eritropoese.....	20
Figura 2- Representação esquemática do método do DDRT-PCR.....	34
Figura 3a- Representação esquemática da SSH.....	42
Figura 3b- Resumo das etapas da SSH.....	43
Figura 4- Curva de amplificação do qRT-PCR.....	49
Figura 5- Curva de dissociação para avaliar a qualidade do qRT-PCR...	50
Figura 6- Curva de eficiência da amplificação da reação do qRT-PCR..	51
Figura 7- Resultado do DDRT-PCR.....	56
Figura 8- Representação gráfica da expressão dos genes selecionados para validação por qRT-PCR.....	61
Figura 9a- Representação gráfica da expressão dos genes GSN, VCL, RHOA, RAC1-GEF, ACTN, PIK3CA.....	64
Figura 9b- Representação gráfica da expressão dos genes INPP5B, PIK4CA, PKD, PLC, NFE-2, e EKLF por qRT-PCR.....	65
Figura 10a- Via do metabolismo do inositol.....	67
Figura 10b- Sistema de sinalização do fosfatidilinositol.....	68
Figura 10c- Regulação do citoesqueleto de actina.....	69

RESUMO

A Doença da Hb H resulta da remoção ou inativação de três dos quatro genes da cadeia α da hemoglobina normalmente presentes no genoma diplóide e é caracterizada por anemia hemolítica crônica de intensidade moderada a grave. Os pacientes apresentam microcitose, hipocromia e poiquilocitose, com cerca de 25 a 30% de Hb Bart's (γ_4) ao nascimento e 5-30% de Hb H (β_4) na vida adulta. Embora a base molecular da doença tenha influência nos níveis de Hb H produzidos, uma heterogeneidade em relação a esse aspecto tem sido observada mesmo em pacientes com genótipos α idênticos, sugerindo que outros fatores contribuem para esta diversidade além dos determinantes talassêmicos. No presente trabalho, procuramos identificar transcritos diferencialmente expressos nos reticulócitos de dois pacientes com Doença da Hb H, irmãos, de origem étnica mista (chinesa e africana), um do sexo masculino, 21 anos de idade, com 18% de Hb H (MKS), e outro do sexo feminino, 19 anos, com 5% desta Hb (FKS), ambos com genótipo $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$. O método envolveu a técnica de *Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR) e a realização de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH). A validação dos achados foi feita pela Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR). Quatro perfis diferenciais de expressão foram selecionados, todos mais representados no paciente com maior nível de Hb H. Dois foram detectados por ambas as abordagens metodológicas: um transcrito altamente homólogo à parte do gene da PIP5KIIA (fosfatidilinositol 4-fosfato-5 quinase tipo II α) e outro ao gene da cadeia β da hemoglobina humana. Os outros dois transcritos, selecionados apenas pela SSH, apresentaram similaridade ao gene FAM46C (*Family with sequence similarity 46, member C*), que corresponde a uma proteína hipotética de função indeterminada, e ao gene EIF4E-BP1 (*eukariotic translation initiation factor 4E – binding protein 1*), que codifica uma proteína regulatória da tradução com capacidade de inibição do fator eIF4E (*eukariotic translation initiation factor 4E*). Na tentativa de identificar os mecanismos responsáveis pelo aumento dos transcritos da PIP5KIIA e da globina β nos reticulócitos de MKS, alguns outros genes, relacionados às vias de atuação ou ao processo de transcrição dos primeiros, tiveram sua expressão também avaliada pela qRT-PCR. Os resultados obtidos, embora não conclusivos, sugeriram que a diferença nos níveis de Hb H apresentada pelos pacientes aqui estudados está correlacionada com a taxa de síntese de cadeias β , e que a enzima PIP5KIIA, provavelmente via sinalização celular pelo fosfatidilinositol, de alguma

maneira participa de sua regulação. O significado destes achados e o papel dos transcritos dos genes FAM46C e EIF4E-BP1 devem ser futuramente investigados para uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação da expressão dos genes da globina β em pacientes com talassemia α .



ABSTRACT

Hb H disease results from the inactivation of three of the four α -globin genes normally present on diploid genome and it is characterized by a moderate to severe chronic hemolytic anemia. Patients usually present microcytosis, hypochromia and poikilocytosis, with 25 to 30% of Hb Bart's (γ_4) at birth and 5 to 30% of Hb H (β_4) in adult life. Although the molecular base of this disease influences the Hb H levels produced, some heterogeneity has been observed in relation to this aspect, even in patients with identical α genotypes, thus suggesting that other factors contribute to this diversity besides α -thalassemic determinants. The aim of the present study was to identify differentially expressed transcripts in the reticulocytes from two patients with Hb H disease, siblings, from Chinese and African origins, a 21-year-old male (MKS) with 18% of Hb H and a 19-year-old female (FKS) with 5% of Hb H, both with genotype $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$. The methodology involved two techniques: the Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR) and the Suppression Subtractive Hybridization (SSH). Quantitative real time PCR (qRT-PCR) experiments were used to confirm some results. Four differentially expressed profiles were obtained, all of them better represented in the subject with the highest Hb H level. Two transcripts were detected by both methodological approaches, one being highly similar to PIP5KIIA gene (Phosphatidylinositol – 4 phosphate 5-kinase, type II α) and the other one similar to human β -globin gene. Two others transcripts were selected only by SSH and they showed to be to FAM 46C (*Family with sequence similarity 46, member C*) and EIF4E-BP1 (*eukariotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) gene homologues. In order to identify the mechanisms that are responsible for the transcripts PIP5KIIA and β -globin increase in the reticulocytes from MKS patient, some other genes related to the transcriptional process also had its expression evaluated by qRT-PCR. Although not conclusive, our results suggest that the difference between the Hb H levels, showed by the subjects here studied, is correlated with β -globin synthesis rate and that PIP5KIIA may participate of its regulation, probably by cell signaling through Phosphatidylinositol. Studies, particularly involving a higher number of patients, and experiments aimed at elucidating the PIP5KIIA function in erythroid cells, should help to understand this process. The initiation factor -4E binding protein (EIF4E-BP1) and its capacity to bind to eIF4E, acts as negative regulator of cell growth. Its overexpression was detected in the patient with the highest HbH level. The significance of

these findings and the role of the FAM46C and EIF4E-BP1 gene transcripts should be further investigated so that the regulating of the β -globin gene expression in α -thalassemic patients can be better understood.

1- INTRODUÇÃO

Eritropoese refere-se ao amadurecimento dos precursores eritróides na medula óssea a partir de progenitores imaturos. Simultaneamente ao processo de proliferação e maturação dessas células, ocorre a síntese da hemoglobina. A maior parte da diferenciação ocorre na medula óssea, e é dada pela crescente sensibilidade dos precursores à eritropoetina, um fator de crescimento produzido pelo tecido renal. O precursor medular mais imaturo reconhecido morfológicamente na medula óssea é o proeritroblasto, cuja capacidade proliferativa resulta na produção de 8 – 32 eritroblastos ortocromáticos que não mais se dividem, mas perdem o núcleo dando origem aos reticulócitos, que ainda contêm resíduos de organelas, inclusive ribossomos com RNA mensageiro, fato este que permite à célula a síntese de 10 – 20 % da hemoglobina. A Figura 1 descreve a cinética da eritropoese (Orkin, 1992; Hall et al., 2003).

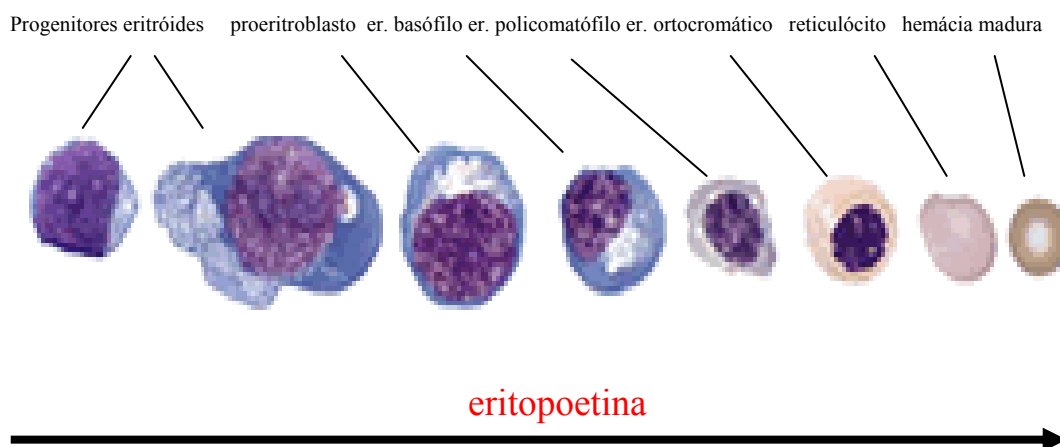


Figura 1- Modelo esquemático da eritropoese a partir de progenitores eritróides medulares (adaptado do site <http://hembase.niddk.nih.gov>)

As hemoglobinas humanas são tetrâmeros formados pela interação de duas cadeias do tipo alfa [alfa (α) ou zeta (ζ)] e duas cadeias do tipo beta [beta (β), delta (δ), gama (γ) ou épsilon (ϵ)], sendo cada uma delas ligadas a um grupo prostético heme, resultante da combinação de um átomo de ferro com uma molécula de protoporfirina. Essa conformação da molécula permite a sua ligação de forma reversível com o oxigênio (O_2), efetuando assim o transporte do mesmo dos pulmões aos tecidos e de uma fração de gás carbônico (CO_2) dos tecidos aos pulmões (Weatherall e Clegg, 2001; Bunn e Forget, 1986).

A síntese das cadeias globínicas é controlada por genes distintos, localizados em dois agrupamentos (*clusters*): os genes responsáveis pela síntese das cadeias α e ς estão organizados no *cluster* α localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), enquanto os genes que codificam as cadeias β , δ , γ e ϵ estão agrupados no *cluster* β mapeado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) (Orkin, 1983; Higgs, et al., 1986; Hugges et al., 2005). Esses genes são expressos em diferentes estágios do desenvolvimento, e para que o tetrâmero seja formado, é necessário que sua expressão ocorra de forma balanceada, equilibrada, o que é garantido por um rígido mecanismo de regulação (Forrester et al., 1987; Higgs et al., 1990; Jarman et al., 1991).

As talassemias são alterações hereditárias causadas por mutações que afetam os genes de globina, reduzindo ou abolindo a síntese de uma ou mais cadeias globínicas (Bunn e Forget, 1986). A diminuição ou ausência total de uma das cadeias leva ao acúmulo da outra cuja síntese está preservada, que então tetrameriza e precipita no interior das hemácias, causando a lise precoce das células. Além disso, a hemoglobinizacão deficiente das hemácias resulta em microcitose e hipocromia, anormalidades morfológicas características deste grupo de doenças. São classificadas conforme o tipo de cadeia cuja síntese está prejudicada em, talassemia α , β , δ , γ , $\delta\beta$ e $\delta\beta\gamma$ (Bunn e Forget, 1986; Weatherall e Clegg, 2001). Destas, as mais freqüentes são as talassemias α e β , que afetam 25% da nossa população negróide (Sonati et al., 1991) e 1% da nossa população caucasóide (Zago et al., 1984), respectivamente.

A talassemia α é assim um distúrbio hereditário de distribuição mundial causada por mutações que afetam os genes α , levando à redução ou ausência da produção das cadeias α da hemoglobina. Por um lado, há o comprometimento do processo de hemoglobinizacão, determinando eritrócitos hipocrômicos e microcíticos. Por outro, há formação de hemoglobinas anômalas constituídas pelos tetrâmeros das cadeias cuja síntese está preservada (Bunn e Forget, 1986). Este distúrbio genético ocorre com incidência elevada entre os povos da África, Ásia, Oceania, Oriente Médio e Região do Mediterrâneo (Folayan-Esan et al., 1970; Heni et al., 1987; Fucharoen et al., 1988; Ozsoylu et al., 1982; Galanello et al., 1984; Kanavakis et al., 1986; Di Renzo et al., 1986). Na América foi descrita em vários países, como Estados Unidos, Canadá, México, Cuba, Costa Rica,

Jamaica, Colômbia, Peru e Brasil (Echavarria et al., 1976; Martinez e Colombo, 1976; Higgs et al., 1981; Zago e Costa, 1985; Sonati et al., 1990; Sonati et al., 1991).

Os genes que codificam as cadeias α da hemoglobina são duplicados (α_2 e α_1) e separados por cerca de 4 Kb de DNA. A talassemia α é classificada em α^+ (haplótipo $-\alpha$) e α^0 (haplótipo $--$), conforme um ou ambos os genes do genoma haplóide estejam afetados, respectivamente (Higgs, 1993). A heterozigose, a homozigose, ou a interação dessas formas levam à diferentes manifestações clínicas ou hematológicas, resumidas na Tabela 1.

As deleções são responsáveis pela quase totalidade dos casos (Kattamis et al., 1996) talassemia α^+ é mais frequentemente causada pela deleção de um fragmento de 3.7 Kb de DNA (deleção $-\alpha^{3.7}$), envolvendo a região 3' do gene α_2 e 5' do gene α_1 , resultando em um único gene α híbrido ($\alpha_2-\alpha_1$). Ela tem distribuição mundial, com frequências elevadas na região do Mediterrâneo e na África.

Eventos de recombinação não homóloga são as causas das deleções responsáveis pela talassemia α^0 . A maioria remove ambos os genes α do mesmo cromossomo, determinando o haplótipo $--$. As duas mais comuns são as deleções ($--^{MED}$), freqüente na Bacia do Mediterrâneo (Nicholls et al., 1985; Kattamis et al., 1996), e ($--^{SEA}$), a mais freqüente forma de talassemia α^0 do Sudeste Asiático (Fucharoen e Winichagoon, 1987). Também são causas de talassemia α^0 deleções que removem totalmente um gene α e parcialmente o outro, tornando-o inativo, determinando o haplótipo $-(\alpha)$. Como exemplo temos as deleções $-(\alpha)^{20.5}$ (Nicholls et al., 1985), e a $-(\alpha)^{5.2}$, que envolvem todo o gene α_2 e a porção 5' do gene α_1 , o qual não pode se expressar (Pressley et al., 1980). Ambas são de origem Mediterrânea, sendo a primeira mais freqüente (Higgs et al., 1989).

Substituições de bases ou remoções ou inserções de um ou de poucos nucleotídeos ocorrem esporadicamente ($\alpha^T\alpha$ ou $\alpha\alpha^T$), inativando ou reduzindo a expressão gênica pela interferência na transcrição ou no processamento do mRNA, ou ainda, resultando na produção de cadeias α instáveis (Traeger-Synodinos et al., 1993).

Tabela 1- Genótipos X Aspectos Clínicos e Laboratoriais da Talassemia Alfa

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

A Doença da Hb H, em que somente um dos genes α no genoma diplóide permanece ativo, resulta em anemia hemolítica crônica, de intensidade variando de moderada a grave, com microcitose, hipocromia e poiquilocitose; o perfil eletroforético revela de 25 a 30% de Hb Bart's (γ_4) ao nascimento e de 5 a 30% de Hb H (β_4) na vida adulta (Bunn e Forget, 1986; Weatherall et al., 2001). A Hb H é uma variante altamente instável e suscetível à oxidação que precipita com o envelhecimento das hemácias, lesando a membrana celular e levando à remoção precoce dos eritrócitos da circulação (Bunn e Forget, 1986; Weatherall et al., 2001). A quantidade produzida nas células está

relacionada aos diferentes determinantes talassêmicos (Kanavakis et al., 1996). Formas não delecionais de talassemia α , por exemplo, correspondem a níveis de Hb H mais elevados do que aqueles resultantes da interação de deleções porque, neste último caso, há um aumento compensatório na expressão do gene α remanescente (Liebhaber et al., 1985). Por outro lado, determinantes que afetam os genes α_2 ($\alpha^T \alpha/--$) correspondem a concentrações mais elevadas de Hb H do que aqueles envolvendo os genes α_1 ($\alpha \alpha^T/--$), porque os primeiros têm expressão dominante, de cerca de 2,5 vezes a expressão dos genes α_1 (Liebhaber et al., 1986).

A doença, por sua vez, manifesta-se com quadro clínico que varia de acordo com a quantidade de Hb H produzida (Higgs, 1993; Traeger-Synodinos et al., 1993; Kanavakis et al., 1996). Como já mencionado, a interação entre formas não delecionais e determinante α^0 ($\alpha^T \alpha/--$) causa um quadro clínico mais grave, com níveis mais elevados de HbH do que a combinação entre duas formas delecionais ($-\alpha/--$), provavelmente pelo aumento compensatório na expressão do gene α_1 na presença de deleção adjacente (Liebhaber et al., 1985); determinantes que afetam os genes α_2 ($\alpha^T \alpha/--$) tendem a ser mais severos do que aqueles envolvendo os genes α_1 ($\alpha \alpha^T/--$) (Higgs, 1993) frente à expressão dominante do primeiro (Liebhaber et al., 1986).

Diferentes níveis de Hb H, no entanto, têm sido observados também em pacientes com genótipos α idênticos, sugerindo que outros fatores contribuem para esta diversidade e heterogeneidade além da base molecular da doença (Chui et al., 2003). Considerando que a quantidade do produto de um gene na célula resulta do nível de expressão desse gene (taxa de síntese da proteína) e da taxa de degradação do produto protéico (Chui et al., 2003), fatores relacionados à modulação da expressão dos genes de globina e aos mecanismos de proteólise em células eritróides seriam os candidatos iniciais a serem investigados para se compreender a variabilidade nos níveis de Hb H produzidos nos pacientes α -talassêmicos, além das mutações relacionadas à talassemia α .

A expressão diferencial dos genes de globina resulta da modulação altamente coordenada de sua regulação, envolvendo a interação de fatores de transcrição com seqüências regulatórias (promotores e *enhancers*) (Weatherall e Clegg, 2001). Localizado

a cerca de 40 kb de distância do agrupamento α em direção ao telômero do cromossomo 16, há uma região que controla a expressão dos genes α . É o elemento regulatório maior (α -MRE), um segmento de DNA que contém sítios hipersensíveis à digestão pela DNase (HS), dos quais o principal está localizado a -40 kb do sítio CAP do gene ζ , denominado HS-40 (Higgs et al., 1990; Jarman, et al., 1991). A importância dessas seqüências para a expressão dos genes α é comprovada por mutações nessas regiões, que, embora deixando os genes α estruturalmente intactos, esses não se expressam, determinando um quadro de talassemia α . O mecanismo pelo qual o HS-40 ativa os genes α vem sendo bastante investigado (Higgs et al., 2005; Viprakasit et al., 2006; Zhou et al., 2006). Estruturalmente, este fragmento de DNA contém sítios de ligação para fatores eritróides específicos, como NF-E2 (*erythroid nuclear factor*) e GATA-1, e para fatores de transcrição ubíquos (YY1, SP1, Oct-1), requeridos à expressão de todos os genes estruturais transcritos pela RNA polimerase II (Jarman et al., 1991; Forget, 2001).

De forma semelhante, a expressão dos genes organizados no *cluster* β é regulada pelo LCR (*Locus Control Region*), localizado à montante do gene ϵ e constituído de cinco sítios HS. Os prováveis mecanismos de regulação da expressão gênica seriam a abertura da cromatina, tornando-a transcricionalmente ativa, e a interação do LCR com as regiões promotoras de cada gene do *cluster*, através da formação de alças de DNA (Patrinos et al., 2004).

O controle eficiente da expressão gênica de globinas envolve a interação dos fatores de transcrição e suas correspondentes seqüências regulatórias no DNA. Por esta razão, esses fatores são compostos de dois domínios funcionais, um de ligação ao DNA e outro de ativação ou repressão da transcrição. Alguns domínios de ligação recebem denominações específicas, como *zinc finger*, zíper de leucina, hélice-alça-hélice, hélice-giro-hélice, de acordo com sua conformação estrutural. Dentre os fatores de transcrição para a regulação dos genes de globina, destacam-se o fator eritróide específico GATA-1, um *zinc finger*, e NF-E2, um heterodímero constituído de proteínas modelo *ziper de leucina*, ambos com sítios de ligação no α -MRE e LCR (Andrews et al., 1993; Fosberg et al., 2000), além do EKLF (*erythroid kruppel-like factor*), um *zinc finger*

ativador da transcrição do gene da globina β (Bottardi et al., 2006; Manwani et al., 2007; Shyu et al., 2007).

Genes que se expressam diferencialmente podem ser analisados comparativamente, após isolamento e identificação. Diversas técnicas ou métodos têm sido desenvolvidos para esse propósito, como o DDRT-PCR (*Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) (Liang e Pardee, 1992), ou a biblioteca subtrativa, que se baseia na hibridização entre fragmentos de mRNA obtidos de indivíduos em uma mesma condição mas com perfis de expressão gênica diferentes (Diatchenko et al., 1996). Estratégias mais sofisticadas e de alta sensibilidade também estão disponíveis, como o SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), metodologia fundamentada na variabilidade da extremidade 3' não-traduzida dos mRNAs (Velculescu et al., 2000; Bals e Jany, 2001), e os *microarrays*, tecnologia baseada na hibridização entre fragmentos de ácidos nucleicos marcados com fluoróforos, ou radiativamente, e seqüências conhecidas derivadas de bibliotecas de cDNA ou de DNA genômico (Bals e Jany, 2001; Macgregor et al., 2002). São, no entanto, técnicas mais complexas e dispendiosas, que dependem de infra-estrutura e equipamentos apropriados, indicadas quando um grande número de transcritos diferencialmente expressos é esperado (Bals e Jany, 2001).

A técnica de DDRT-PCR envolve a extração do mRNA da célula alvo, a conversão em cDNA através da transcrição reversa e posterior amplificação pela técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase). São utilizados um *primer* 3' ancorador (oligo dT), que se associa à cauda de Poli A do mRNA, e um *primer* de seqüência arbitrária (degenerado), que se associa em pontos diferentes na extremidade 5' do cDNA. Esta estratégia possibilita a obtenção de diferentes produtos aleatórios da PCR, que são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e posteriormente isolados, reamplificados, clonados e seqüenciados, permitindo a detecção e comparação de diferenças no padrão de expressão gênica entre duas ou mais condições (Liang e Pardee, 1992). Sua execução é simples e relativamente rápida, não dependendo do emprego de equipamentos sofisticados (Linskens et al., 1998; Bals e Jany, 2001).

De forma semelhante, a *Hibridização Subtrativa Supressiva* (SSH) permite a exclusão dos genes comuns ou com níveis equivalentes de expressão utilizando estratégias de fácil execução, como a PCR, a digestão com enzimas de restrição e o seqüenciamento de DNA. O método consiste na construção de bibliotecas de perfis transcricionais diferencialmente expressos entre cDNAs derivados de duas populações celulares diferentes, através da hibridização subtrativa de seqüências comuns às duas bibliotecas (Diatchenko et al., 1996). O RNA obtido das amostras a serem estudadas é convertido em cDNA de dupla fita e digerido com enzima de restrição. Uma alíquota de cada produto da digestão é ligada a adaptadores (os quais contêm seqüências para iniciadores de PCR), criando-se assim uma população de cDNA denominada *Tester*. Os produtos da digestão restantes não ligados a adaptadores recebem a denominação de *Driver*. O *Tester* de uma biblioteca e o *Driver* (em excesso) da outra são misturados sob condições que permitam a hibridização de moléculas complementares, correspondentes a transcritos comuns, que serão assim “subtraídos”. Os transcritos remanescentes, não hibridizados por não possuírem correspondentes na população *Driver* (ou seja, aqueles diferencialmente expressos na população *Tester*), serão então amplificados e identificados.

A proposta do presente estudo foi identificar, através das técnicas de DDRT-PCR e SSH, transcritos diferencialmente expressos em reticulócitos de pacientes com doença da Hb H com o mesmo genótipo talassêmico e diferentes proporções de Hb anômala. Há poucos estudos na literatura caracterizando os transcritos presentes em reticulócitos humanos (Bonafoux et al., 2004; Andrade et al., 2006; [http:// hembase.niddk.nih.gov](http://hembase.niddk.nih.gov)) e, de nosso conhecimento, nenhum investigando a expressão diferencial em pacientes α -talassêmicos.

2- OBJETIVOS

Identificar transcritos diferencialmente expressos em reticulócitos de pacientes com doença da Hb H com genótipos α idênticos e níveis de Hb anômala diferentes.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Amostras Biológicas

Foram aqui analisadas e comparadas amostras de RNA de reticulócitos do sangue periférico de dois pacientes com doença da Hb H, irmãos, de origem étnica mista (chinesa e africana), com genótipo $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$, um com 21 anos de idade, do sexo masculino, com história de anemia desde a infância, esplenomegalia moderada, hepatomegalia discreta, icterícia e aproximadamente 18% de Hb H (MKS), e o outro com 19 anos, do sexo feminino, história de anemia, esplenomegalia discreta sem hepatomegalia, icterícia, e cerca de 5% de Hb H (FKS). Foram realizadas sorologias para hepatite B e C em ambos os pacientes e os resultados foram negativos (soros não reagentes), além da avaliação dos perfis hepático, renal e tireoidiano, que também se mostraram normais. Os dados hematológicos e bioquímicos dos dois indivíduos estudados encontram-se dispostos na Tabela 2.

Tabela 2- Dados Hematológicos e Bioquímicos dos Pacientes com doença da Hb H

	MKS	FKS
GV (10 ⁶ /μl)	4,45	4,55
Hb (g/dl)	9,4	7,6
Ht (%)	35,5	26,5
VCM (fl)	79,8	58,2
HCM (pg)	21,1	16,7
RDW – CV (%)	20,2	28,1
RET (%)	3,9	1,87
Perfil Hb	HbA ₂ +HbA+Hb H	HbA ₂ +HbA+Hb H+Hb Bart's
HbA ₂ (%)	1,23	1,27
HbF (%)	1,53	1,74
Hb H (%)	18,7	5,0
Ferritina	624 ng/dl	573 ng/dl
Ferro sérico	-----	62 mgc/dl
TIBC	195 mcg/dl	-----
BD	0,6 mg/dl	0,5 mg/dl
BI	1,7 mg/dl	1,3 mg/dl
BT	2,3 mg/dl	1,8 mg/dl
LDH	562 U/L	323 U/L

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

TIBC = *Total Iron Binding Capacity* (normal = 250 – 410 mcg/dl); Ferritina (normal = 30 – 200 ng/dl); Ferro sérico (normal = 37-145 mgc/dl); BD = bilirrubina direta (até 0,2 mg/dl); BI = bilirrubina indireta (até 0,8 mg/dl); BT = bilirrubina total (até 1,0 mg/dl); LDH = lactato desidrogenase (230 – 460 U/L)

Obs.: os dados entre parênteses correspondem ao valor normal de cada dosagem.

O material biológico foi obtido após o consentimento livre e esclarecido dos pacientes e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da FCM/UNICAMP (Parecer nº 465/2003), e do CONEP, registro nº 502/2002, processo nº 25000.013497/2003/16, com parecer final emitido em 27 de março de 2003 (Anexo 1).

3.2- Extração de RNA

Cerca de 20 ml de sangue total de cada paciente, colhidos com EDTA, foram transferidos para 4 tubos Falcon de 15 ml e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O plasma foi descartado e às células acrescentado tampão de lise de hemácias (NH_4HCO_3 0,01 M e NH_4Cl 0,144 M) correspondente a 5 vezes o volume do “pellet”. As amostras foram incubadas por 30 minutos em gelo sob vigorosa agitação manual a cada 5 minutos, e novamente centrifugadas a 3000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante contendo reticulócitos e hemácias lisadas foi transferido para outro tubo e tratado com 1/10 de volume de solução de sucrose/KCl (sucrose livre de ribonuclease 1,5 M / KCl 0,15 M) preparada com água tratada com DEPC (livre de RNAses). Nova centrifugação a 5000 rpm foi realizada por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante contendo apenas reticulócitos foi transferido para outro tubo ao qual foi adicionado ácido acético 10 % (pH 5,1) e que foi novamente centrifugado nas mesmas condições. O “pellet” obtido foi homogeneizado com 1 ml de *TRIzol Reagent* (Invitrogen). A partir desta etapa, o protocolo foi seguido de acordo com as recomendações do fabricante e o “pellet” final obtido foi dissolvido em 5 – 10 µl de água tratada com DEPC. As amostras de RNA obtidas foram quantificadas através de leitura em comprimento de onda de 260 nm, em espectrofotômetro de luz UV *Gene Quant* (Pharmacia, Sweden), e estocadas a -70° C. A integridade e qualidade das amostras de RNA foram avaliadas em gel desnaturante de agarose 1,2%.

3.3- Isolamento de transcritos diferencialmente expressos através da técnica de DDRT-PCR (Liang e Pardee, 1992)

O método possibilita a análise comparativa de genes com expressão diferencial através de diferentes produtos de PCR, aleatórios, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. O esquema representativo encontra-se na Figura 2.

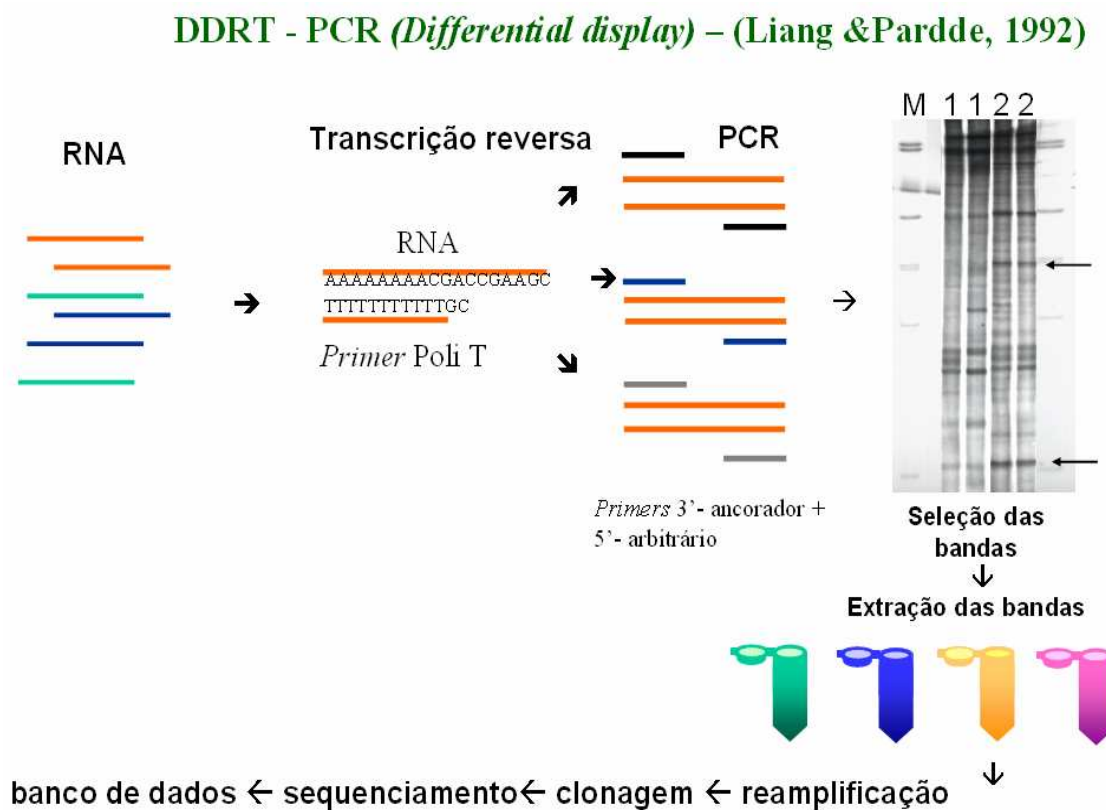


Figura 2- Representação esquemática das principais etapas do método.

3.3.1- Síntese de cDNA (DNA complementar) através de Transcrição Reversa

Cinco µg de cada amostra de RNA foram tratadas com 1U de DNase I (Invitrogen, USA), por 15 minutos, à temperatura ambiente, para remoção de DNA contaminante, enzima que foi posteriormente inativada pela adição de EDTA pH 8,0 e incubação a 65°C por 10 minutos. Às amostras foi adicionado 1 µl de um *primer* 3' ancorador (oligonucleotídeo de desoxitimidina - oligo [dT]), na concentração de 10mM, que se associa à cauda de Poli A, atuando como iniciador para a transcriptase reversa (os oligonucleotídeos ancoradores utilizados foram do tipo T12VG ou T12VC, sendo V = G ou C), e 200 U da enzima SuperScript II (Invitrogen, USA), com incubação a 42° C, por 50 minutos, e a 70° C, por 15 minutos, para inativação da enzima. A cada amostra de cDNA obtida foram acrescentadas 2U de RNase H (Invitrogen, USA), sendo a incubação a 37°C por 20 minutos.

3.3.2- Verificação da síntese do cDNA

Após a reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA foram utilizadas como molde da reação de PCR para amplificação de parte do gene da beta-actina (β-actina). Para cada alíquota de 1 µl do cDNA obtido foram acrescentados: 5,0 µl de tampão de amplificação 10x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCL 50 mM, Invitrogen), 1,5 µl de MgCl₂ 50Mm, 1,5 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de cada *primer* para o gene da beta-actina: BAC_F (5'- AGGCCAACCGCGAGAAG -3') e BAC_R (5'- ACAGCCTGGATAGCAACGTACA - 3'), ambos na concentração de 10mM, 0,2µl de Taq Polimerase 5U/µl – Invitrogen e água para um volume final de 50 µl de reação. O programa de amplificação foi de 94°C durante 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C - 30 segundos, 58°C – 30 segundos e 72°C – 1 minuto, com extensão final de 72°C por 7 minutos. O produto da PCR, um fragmento de 640 pb, foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.3.3- Amplificação por PCR

O cDNA obtido foi utilizado como molde para a produção subsequente de DNA, empregando-se a PCR para a geração de múltiplas moléculas de DNA dupla fita. Nesta etapa, foram utilizados novamente os oligos (dT) em combinação com um iniciador "arbitrário" (oligo randômico), um pequeno fragmento de 10 nucleotídeos cuja sequência degenerada possibilita associação em pontos diferentes, próximos à extremidade 5' do cDNA, resultando em múltiplos produtos da PCR, de diferentes tamanhos. O oligonucleotídeo arbitrário utilizado foi da marca OPERON (OPJ01). As reações foram realizadas em duplicata, em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e constituídas de: 1 µg/µl de cDNA, 2 µl do *primer* ancorador e 2 µl do *primer* arbitrário, ambos na concentração de 10µM, 2 µl de dNTP 20 µM, 0,5 µl de MgCl₂ 50mM, 2 µl de tampão de amplificação 10x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCL 50 mM, Invitrogen), 0,5µl de Taq Polimerase 5U/µl – Invitrogen, além de 1 µl de dNTP marcado radiativamente [(α³³P)dATP 5 µCi]. O volume total da reação (20 µl) foi completado com água Milli Q. As condições de amplificação foram: 94°C durante 4 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C - 30 segundos, 40°C – 2 minutos e 72°C – 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.4- Análise dos produtos da PCR em gel de poliacrilamida

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 4,8% contendo uréia a 42%. Foram preparados, para cada experimento, 80 ml de gel contendo 10,2 ml de acrilamida / bisacrilamida (40:2), 16 ml de TBE 5X (Tris-EDTA-Borato), 33 g de uréia e 20 ml de água Milli Q. O gel foi filtrado com filtro Nalgene de 0,45 mm, e a esta solução foram acrescentados 266 µl de persulfato de amônio e 80 µl de TEMED. Após polimerização, foi realizada uma pré-corrida de 30 minutos a 1320 V, 35 mA, 45 W, em tampão de corrida TBE 1x. Em seguida, as amostras contendo 7µl do produto da PCR foram misturadas a 5 µl de *stop solution* (formamida 80%, azul de bromofenol e xileno-cianol), desnaturadas a 80°C por 4 minutos e aplicadas no gel. As condições da eletroforese foram as mesmas utilizadas na pré-corrida, por cerca de 4 horas (Assmann et al., 2003). Após a separação dos fragmentos, o gel foi transferido para papel

Whattman 3mm, submetido à secagem a vácuo por 1 hora a 80°C e exposto a filme de raio X (Kodak X-OMAT AR). Os transcritos expressos diferencialmente foram identificados autorradiograficamente e analisados comparativamente.

3.3.5- Isolamento e reamplificação dos transcritos diferencialmente expressos

Os fragmentos de interesse foram extraídos do gel, eluídos (incubação em água Milli-Q por 20 minutos a 95°C), precipitados (com acetato de sódio e etanol absoluto) e submetidos à nova amplificação, nas mesmas condições da PCR anterior. Os produtos desta reação foram analisados em gel de agarose 2% para confirmação do tamanho dos transcritos.

3.3.6- Clonagem dos fragmentos diferenciais

As clonagens foram realizadas com o kit p-GEM-T Easy Vector System I (Promega). Três µl do produto da reamplificação foram adicionados a 5 µl do tampão de ligação 2X, 1 µl de vetor p-GEM-T Easy e 1 µl de T4 ligase e a reação foi incubada a 4°C por 16 – 20 horas. Cinco µl da reação de ligação foram utilizados para transformar 100 µl de células *DH5α* competentes por choque térmico (25 minutos em gelo, 1 minuto a 42°C e 3 minutos em gelo). As células transformadas foram incubadas em meio LB (Luria Bertan) líquido, sem ampicilina, sob agitação (150 rpm), a 37°C, por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, a cultura foi semeada em meio LB/ágar previamente tratado com X-gal (sistema galactosidase para seleção de colônias com inserto), com ampicilina, e mantida a 37°C por cerca de 16 horas. Foram selecionadas 6 colônias brancas de cada fragmento diferencial clonado, que foram novamente semeadas em meio de cultura LB líquido com ampicilina e mantidas a 37°C por 16 horas, sob agitação (150 rpm).

3.3.7- Mini-preparação de plasmídeos e confirmação da inserção do fragmento

Após crescimento, as culturas foram transferidas para tubos *ependorf* e centrifugadas (14.000 rpm por 1 minuto), os sobrenadantes descartados e os sedimentos bacterianos lavados em 300 µl de solução P1 (Tris-HCl 50 mM pH-8,0, EDTA 10Mm pH

8,0 e 100µg/ml de RNase). Em seguida procedeu-se à lise alcalina das células com 300 µl de solução P2 (NaOH 200 mM e SDS 1%), e após movimentos suaves de inversão as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, cada tubo recebeu 300 µl de solução P3 (acetato de potássio 3M, pH 5,5) e após cuidadosa agitação, uma nova centrifugação por 10 minutos a 14 000 rpm, para separação do DNA celular dos restos bacterianos, foi realizada. Ao sobrenadante, transferido para outro tubo, foram adicionados 400 µl de isopropanol e a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, constituído de DNA plasmidial, foi lavado com 500-700µl de etanol 70%. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, o DNA foi deixado à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos, em seguida dissolvido em 20 µl de TE (Tris – EDTA), e conservado a 4°C (Sambrook *et al.*, 1989). Para verificar a inserção do fragmento de interesse no plasmídeo, uma PCR foi realizada nas seguintes condições: 1µl do plasmídeo diluído em água purificada para DNA (2:100), 2 µl dos *primers* T7 e SP6, ambos na concentração de 20 pmol/µl, 2µl de dNTP 5Mm, 1,5 µl de MgCl₂ 50Mm, 5 µl de tampão de amplificação 10x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCL 50 mM, Invitrogen), 0,5µl de Taq Polimerase 5U/µl (Invitrogen) e 36 µl de água purificada para completar o volume final de 50 µl de reação. Os parâmetros de amplificação foram: 94°C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C – 1 minuto, 50°C – 1 minutos e 72°C – 2 minutos, com extensão final a 72°C por 20 minutos. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em mini gel de agarose 1,5% para confirmação do tamanho dos fragmentos inicialmente clonados, através de comparação com o marcador de peso molecular (Ladder 1Kb - Promega).

3.3.8- Seqüenciamento dos plasmídeos selecionados

Para o seqüenciamento dos fragmentos diferenciais clonados foi utilizado o ***kit DNA Sequencing Kit Big DyeTM Terminator Cycle v. 3.1*** e o equipamento ***ABI PRISM 377, Applied Biosystems***. Uma alíquota de 2 µl de cada plasmídeo selecionado foi submetida à PCR, com o seguinte protocolo: 1 µl de *primer*, T7 (*sense*) ou SP6 (*anti-sense*), ambos na concentração de 5 pmol/µl, 1 µl de Big Dye e água purificada para

completar o volume final de reação de 10 µl. As condições foram: desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguidos de 36 ciclos de desnaturação 96°C - 30 segundos, 57°C - 20 segundos e 60°C - 4 minutos. As seqüências dos iniciadores utilizados no DDRT-PCR e nos seqüenciamentos encontram-se na Tabela 3. Os produtos da reação foram purificados como se segue: 80 µl de isopropanol 75% foram adicionados a cada tubo de reação e estes homogeneizados por *vortex* por 10 minutos. Após incubação por 15 minutos na ausência de luz, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes foram descartados, os precipitados receberam 150µl de etanol 70% e foram submetidos à nova centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. Após descarte dos sobrenadantes, os precipitados foram incubados a 65°C por 3 minutos. Estes foram ressuspensos, por *vortex*, em 3µl da mistura *Blue Dextran* formamida (2 µl de blue dextran + 5µl de formamida) e desnaturados a 95°C por 3 minutos, colocados imediatamente em gelo e aplicados no gel do seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (*Perkin Elmer*). As seqüências geradas foram analisadas pelo programa CHROMAS, submetidas ao *Blast* (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleotídeos (*Blastn*) e comparadas com as seqüências depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmação da identidade do transcrito selecionado. Assim, as seqüências aqui obtidas foram consideradas consultas a esse banco (*queries*), enquanto as seqüências já depositadas, sujeitos (*subjects*). O *BLAST* fornece parâmetros em forma de pontuações (*scores*, quanto maiores, maior a identidade e a similaridade entre a seqüência *query* e a seqüência *subject*) e de valores esperados (*e-values*), que representam a probabilidade de que a homologia encontrada entre *query* e *subject* tenha ocorrido ao acaso. Quanto menor o *e-value*, mais significativo o alinhamento entre as seqüências *query* e *subject*. Valores de *e-values* menores que zero são expressos como potência de 10; por exemplo, 10^{-30} é o mesmo que e-30 (Altschul *et al*, 1997). Além do *score* e do *e-value*, o tamanho do fragmento isolado deve ser considerado: a comparação de fragmentos menores que 100pb tem menor confiabilidade.

Tabela 3- Sequência dos *primers* utilizados no DDRT-PCR e nos seqüenciamentos

Primers	Reação	Seqüência
Oligo dT(T12VG)	cDNA	5' - TTTTTTTTTTTTVG –3'
Oligo dT (T12VC)	cDNA	5' – TTTTTTTTTTTTVC –3'
OPJ 01	PCR	5' - CCC GGC ATA A – 3'
T7 (foward)	seqüenciamento	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3'
SP6 (reverse)	seqüenciamento	5' – ATT TAG GTG ACA CTA TAG – 3'

3.4- Identificação de transcritos diferencialmente expressos através do método da Biblioteca de cDNA Subtrativa Supressiva (*Supression Subtractive Hybridization* – *SSH*) (Diatchenko et al., 1996)

3.4.1 Princípio do Método

Amostras de cDNA são digeridas com a enzima de restrição *RsaI* e subdivididas em duas alíquotas, agora chamadas bibliotecas. Uma delas, denominada *Tester*, é ligada a adaptadores constituídos de seqüências complementares a *primers* para PCR, enquanto a outra, denominada *Driver*, não é ligada a nenhum adaptador. A biblioteca *Tester* de um dos pacientes é misturada à biblioteca *Driver* do outro paciente (em excesso) e, após hibridização, os transcritos comuns não são mais detectados, pois o excesso de *Driver* reduz efetivamente a quantidade desses fragmentos. Apenas os transcritos não hibridizados (com adaptadores) serão amplificados pela PCR, com a utilização dos iniciadores complementares aos adaptadores.

São, na verdade, duas hibridizações. Antes da primeira, da biblioteca *Tester* são feitas duas alíquotas e a cada uma delas são ligados adaptadores diferentes (no caso, 1 e 2R). Após as duas hibridizações, feitas conforme o esquema a seguir (Figuras 3a e 3b), os transcritos diferencialmente expressos são amplificados para posterior identificação.

Os transcritos não hibridizados de ambas as bibliotecas, amplificados, são então clonados e seqüenciados. Os perfis transcricionais obtidos na SSH representam os genes que se expressaram diferencialmente em cada indivíduo, tipo celular ou situação.

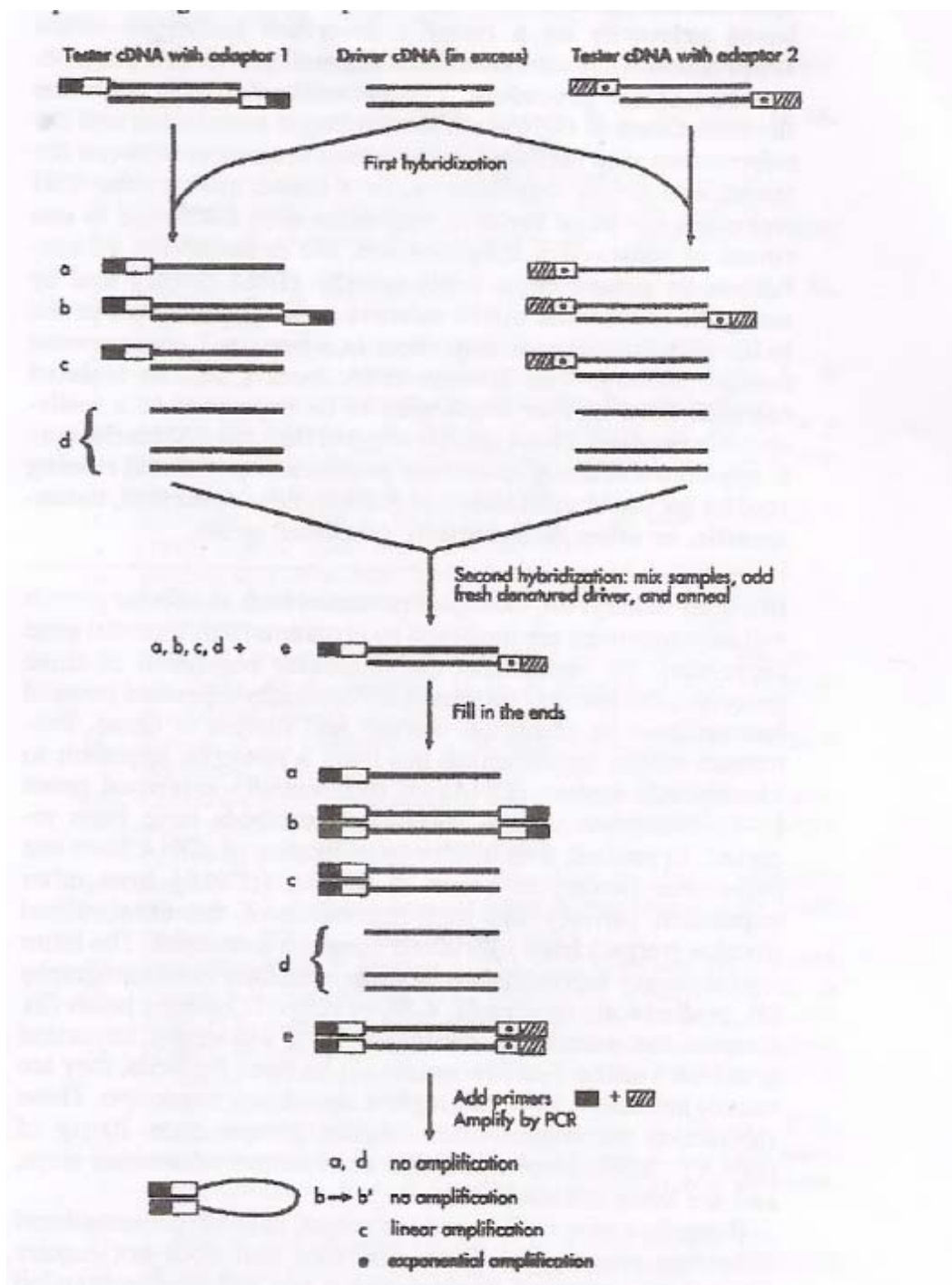


Figura 3a- Representação esquemática da *SSH* (Diatchenko et al., 1996)

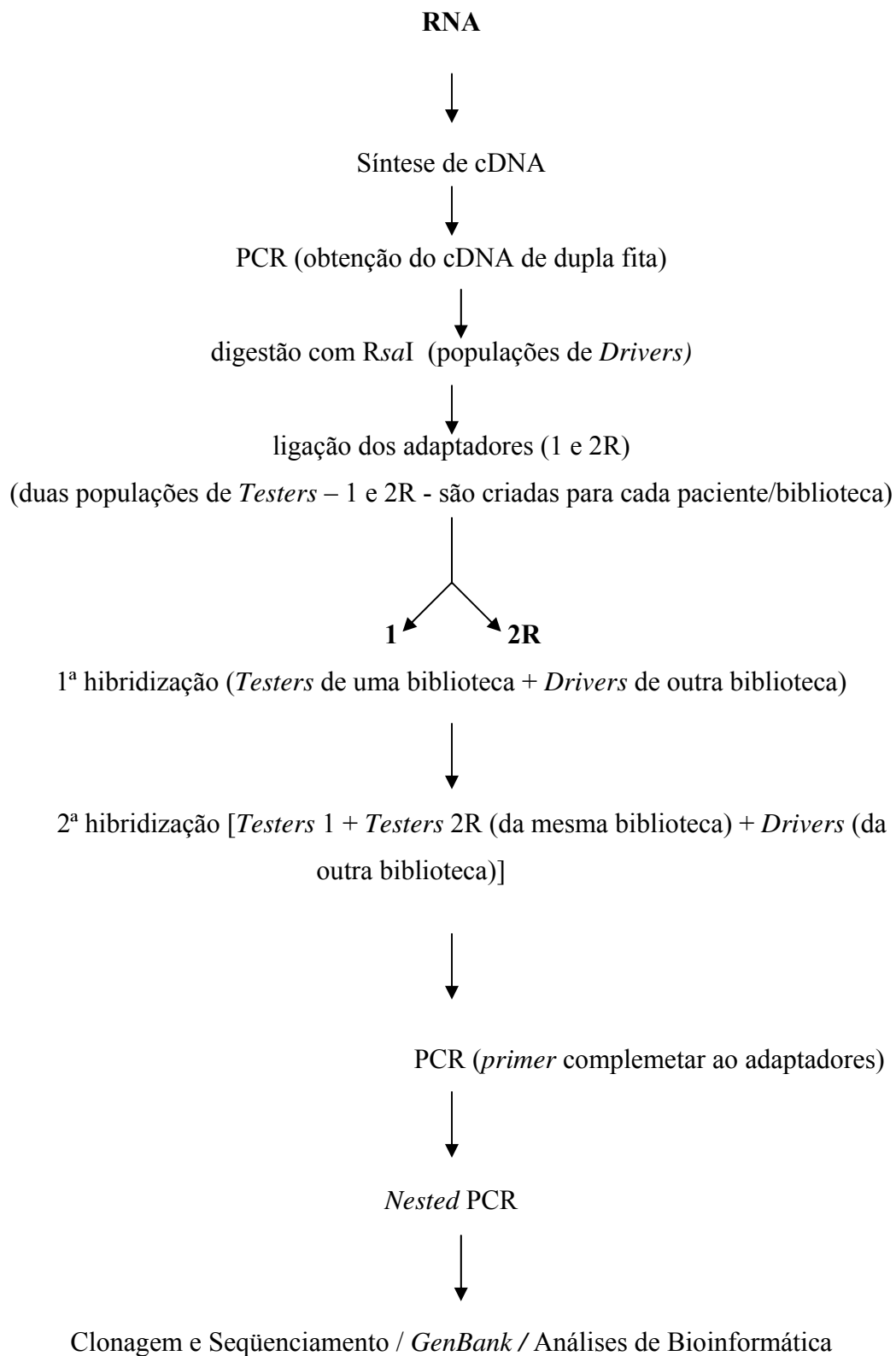


Figura 3b- Resumo das etapas que constituem a *SSH*

3.4.2- Síntese e amplificação de cDNA para construção das bibliotecas

Para a síntese da 1ª fita de cDNA, utiliza-se um *oligo (dT)* modificado (3' BD SMART CDS IIA), complementar à cauda de poli-A do mRNA. Quando a transcriptase reversa alcança a porção 5' do RNAm, a atividade transferase terminal da enzima acrescenta desoxicitidina à extremidade 3' do cDNA recém-sintetizado. Um outro iniciador acrescentado à reação, *oligo(G)* (SMART IIA), liga-se à desoxicitidina, criando um molde estendido. A enzima transcriptase reversa muda de molde e dá continuidade à replicação até o final do oligo, sintetizando um cDNA fita simples com a sequência completa 5' do RNAm (Zhu et al.,2001). A síntese de cDNA descrita a seguir foi adaptada do protocolo do kit **BD SMART PCR cDNA Synthesis Kit** (BD Biosciences, USA): 2µg de cada RNA foram tratadas com 1U de DNase I (Invitrogen, USA), por 15 minutos, à temperatura ambiente, para remoção de DNA contaminante; posteriormente, 1 µl de EDTA pH 8,0 foi adicionado às reações, seguindo-se uma incubação a 65°C, por 5 minutos, para inativação da DNase. Às amostras foram adicionados 1,5 µl de cada iniciador, ambos com concentração de 20 µM [o *primer* 3'BD SMART CDS IIA (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎VN - 3'; V = A, G, ou C e N = qualquer uma das bases), que se associa à cauda de Poli A, atuando como iniciador para a transcriptase reversa, e o *primer* SMART IIA (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG TACGCGGG - 3')]. As reações foram novamente incubadas a 70°C por 2 minutos, e a elas acrescentados 8,5 µl de uma mistura de reagentes constituída de 4 µl de tampão 5x RT, 2µl de DTT 0,1 M, 1,5 µl de dNTP 10 mM, e 1 µl de RNase OUT; após incubação por 2 minutos a 42 ° C, 1µl da transcriptase reversa, *Superscript II* (Invitrogen, USA) foi adicionado às amostras e estas mantidas por 50 minutos a 42°C, e a 70° C por 15 minutos para inativação da enzima. A cada cDNA obtido, 1 U de RNase H (Invitrogen, USA) foi acrescentado (incubação a 37°C por 20 minutos). Para obtenção do cDNA de dupla fita para posterior construção das bibliotecas, 2 µl de cada cDNA obtido foram amplificados pela PCR, de acordo com o protocolo que se segue: 5µl de tampão de PCR HiFi 10x, 2 µl de MgSO₄ 50 mM, 2µl de dNTP 10 mM, 1 µl do *primer* IIA (5'-AAGCAGTGGTATCAAGC GAGAGT - 3') e 0,2 µl da enzima Taq polimerase de alta fidelidade (*Platinum High Fidelity Polymerase* –

Invitrogen, USA). As condições de amplificação foram: 96°C nos 2 minutos iniciais, seguidos de 42 ciclos constituídos de 95°C – 10 segundos, 60°C – 15 segundos, 68°C – 7 minutos. Esta reação é um teste para que se possa determinar o número de ciclos da PCR para amplificação do cDNA a ser utilizado na construção das bibliotecas subtrativas. A partir do 25º ciclo, portanto, são coletadas alíquotas de cada reação a cada 2 ou 3 ciclos, que são analisadas em gel de agarose 1,5% . O ciclo ideal, que deve estar antes do ponto de saturação da reação, é aquele que corresponde à banda de maior intensidade e representa os transcritos mais freqüentemente expressos. Os ciclos escolhidos foram o 27º e o 30º para as amostras de MKS e FKS, respectivamente. A partir desta padronização, os cDNAs foram submetidos a nova reação, nas mesmas condições do procedimento anterior, utilizando-se o melhor número de ciclos para a construção de cada biblioteca.

3.4.3- Purificação do cDNA e digestão com a enzima *RsaI*

As amostras de cDNA obtidas nas reações da PCR foram purificadas em colunas GFX (Amershan Biosciences, UK), recuperando-se um volume final de 115 µl de cada amostra. Uma alíquota de 5 µl foi utilizada para avaliar a recuperação da amostra purificada, em gel de agarose, e 5 µl foram reservados para avaliação dos produtos digeridos. Os 105 µl restantes foram digeridos com 2 µl da enzima *RsaI* (5U/µl), tampão 1x da enzima, com volume final de reação de 119 µl, a qual foi incubada a 37°C por 17 horas. A eficiência da digestão foi avaliada em gel de agarose, tendo como controle 5 µl de cada amostra não digerida. O produto total da digestão foi purificado com igual volume da uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Invitrogen, USA) e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e o DNA precipitado com acetato de amônio 2M e 2 volumes de etanol absoluto. Após 20 minutos de nova centrifugação (12.000 rpm), o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado lavado com 500 µl de etanol 75%. Depois de seco, o DNA foi diluído em 7 µl de água. Uma alíquota de 1 µl deste produto foi observada em gel de agarose.

3.4.4- Ligação dos adaptadores

O procedimento a seguir foi realizado de acordo com instruções do fabricante do kit: *Clontech PCR – Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech, USA). Um μl de cada produto de digestão purificado (amostras de MKS e FKS) foi diluído em 4 μl de água, e desta diluição foram feitas 2 alíquotas de 2 μl de cada amostra (2 alíquotas de 2 μl para MKS e 2 alíquotas de 2 μl para FKS). Cada alíquota foi ligada a 2 adaptadores diferentes, denominados adaptador 1 e adaptador 2R (ambos na concentração final de 10 μM), através da enzima ligase, de acordo com o que se segue: 2 μl de amostra foram misturados a 2 μl de adaptador 1 ou 2R, 2 μl de tampão ligase 5x, 1 μl da enzima T4 ligase e 3 μl de água. As reações de ligação foram estocadas a 16°C por 20 horas e posteriormente incubadas a 72°C para inativação da enzima. Foram assim as duas bibliotecas (MKS e FKS), ligadas a adaptadores e denominadas **Tester**. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento da primeira hibridização. As reações digeridas e não ligadas aos adaptadores foram denominadas cDNA *Driver*. Dois μl da reação de ligação com o adaptador 1 foram misturados a 2 μl da reação de ligação com o adaptador 2 e reservados como teste não subtraído para análise posterior.

3.4.5- Hibridizações

Na primeira hibridização foram misturados, em tubos separados, 1,5 μl de cada ligação de cDNA *Tester* da amostra de FKS com 1,5 μl de cDNA *Driver* de MKS em excesso 1 μl de tampão de hibridização 4x (Clontech). A mistura foi incubada a 98°C por 1 minuto e 30 segundos (desnaturação), e em seguida a 68°C por 8 horas (hibridização). O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se cDNA *Tester* de MKS e cDNA *Driver* de FKS. Nesta etapa os transcritos diferencialmente expressos em cada biblioteca, não sofreram hibridização, pois não encontraram correspondentes nas populações *Driver*. Na 2ª hibridização, um novo *Driver* é preparado como se segue: 1 μl da mistura de 2 μl de água, 1 μl de tampão de hibridização 4x e 1 μl de cDNA *Driver* digerido com *RsaI* foram incubados a 98°C por 1 minuto e 30 segundos, e esta reação misturada com as amostras de

cDNA *Tester* da primeira hibridização. Nesta etapa são misturadas as 3 reações: cDNA *Tester*-adaptador 1 após a primeira hibridização; cDNA *Tester* – adaptador 2R após primeira hibridização e o novo *Driver*. A mistura das amostras foi incubada a 68°C por 16-20 horas; posteriormente, 200 µl do tampão de diluição foram adicionados às amostras e estas novamente incubadas a 68°C por 7 minutos, e estocadas a –20°C.

3.4.6- Amplificação por PCR

Primeiro PCR

Os cDNAs diferencialmente expressos foram amplificados pela PCR com o uso de iniciadores com seqüências complementares aos adaptadores ligados às extremidades dos transcritos. Dois µl de cada cDNA obtidos na segunda hibridização foram amplificadas pela PCR nas seguintes condições: 2,5µl de tampão de PCR 10x, 1 µl de MgCl₂ 2 mM, 1µl de dNTP 10 mM, 1 µl do *primer* 1 10µM (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), 0,5 µl da enzima Taq polimerase (Invitrogen) e 17 µl de água purificada. As condições de amplificação foram: 75°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos iniciais, 28 ciclos de 94°C – 30 segundos; 65°C – 30 segundos; 72°C – 1 minuto e 30 segundos e extensão final de 72°C por 1 minuto. O aquecimento inicial de reação a 75°C durante 5 minutos é feito para preencher as extremidades 3' onde estão os adaptadores na molécula de dupla fita de cDNA. O resultado da amplificação foi avaliado em gel de agarose.

Segundo PCR (*Nested PCR*)

Esta nova reação tem por objetivo enriquecer os transcritos diferencialmente expressos utilizando iniciadores mais internos às seqüências de interesse. A 1 µl do produto da primeira PCR se acrescentou uma mistura constituída de 2,5µl de tampão de PCR 10x, 1 µl de MgCl₂ 2 mM, 1µl de dNTP 10 mM, 1 µl do iniciador *Nested PCR primer* 1 10µM (5'- TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT - 3') e 1µl do outro iniciador, *Nested PCR primer* 2R 10µM (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'), 0,5 µl da enzima Taq polimerase (Invitrogen, USA) e 17 µl de água purificada. As condições de amplificação

etanol absoluto e homogeneizados por *vortex*. As placas foram incubadas por 20 minutos em ambiente escuro e centrifugadas por 45 minutos a 4.000 rpm. O etanol foi removido por inversão das placas e 100 µl de etanol 70% foram adicionados a cada poço. Nova centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C, foi feita. O etanol foi descartado por inversão seguida de “spin” (com as placas invertidas) e as amostras secas a 65°C por 10 minutos, diluídas em 10µl de tampão de aplicação (*loading buffer*) (formamida deionizada, EDTA 25 Mm) e estocadas a 4°C até o momento de sua aplicação no seqüenciador automático *Mega Bace* (Amersham Biosciences, UK).

3.4.8- Análise das seqüências diferencialmente expressas das bibliotecas

As seqüências geradas foram submetidas à análise no Laboratório de Genômica e Expressão do Instituto de Biologia da Unicamp, coordenado pelo Prof.Dr. Gonçalo Amarantes G. Pereira, para análise computacional. As seqüências selecionadas, após remoção dos possíveis contaminantes, foram submetidas à busca de similaridade no *GenBank* (BLASTN e BLASTX). A partir do resultado, foi criada uma tabela para cada biblioteca, baseada na similaridade e classificação por função biológica.

3.5 PCR- Quantitativa em Tempo Real (qRT- PCR) (Higushi et al.,1993)

Com o objetivo de validar e comparar a expressão diferencial de alguns genes selecionados através do *differential display* e da hibridização subtrativa supressiva, foi realizada a qRT-PCR.

O método consiste na detecção de fluorescência na reação de PCR à medida que DNA de dupla fita é gerado na presença de um agente fluorescente intercalante de DNA de dupla fita. O reagente aqui utilizado foi o *SYBRGreen Master Mix* – (Applied Biosystems, USA) que além de conter os reagentes necessários à reação de PCR (dNTPs, MgCl₂, tampão de amplificação, enzima Taq Ampli–Gold), contém o agente fluorescente. O equipamento *ABI 5700 Sequence Detector System* (Applied Biosystems, USA),

empregado no procedimento, possui uma lâmpada halógena como fonte de luz capaz de excitar o fluorocromo do reagente empregado e detectar a fluorescência emitida. Inicialmente, se estabelece um limiar de detecção denominado *threshold*. À medida que a quantidade de produto amplificado em determinada amostra produz uma curva de amplificação que ultrapassa o limiar de detecção, esse ponto de cruzamento é denominado C_t (*threshold cycle*). O C_t se refere à fase exponencial da reação. Quanto o menor o C_t , maior a expressão do gene e, portanto, mais precocemente ele será amplificado. A Figura 4 mostra o monitoramento das curvas de amplificação do (qRT-PCR).

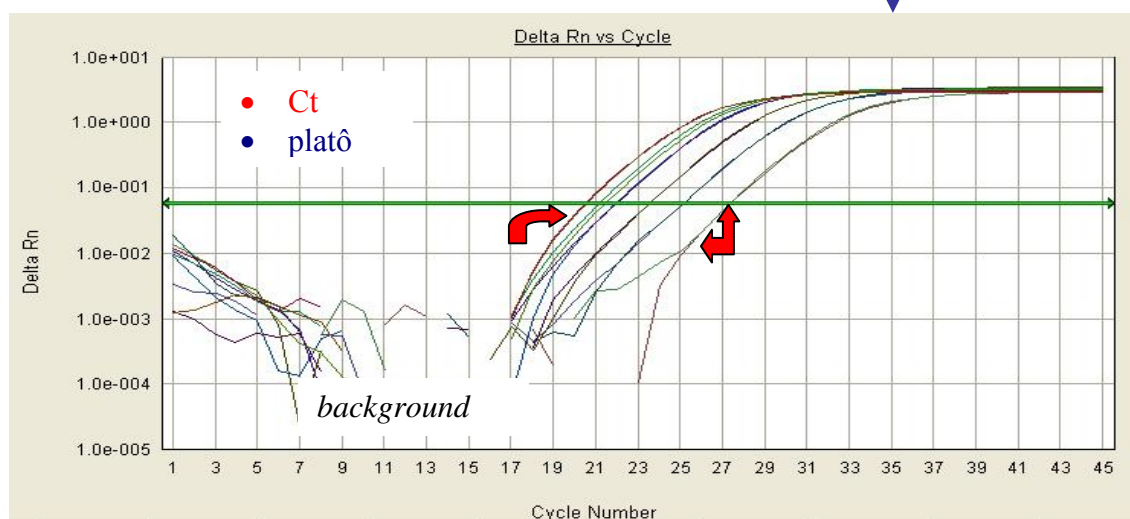


Figura 4- Curva de amplificação de qRT-PCR

A curva sigmóide mostra as fases lag (inicial), log (aumento exponencial da fluorescência) e platô, onde não ocorre mais amplificação. O traço horizontal verde representa o limiar de detecção da fluorescência (*threshold*). A quantidade de produto amplificado em uma reação produz uma curva de amplificação que ultrapassa o limiar de detecção, denominada C_t (*threshold cycle*), representado aqui pelas setas vermelhas. A fluorescência emitida antes do nível do C_t para cada amostra é considerada ruído de fundo (*background*).

As amostras foram amplificadas em duplicata, em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O volume total de reação foi de 12 µl, sendo 6 µl de *SYBERGreen* e 6 µl de reagentes específicos (*primers* e cDNA). A cada conjunto de *primers* foram adicionadas reações controles, sem o cDNA (*NCT – no template controls*). Esse procedimento garantiu que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por ampliações inespecíficas. Os parâmetros de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e nos 20 minutos finais do procedimento, a temperatura foi elevada de forma gradual de 60°C para 95°C. Neste momento ocorre a desnaturação do produto de PCR, com redução repentina da emissão de fluorescência pelo *SYBERGreen* (dado observado na curva de dissociação, Figuras 5 e 6), por ser ele um intercalante de dupla-fita de DNA. Os dados foram coletados na forma de emissão de fluorescência (Ct) e visualizados em forma de curva. O Ct de cada gene foi exportado para uma planilha do programa Excell e submetido ao programa Gnorm (Vandesompele et al., 2002).

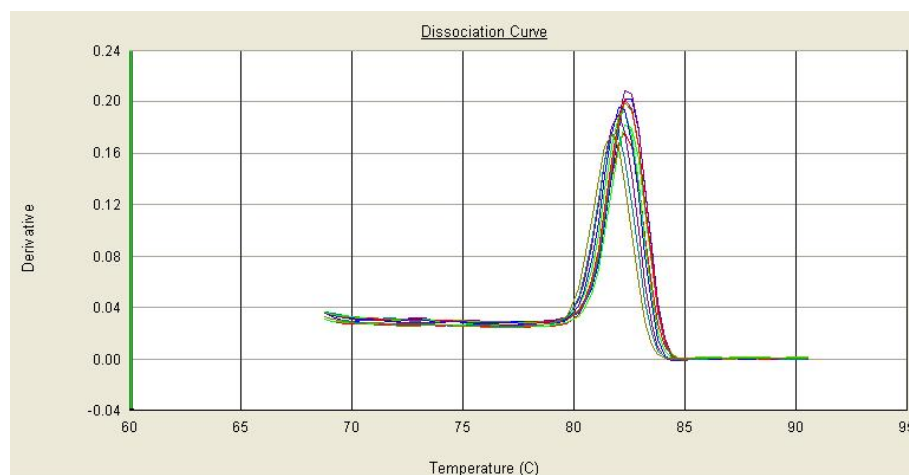


Figura 5- Curva de dissociação para avaliar a qualidade da reação (ausência de produtos inespecíficos ou contaminantes). Ocorre aumento gradual da temperatura (abcissa) e queda repentina da emissão de luz, indicando a dissociação do produto amplificado do agente fluorescente.

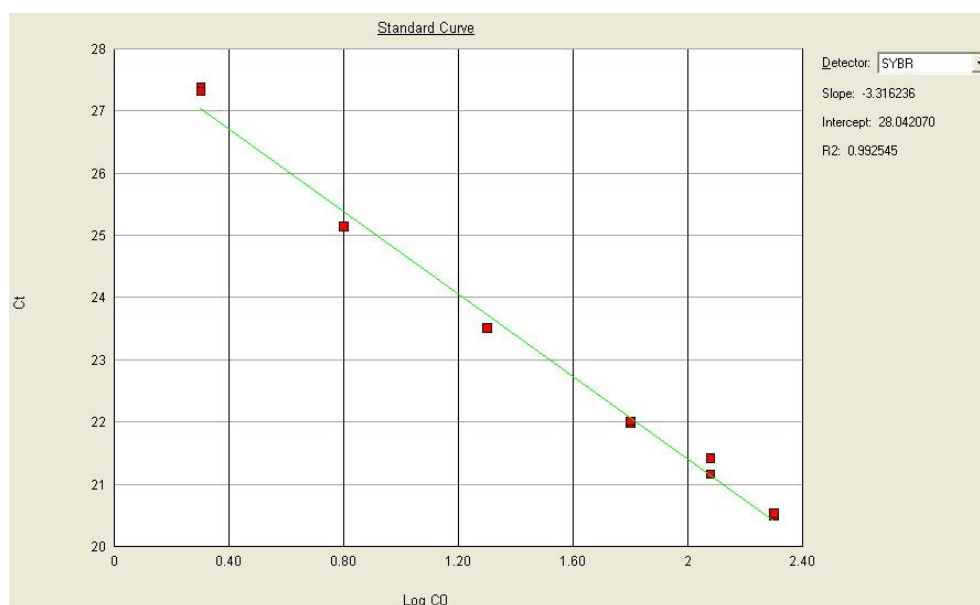


Figura 6- Curva de eficiência da amplificação - O eixo “X” representa a concentração de cDNA (escala logarítmica) e no eixo “Y” encontram-se os *Cts*

3.5.1- Desenho dos *primers*

Os iniciadores foram desenhados através do software *Primer Express* (Applied Biosystems, USA) e submetidos ao programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar a homologia com o gene de interesse. A dimerização de *primers*, ou de qualquer outra estrutura que pudesse comprometer a qualidade das reações, foi avaliada através do programa *Gene Runner*. Alguns itens foram cuidadosamente considerados para o desenho dos *primers*, garantindo a confiabilidade dos resultados: diante da sequência do RNA mensageiro dos genes de interesse, os iniciadores foram desenhados, quando possível, em *exons* diferentes, ou em regiões de transição entre 2 *exons*; o tamanho dos produtos gerados por cada conjunto de iniciadores esteve, como preconizado, entre 50 e 150 pb (pares de bases); o tamanho dos fragmentos obtidos na reação e a detecção de eventuais produtos inespecíficos foram aferidos por PCR, utilizando-se os iniciadores selecionados e a própria amostra de cDNA como molde da reação; os produtos gerados foram observados em gel de agarose a 1,5% e comparados à marcador de tamanho molecular. Antes de executar esses procedimentos, a concentração dos *primers* e a eficiência da reação foram padronizadas. A Tabela 4 mostra a sequência e as respectivas concentrações de cada iniciador empregado na validação e análise dos genes selecionados.

Tabela 4- Relação dos *primers* utilizados para análise da expressão gênica dos genes selecionados

Gene	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')	Conc. (nM)	Símbolo
PIP5KIIA	CCACCGTTTGTCTGTATAGGGA	TTCAGAGTTGGCAGTTCTTTGG	300	PIPK
EKLF	TGCGCAAGAGCTACACCA	GCAGGCGTATGGCTTCTCC	300	EKLF
NFE-2	ATGGAAGTACTTGGCAGGAGA	GGGCTCAAATGATGGCTCAC	300	NFE2
Globina β	AGGCACCGAGCACTTTCTTG	ATCTGTCCACTCCTGATCCAGTT	150	Globinaβ
FAM46C	CCAGAGGGTGTGAACAAGCTC	TCCGTGCAAACCTTCACTAGC	150	FAM46
licoforina C	AATGTGGTCGACGAGAAGCC	TGCATTGTGGTGGAGGCAGA	300	GYPC
EIF4E-BP1	GAAGCCAGCCAGAGCCAC	AATGTCCATCTCAAAGTGTGACTC	600	EIF4
TCEA1	GAAAAATGTCCTCTGTGGAATAT	TCTCTTCAGCTCATCACTAGCC	150	TCEA1
CDC2	GAAGCCTAGCATCCCATGTCA	TTGGCTGGATCATAGATTAACTTT	300	CDC2
CSNK1A1	AAAGAAGATGTCCACGCCTGT	GTAGCCCACGACAATAGTTTAAGTA	150	CKI
Vinculina	TGAGCAAGCACAGCGGTG	ATCATAACATTAGCCAGACGATGC	300	VCL
Geosolina	ATGAGGTCGCTGCATCTGC	CATGGGCTTCCCACCAAAC	300	GSN
RHOA	AGGCTGGACTCGGATTCTGT	TTCCACAGGCTCCATACACC	300	RHOA
RAC1GEF	GAAAACCATCGGAGGAGGAATA	CGATCACTTTAAGGATTGAGCAT	150	RAC1
PIK3CA	GAACCCAGACATCATGTCAGAGTT	TGAAGTGTTAGCATATCTTGCCG	300	PIK3CA
fosfolipase C	AGGAACCAGCCTCTGACGC	ATTGGGTTTGATAAAGCTTCG	150	PLCβ1
INPP5B	GGTCAGAATTGAACATATCAGGGA	CGGCTACAGAATGATTGCTGG	300	INPP5B
PIK4CA	GAGATGTGTGTCGAGGCTACC	CGTGTCACACATGAGAGTGACC	300	PIK4CA
PKD1	GCCAGCTTCGTAATGAGGTTG	GCGTCTCAAACATACACTCCAAAT	150	PKD1
Actinina	CACACCATTGAGGAGATCCAG	GTGGCCTTGAAGTCTCATG	300	ACTN
βactina	AGGCCAACCGCGAGAAG	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	150	ACTB
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	CCACTTGATTTTGAGGGATCT	150	GAPDH

FAM46C = (*family with sequence similarity 46, member C*) - sequência com homologia à família 46 membro C
 PIP5KIIA – (*phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase II alpha*) - fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase tipo II α
 EIF4E-BP1 = (*eukariotic translation initiation factor 4E binding protein 1*) - proteína regulatória da tradução que se liga ao fator de iniciação eIF4E bloqueando a tradução
 TCEA1 = (*transcript ion elongation factor A1*) – fator de transcrição
 CKI = *casein kinase 1* = envolvido com receptor acoplado à proteína G
 CDC2 (CDK) = *cyclin-dependent kinase-like 1* = regula o ciclo celular
 GSN = geosolina VCL = vinculina RHOA = gene com homologia à família RAS, membro A
 RAC1-GEF = fator de transferência de guanina ACTN = actinina PIK3CA = fosfoinositide-3-quinase, alfa catalítico
 INPP5B = PIK4CA = fosfatidilinositol 4-quinase alfa catalítico PKD = proteína quinase D
 PLC = fosfolipase CNFE-2 = fator de transcrição eritróide EKLF = fator de transcrição de globina β
 GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

3.5.2- Padronização da concentração dos *primers*

A concentração ótima de iniciadores é aquela em que o gene de interesse apresenta o menor *Ct* (Cycle threshold), ou seja, o ciclo no qual tem início a amplificação sem a geração de produtos inespecíficos, avaliados pela curva de dissociação, definida a seguir. Nesta etapa, foram utilizadas, para uma mesma quantidade de amostra, concentrações de 150 nM, 300nM, 600 nM e 900 NnM para cada par de *primer*. As concentrações dos *primers* para cada gene analisado estão demonstradas na Tabela IV.

3.5.3- Curva de dissociação

Nos 20 minutos finais da reação, que ocorre em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, a temperatura se eleva de forma gradual de 60°C para 95°C. Neste momento ocorre a dissociação dos produtos gerados na reação e espera-se que a temperatura (*T_m* – *melting temperature*) seja diferente para cada um dos *amplicons*. Isso porque ela depende basicamente do tamanho do produto amplificado e do seu conteúdo de GC. Este é um importante recurso para avaliação da qualidade da reação, da ausência de contaminantes ou da geração de produtos inespecíficos, representado pela Figura 5.

3.5.4- Análise da eficiência da amplificação

Para que a qRT-PCR seja confiável e reprodutível, as amplificações devem apresentar 100% de eficiência a cada ciclo de reação, conforme a fórmula $10^{(-1/slope)}$, onde *slope* significa o coeficiente de inclinação da curva (Meijerink et al., 2001). Esse valor deve ser de aproximadamente 2, significando a duplicação do material genômico a cada ciclo de amplificação e correspondendo a 100% de eficiência.

3.6- Análise dos resultados

O nível de expressão de cada transcrito foi avaliado em relação a uma situação considerada de referência de expressão entre as diferentes amostras, os controles endógenos. Avalia-se a expressão relativa entre o gene de interesse e um gene constitutivo,

cuja expressão não deverá variar significativamente na situação a ser estudada e em relação à sua contra-parte normal. Todos os dados obtidos foram normalizados a partir de 2 genes constitutivos utilizados como controles endógenos: GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e β -ACTINA. Os ensaios foram feitos em duplicata, possibilitando o cálculo da média aritmética entre os Cts, segundo Vandesompele et al., 2002. Foi obtido o Δ Ct, resultante da subtração do menor Ct de um gene de uma amostra com os demais Cts desse mesmo gene das outras amostras estudadas. Em seguida, calculou-se o valor de Q (dos genes endógenos), que corresponde a $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$; $\Delta\Delta\text{Ct}$ é obtido pela subtração do ΔCt da amostra calibradora (controle) do ΔCt da amostra a ser quantificada.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct mínimo} - \text{Ct de cada amostra analisada}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct da amostra a ser quantificada} - \Delta\text{Ct da amostra calibradora}$$

$$Q = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}, \text{ onde 2 representa 100\% de eficiência da reação.}$$

Os valores de Q dos genes endógenos são exportados para o programa Gnorm (Vandesompele et al., 2002) para cálculo da média geométrica entre eles, resultando em um valor denominado Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um gene na amostra é obtida pela razão entre o valor de Q do gene de interesse pelo Fator de Normalização da amostra. O valor resultante é expresso em UA (unidades arbitrárias) ou valor absoluto de expressão, que significa quantas unidades de expressão tem o gene na amostra estudada.

$$\text{UA} = Q/\text{fator de normalização}$$

4- RESULTADOS

4.1- DDRT-PCR - Identificação dos transcritos diferencialmente expressos

A Figura 7 mostra uma autorradiografia de um gel de *display* com ênfase em um transcrito diferencialmente expresso nos reticulócitos dos pacientes analisados.

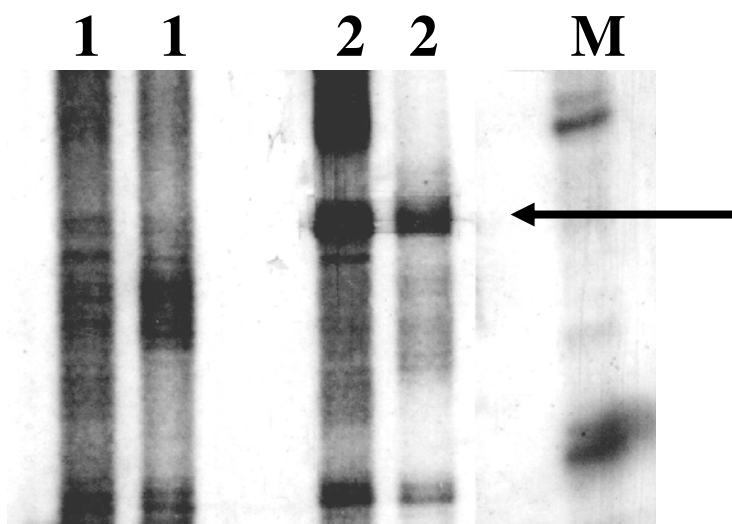


Figura 7- *Differential Display* das amostras de mRNA dos pacientes **FKS (1)** e **MKS (2)**, ambos em duplicata; **M** – marcador de peso molecular (Ladder 1Kb) Os transcritos diferencialmente expressos foram obtidos com os *primers* OPJ01/T12VG. A seta indica as bandas correspondentes ao gene da PIP5KIIA mostrando diferenças no perfil de expressão entre os dois pacientes. O tamanho do fragmento é de aproximadamente 200 pb.

Foram 20 os fragmentos diferenciais gerados a partir da combinação de iniciadores aqui empregada. Dentre eles, apenas 8 transcritos estavam de acordo com os critérios estabelecidos anteriormente (*score* e *e-value*), sendo 7 com tamanho igual ou superior a 100pb. Eles encontram-se descritos na Tabela 5. Os fragmentos foram nomeados de acordo com a ordem de tamanho em que foram detectados (1, 2, 3, 4, 5 ou 6), seguido pelas iniciais do paciente: F (FKS), M ou C (MKS), sendo M e C o mesmo paciente em géis diferentes, conforme o *oligo* dT utilizado (T12 NG ou T12NC, respectivamente).

O fragmento de cDNA de MKS que mostrou similaridade com parte do gene da PIP5KIIA (Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase Tipo II α apresentou a maior diferença quantitativa entre as amostras comparadas (Figura 7). Também foram detectados outros dois transcritos na amostra de MKS, que apresentaram similaridade de 100% com parte do gene da globina β um deles com tamanho de 70 pb. Os demais transcritos alinharam com seqüências do banco de dados mas não correspondem a genes categorizados, com exceção do Gene JAZF1, que codifica uma proteína regulatória com domínio “*zinc finger*”, mas que, por dificuldades técnicas, não pôde ser confirmado.

Tabela 5- Transcritos diferencialmente expressos detectados pela DDRT-PCR

Produto do <i>D. Display</i>	Primers (arbitrário x oligodT)	Tamanho do fragmento (pb)	Gene (seqüência parcial)	Localização (cromossomo)	Identidade/ similaridade	Score (bits) <i>e-value</i>
3M	OPJ01/T12V G	100	PIP5K IIA	10p12.32	162/169 95%	272 - 7e-70
1F	OPJ01/T12VG	248	DNA clone RP3- 370M22	22	291/292 99%	531 e-148
4M	OPJ01/T12VG	200	Clone RP11 29DG12	22	277/281 98%	253 e-139
3C	OPJ01/T12V C	150	mRNA de globina β	11p15.15	26/26 100%	52 5e-04
4C	OPJ01/T12V C	70	mRNA de globina β	11p15.15	26/26 100%	52 - 5e-04
2M	OPJ01/T12VC	100	Seq. DNA humano do clone RP3- 370M22	22	282/286 97%	513 9e-143
2C	OPJ01/T12VC	100	Gene JAZF1 (prot. Regulatória com domínio “ <i>zinc finger</i> ”)	7p15	26/26 100%	52 5e-04
2F	OPJ01/T12VC	270	DNA clone RP3- 370M22	22	283/283 100%	157 4e-04

4.2- Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)

Duas populações de cDNA foram geradas através do método da *SSH*, a partir das amostras de RNA de reticulócitos de **MKS** e **FKS**.

Foram obtidas 250 seqüências com similaridade significativa ($p < 10^{-5}$) (Altschul et al., 1997) após a análise comparativa com o banco de dados através do algoritmo *BLAST*, sendo 130 seqüências para a amostra de MKS e 120 para FKS. As análises de Bioinformática foram realizadas no Laboratório de Genômica e Expressão do Instituto de Biologia da Unicamp.

A biblioteca MKS apresentou 27 genes, 4 ORFs (*open reading frame*), 2 proteínas hipotéticas e 13 ESTs (*expressed sequences tags*). Na biblioteca de FKS foram detectados 14 genes, 2 ORFs e 12 ESTs. Nos dois perfis foram encontrados clones que alinharam com seqüências depositadas no *GenBank* sem, no entanto, representarem genes categorizados (7 na biblioteca de MKS e 12 na de FKS). Do total de seqüências geradas, apenas 4 foram identificadas nas duas bibliotecas, possivelmente por não terem sido subtraídas totalmente durante o procedimento. A seqüência com maior número de repetições foi o fragmento parcial da proteína hipotética “FAM 46C” (Strausberg et al., 2002) detectada 50 vezes na biblioteca de MKS, sugerindo alto nível de expressão desse transcrito. Os transcritos dos genes da PIPK5IIA e da globina β , previamente detectados no *differential display*, foram novamente encontrados na biblioteca do paciente MKS.

A descrição completa dos resultados obtidos na *SSH* encontra-se no Anexo 2.

Considerando-se os parâmetros tamanho do fragmento, *score*, *e-value*, número de repetições e categoria funcional do transcrito, das 250 seqüências inicialmente obtidas, 8 foram selecionadas para validação pela qRT-PCR. A similaridade foi considerada através da comparação com nucleotídeos (BLASTN) e após tradução (BLASTX). Elas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6- Transcritos detectados pela SSH e selecionados para validação

Gene	Tamanho (pb)	Biblioteca	Nº de repetições	Categoria funcional	Localização (cromossomo)	e-value (BlastX)	e-value (BlastN)
FAM 46C	502	MKS	50	Proteína hipotética	1p12	3e-19	0 à 2e-95
Glicoforina C	155	MKS	10	Gene eritróide	2q14-q21	2e-17	1e-60
PIP5KIIA	100	MKS	3	enzima	10p12.32	5e-11	3e-47
EIF4E-BP1	204	MKS	3	Proteína regulatória da tradução	10q21-q22	No hits found	3e-92
Globina β	107	MKS	2	Gene eritróide	11p15.5	16	1e-38
TCEA1	400	FKS	6	Fator de transcrição	3p22	6e-11	2e-51
CKI	382	FKS	4	Regulação de receptor acoplado à proteína G	13q13	18	1e-10
CDC2(CDK)	349	FKS	3	Regulação do ciclo celular	14q22	18	0

FAM46C = (*family with sequence similarity 46, member C*) - seqüência com homologia à família 46 membro C

PIP5KIIA – (*phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase II alpha*) - fofatidilinositol-4-fosfato-5-quinase tipo II α

EIF4E-BP1 = (*eukariotic translation initiation factor 4E binding protein 1*) - proteína regulatória da tradução que se liga ao fator de iniciação eIF4E bloqueando a tradução

TCEA1 = (*transcript ion elongation factor A1*) – fator de transcrição

CKI = *casein kinase 1* = envolvido com receptor acoplado à proteína G

CDC2 (CDK) = *cyclin-dependent kinase-like 1* = regulação do ciclo celular

4.3-Validação da expressão gênica por qRT-PCR

Assim, a expressão dos genes supra selecionados foi submetida à validação por qRT-PCR, com as amostras amplificadas em duplicata e a expressão normalizada a partir da expressão de dois genes constitutivos (GAPDH e ACTB), utilizados como controles endógenos. Os resultados obtidos, fornecidos em unidades arbitrárias (UA), estão demonstrados na Tabela 7, e os gráficos que representam a expressão dos genes investigados encontram-se na Figura 8. As tabelas que mostram os dados brutos para os genes endógenos e para os demais genes analisados encontram-se no Anexo 3.

Tabela 7- Resultado da expressão dos genes da PIP5KIIA e da globina β , por qRT-PCR, nos reticulócitos dos pacientes MKS e FKS e no controle normal (CN); o resultado da expressão é dado em unidades arbitrárias (UA). Em negrito, as expressões validadas.

Gene	Expressão em MKS (UA)	Expressão em FKS (UA)	Expressão em CN (UA)
FAM 46C	0,788697	0,135138	0,524852
Glicoforina C	0,328176	0,6473	0,524852
PIP5KIIA	0,108701	0,031646	0,01561
EIF4E-BP1	0,756569	*ND	0,524852
Globina β	1,138822	0,710796	0,376307
TCEA1	0,472224	0,349292	0,524852
CKI	0,373076	0,272156	0,524852
CDC2(CDK)	0,785968	0,268409	0,524852

*ND = expressão não detectada

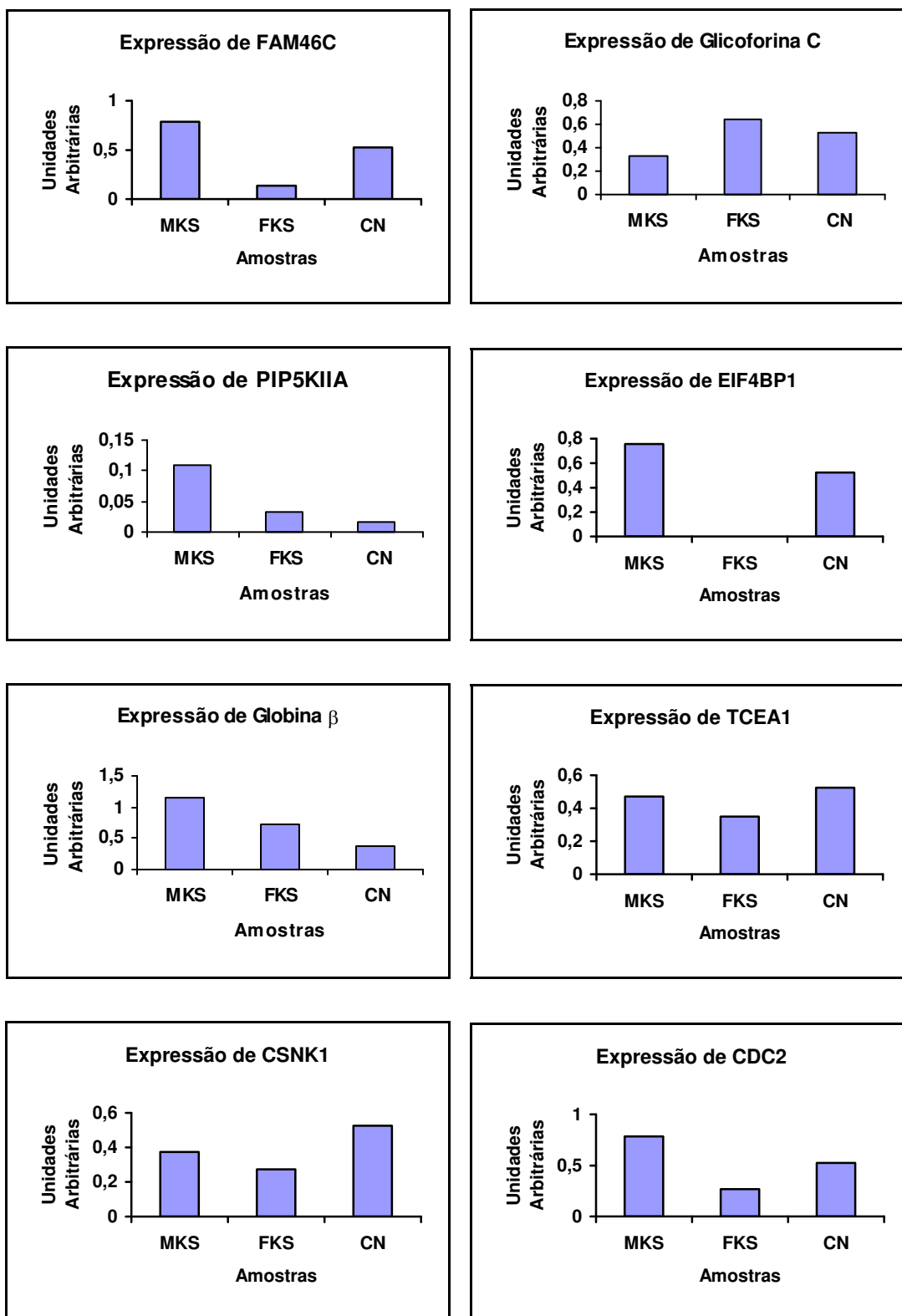


Figura 8- Representação gráfica da expressão dos genes selecionados para validação por qRT-PCR

Os genes FAM46C, PIP5KIIA, EIF4E-BP1 e globina β tiveram seus padrões de expressão confirmados nas amostras de MKS em relação à expressão desses mesmos genes nos reticulócitos de FKS. Já a expressão dos genes GYPC, detectado na biblioteca de MKS, e CSNK1, CDC2 e TCEA1, encontrados em FKS, não pôde ser validada, pois ao contrário do observado nas bibliotecas, o nível de GYPC na amostra de MKS foi duas vezes menor que o encontrado em FKS, e os demais genes mostraram-se mais expressos nas amostras de MKS, conforme demonstrado na Tabela 7. Considerando-se a relação de expressão entre os pacientes comparados e os valores expressos nas células do controle normal, as diferenças mais significativas nos níveis de expressão foram observadas nos genes da PIP5KIIA e da globina β ambos detectados tanto pela DDRT-PCR quanto pela SSH. Por essa razão, a expressão de alguns outros genes a eles relacionados foi também avaliada, na tentativa de se obter uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos. A Tabela 8 sumariza os genes adicionalmente investigados e os respectivos valores de sua expressão nos reticulócitos dos pacientes MKS e FKS e no controle normal (CN). Os gráficos correspondentes a esses resultados encontram-se nas figura 9a e 9b.

Tabela 8- Resultado da expressão de genes relacionados à PIP5KIIA e à globina β , por qRT-PCR, nos reticulócitos dos pacientes MKS e FKS e no controle normal (CN); o resultado da expressão é dado em unidades arbitrárias (UA).

Gene	Localização (cromossomo)	Categoria funcional	Expressão em MKS (UA)	Expressão em FKS (UA)	Expressão em CN (UA)
GSN	9q33	Citoesqueleto	0,263805	0,833646	0,524852
VCL	10q22.1-q33	Citoesqueleto	0,074974	0,042615	0,524852
RHOA	3p21.3	Citoesqueleto	0,1547	0,183329	0,524852
RAC1-GEF	Xq26	Citoesqueleto	0,380915	0,391615	0,524852
ACTN	19q3	Citoesqueleto	0,0054317	0,146351	0,524852
PIK3CA	3q26.3	Metab. PI(4,5)P ₂ Sinalização	0,321423	0,153096	0,524852
INPP5B	1p34	Metab. PI(4,5)P ₂ Sinalização	0,301984	0,275001	0,524852
PIK4CA	22q11.21	Metab. PI(4,5)P ₂ Sinalização	0,303032	0,104568	0,524852
PKD	19p	Metab. PI(4,5)P ₂	*ND	0,231247	0,524852
PLC	2p12	Metab. PI(4,5)P ₂ Sinalização	*ND	1,6217	0,524852
NFE-2	12q13.13	Fator transcrição eritróide	0,122644	0,03801	0,524852
EKLF	19p13.13	Fator transcrição globina β	0,112855	1,67308	0,524852

*ND = expressão não detectada

GSN = geosolina VCL = vinculina RHOA = gene com homologia à família RAS, membro A
RAC1-GEF = fator de transferência de guanina ACTN = actinina PIK3CA = fosfoinositide-3-quinase, alfa catalítico
INPP5B = PIK4CA = fosfatidilinositol 4-quinase alfa catalítico PKD = proteína quinase D
PLC = fofolipase C NFE-2 = fator de transcrição eritróide EKLF = fator de transcrição de globina β

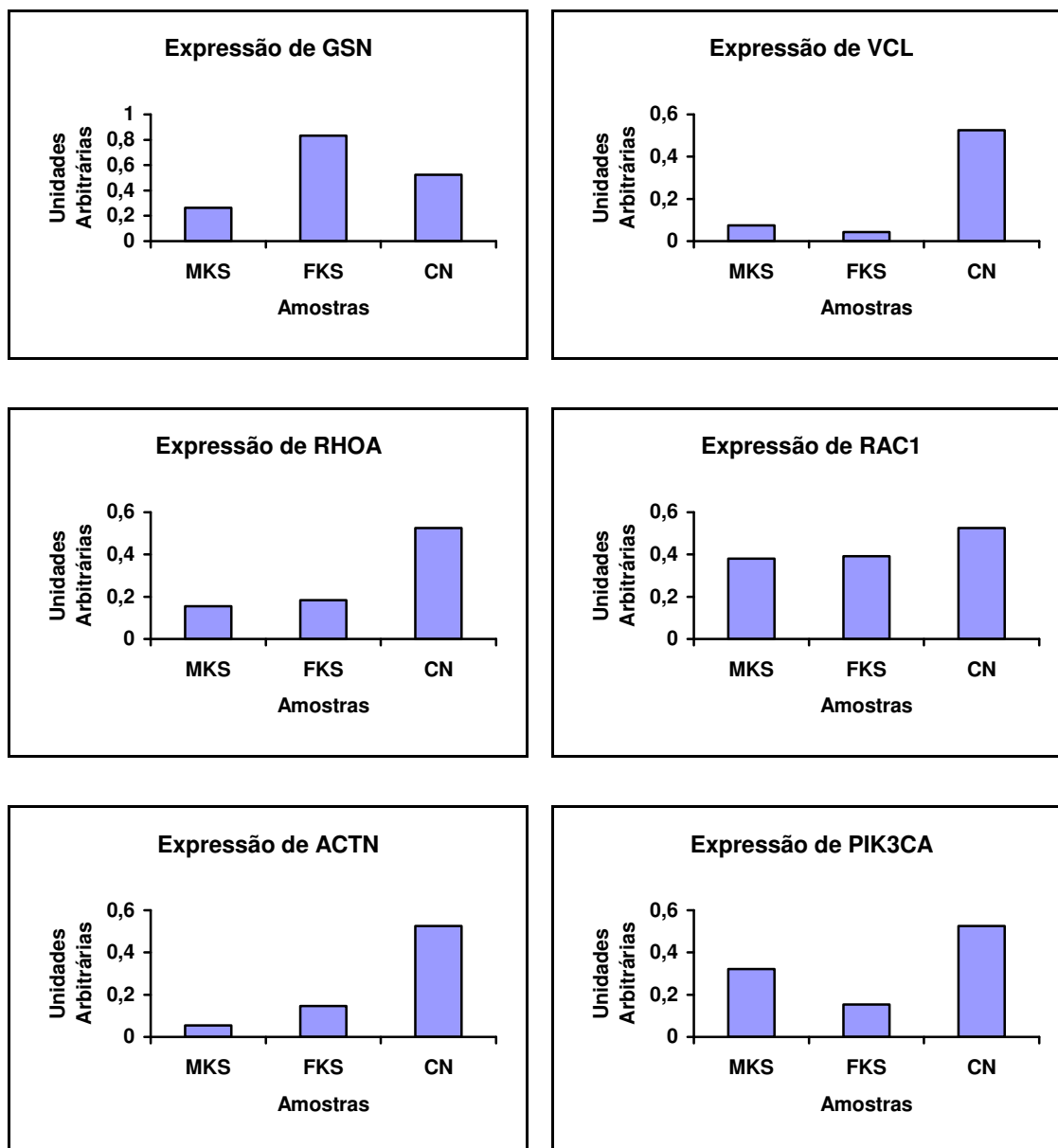


Figura 9 a- Gráficos dos resultados da expressão dos genes GSN, VCL, RHOA, RAC1-GEF, ACTN, PIK3CA envolvidos nas vias de metabolismo do Inositol

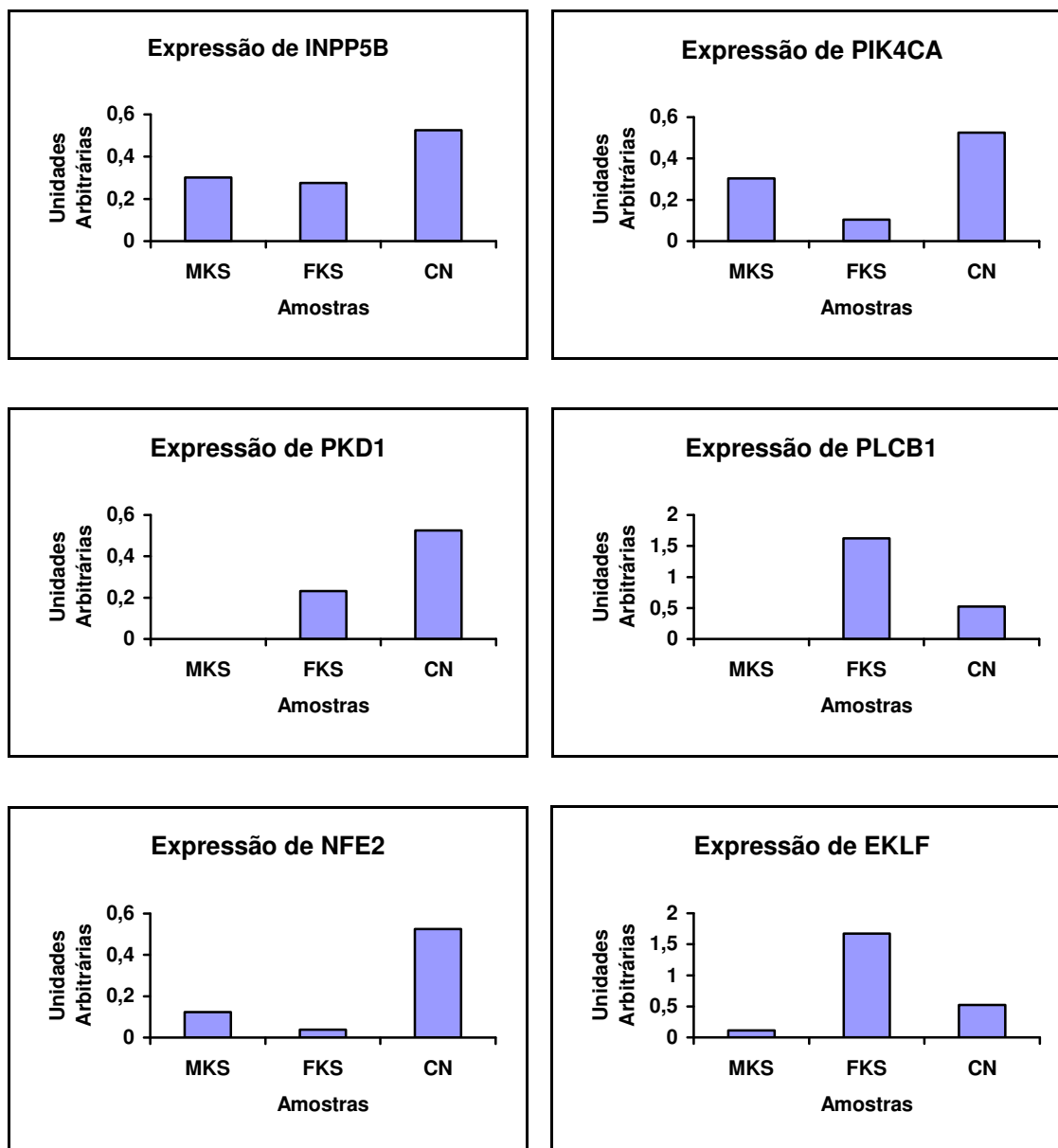


Figura 9 b- Gráficos dos resultados da expressão dos genes INPP5B, PIK4CA, PKD, PLC, NFE-2 e EKLF envolvidos nas vias de metabolismo do Inositol

Os papéis dos genes GSN, VLC, RHOA, RAC1GEF, ACTN, PIK3CA, INPP5B, PIK4CA, PKD e PLC nas vias de atuação da enzima PIP5KIIA (metabolismo do fosfatidil inositol, regulação do citoesqueleto e sistema de sinalização do fosfatidil inositol) estão evidenciados nas Figuras 10a, 10b e 10c [KEGG (*Kioto Encyclopedia Genes and Genoma*) – www.genoma.jp/kegg]. Por outro lado, os genes NFE-2 e EKLF foram escolhidos por se relacionarem com a expressão dos genes de globina β : o NFE-2 codifica fator de transcrição específico de células eritróides (Zhang et al., 1995; Zhang et al., 2002; Wen et al., 2000) e o EKLF é responsável pela síntese de fator relacionado à transcrição específica dos genes β (Hodge et al., 2006; Manwani et al., 2007).

foram: 94°C por 30 segundos iniciais seguidos de 12 ciclos de 94°C – 30 segundos, 68°C – 30 segundos, 72°C – 1 minuto e 30 segundos e extensão final de 2 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose e comparados ao cDNA não subtraído.

3.4.7- Clonagem e seqüenciamento

As clonagens foram realizadas com o kit de ligação p-GEM-T Vector System I (Promega, USA). Três µl do cDNA resultante da segunda amplificação (*nested*) foram adicionados a 5 µl do tampão de ligação 2X, 1 µl de vetor p-GEM-T e 1 µl de T4 ligase, e a reação foi incubada a 4°C por 16 – 20 horas. Cinco µl da reação de ligação foram utilizados para transformar 100 µl de bactérias *DH5µ* competentes por choque térmico (25 minutos em gelo, 1,5 minuto a 42°C e 3 minutos em gelo). As células transformadas foram incubadas em meio LB líquido sem ampicilina, sob agitação (150 rpm), a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, a cultura foi semeada em meio LB/ágar contendo ampicilina e previamente tratado com X-gal (sistema galactosidase para seleção de colônias com inserto), onde foi mantida a 37°C por cerca de 16 horas. As colônias selecionadas (brancas) foram transferidas para placa de 96 poços contendo meio de cultura LB líquido (com ampicilina) e mantidas a 37°C por 16 horas, sob agitação (150 rpm). Em seguida, 2 µl desta cultura foi submetida à amplificação pela PCR, também em placas, utilizando-se iniciadores universais (M13), ambos na concentração de 5pmol. Os parâmetros de amplificação foram: 2 minutos de desnaturação a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 94°C – 20 segundos, 57°C – 15 segundos e 72°C – 1 minuto. Uma alíquota desse produto foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose, para averiguação da amplificação dos insertos, antes da submissão aos seqüenciamentos. A partir dessa confirmação, 1,2 µl de cada produto de PCR foi preparado para o seqüenciamento em placas, com 1µl do iniciador M13 *reverse* (5pmol), 4µl de uma mistura de reagentes necessários à reação (pré-mix – Amershan Biosciences, UK), e água para um volume final de 15 µl por poço. A desnaturação inicial foi de 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C – 20 segundos, 56°C 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os produtos das reações de seqüenciamento foram então purificados com 2 µl de acetato de amônio 7,5M, 50 µl de

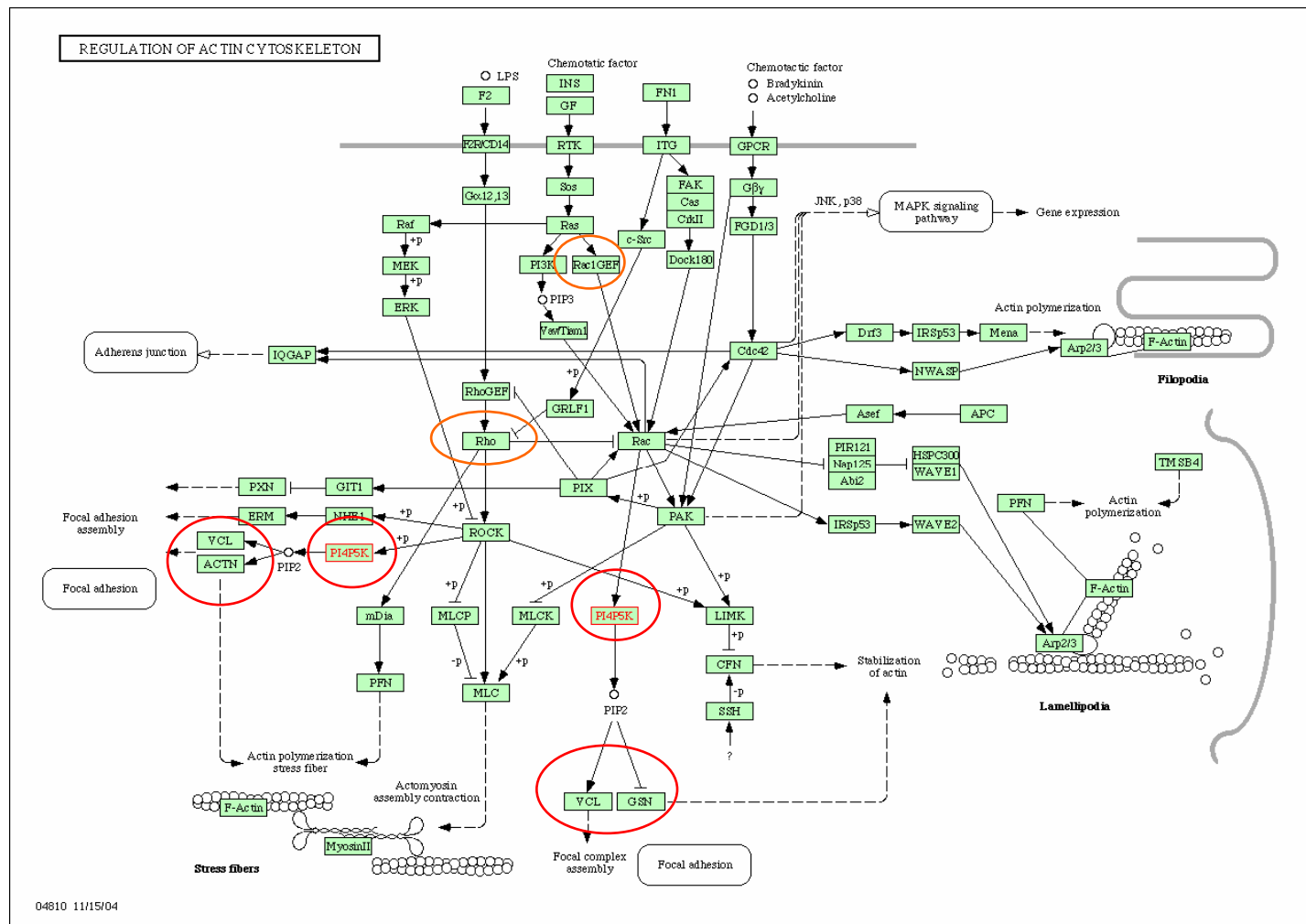


Figura 10c- Regulação do Cisto esqueleto de actina

Dentre os 10 genes relacionados às vias da PIPKIIA, dois mostraram maior nível de expressão no paciente MKS (PIK3CA e PIK4CA), ambos participantes do metabolismo inositol e dos processos de sinalização celular intermediados pelo fosfatidilinositol, enquanto 4 (GSN, ACTN, PKD e PLC) estiveram mais expressos na paciente FKS, os dois primeiros envolvidos com a regulação do citoesqueleto de actina, PKD com o metabolismo do inositol e o último com o metabolismo do inositol e sinalização celular.

Com relação aos fatores de transcrição, o qRT-PCR revelou uma maior expressão do gene do fator NFE-2 no paciente MKS e do gene EKLF em FKS.

5- DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi identificar transcritos diferencialmente expressos em reticulócitos do sangue periférico de pacientes com doença da Hb H de mesma base molecular, com o intuito de contribuir para uma melhor compreensão sobre os fatores envolvidos na heterogeneidade das quantidades de Hb anômala apresentadas por esses indivíduos.

Dois pacientes com genótipo $-\alpha/--^{SEA}$, irmãos, com níveis de 5 e 18% de Hb H, foram estudados. A expressão gênica diferencial foi investigada pelos métodos de *differential display* e hibridização subtrativa, sendo os resultados obtidos validados por PCR quantitativo em tempo real. Ao final, quatro transcritos foram selecionados, dois detectados por ambas as técnicas (correspondentes aos genes da enzima PIP5KIIA e da globina β), e outros dois apenas pela SSH (correspondentes aos genes FAM46C e EIF4E-BP1). Todos eles apresentaram expressão aumentada no paciente com níveis mais elevados de Hb H. Maior ênfase, neste momento, foi dada aos dois primeiros transcritos, o da PIP5KIIA e o da globina β ; FAM 46C corresponde a uma proteína hipotética de função ainda indeterminada (Strausberg et al., 2002) e EIF4E-BP, a uma proteína regulatória da tradução encontrada em células eucarióticas, que se liga ao fator de iniciação eIF4E, abundante nos reticulócitos (Rau et al., 1996). Como as células eucarióticas necessitam de proteínas auxiliares para promover o processo de iniciação da tradução, que consiste no posicionamento do RNAt (RNA transportador) acoplado à metionina (AUG) sobre a subunidade ribossomal menor (40s), o reconhecimento deste complexo pelos RNAs eucarióticos, iniciado pelo reconhecimento da região 5'-CAP, é mediado pela proteína **eIF4F**, composta por 3 subunidades: eIF4A, eIF4E e eIF4G. A eIF4E liga-se diretamente à região 5' CAP e a ela se liga a proteína regulatória EIF4E-BP, para prevenir a formação do complexo ativo de tradução, controlando a síntese protéica e atuando como um regulador negativo para o crescimento celular (Rousseau et al., 1996; Tsukiyama-Kohara et al., 1996; Castellvi et al., 2006).

Na tentativa de melhor compreender os mecanismos responsáveis pelo aumento de expressão de PIP5KIIA e da globina β em MKS, alguns genes relacionados às vias de atuação dessa enzima e à síntese de cadeias β tiveram sua expressão avaliada pela qRT-PCR: GSN (geosolina), VCL (vinculina), RHOA (família de genes homólogos à ras,

membro A), RAC1GEF (fator de transferência de nucleotídeo guanina), ACTN (actinina), envolvidos na regulação do citoesqueleto, PIK3CA (fosfatidilinositol 3-fosfato-quinase catalítica), INPP5B (polifosfato inositol-5-fosfatase), PIK4CA (fosfatidilinositol-4-fosfato quinase catalítica), PKD (proteína quinase D) e PLC (fosfolipase C), pertencentes à via do metabolismo do inositol, e PLC e PIK3CA do sistema de sinalização do fosfatidilinositol, além dos genes que codificam fatores de transcrição relacionados à globina.

Os resultados revelaram uma aparente diferença nos níveis de expressão de genes relacionados ao metabolismo do inositol e à sinalização celular via fosfatidilinositol entre os dois pacientes comparados (PIK3CA e PIK4CA mais expressos em MKS, e PKD e PLC mais expressos em FKS), além de uma maior expressão dos genes GSN e ACTN, envolvidos na regulação do citoesqueleto, na paciente FKS. Embora não conclusivos, eles sugerem que o aumento da transcrição de PIPKIIA no paciente MKS está relacionado às vias de atuação de PIK3CA e PIK4CA, pelo fato desses genes seguirem um padrão muito semelhante de expressão (em ambos encontramos aumento da expressão da ordem de duas vezes em relação à amostra de FKS), o que constitui um indício de seu envolvimento com a enzima PIP5KIIA. Um outro aspecto é a possibilidade da ação do PIK3CA sobre o fosfolípido $PI4,5P_2$ (Figura 10a) resultando na formação de $PI(3,4,5)P_3$ (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato), um metabólito envolvido em um dos mecanismos de regulação negativa da eritropoese, através da inativação de receptores de eritropoetina (Erneux et al., 1998). No entanto, esses achados precisam ser confirmados através de novos experimentos e diferentes abordagens metodológicas para melhor elucidação dos aspectos bioquímicos desse processo.

Os genes PCL (fosfolipase C), GSN (geosolina) e ACTN (actinina), mais expressos em FKS, estão envolvidos na regulação do citoesqueleto de actina. Estímulos extracelulares, como ação de fatores de crescimento, ocasionam mudanças no movimento (mobilidade) e na forma celular, conseqüentemente causam destruição nos filamentos de actina. O remodelamento do citoesqueleto é que controla essas propriedades celulares, considerando-se que o citoesqueleto é fundamental para a manutenção da forma bicôncava e flexível da hemácia. A função de muitas proteínas envolvidas com o citoesqueleto de actina, inclusive a actinina, são reguladas pelo $PI4,5P_2$ (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato)

(Heck et al., 2007). Este produto é degradado pela fosfolipase C (PLC), que também está mais expressa em FKS, gerando dois segundos mensageiros: IP₃ (inositol 1,4,5 trifosfato) e DAG (diacilglicerol). O IP₃ se difunde para o citosol e o DAG permanece na membrana plasmática, e ambos promovem a abertura de canais de Ca⁺⁺. O nível elevado do íon no citosol dispara processos celulares como a proliferação e diferenciação celular, inclusive de células eritróides (Loijens et al., 1996; Doughman et al., 2003).

Com relação aos fatores de transcrição, a maior expressão de EKLF observada em FKS levou a uma aparente contradição. Uma possível explicação é a de que a avaliação da expressão gênica em reticulócitos não espelha fielmente os processos de transcrição que ocorrem nos precursores eritróides, ou seja, a expressão de certos genes pode estar aumentada nos precursores eritróides e silenciada em células maduras. Poderia ser o caso do EKLF, requerido nas últimas etapas da diferenciação eritróide como ativador da transcrição de globina β (Shyu et al., 2007). Em condições normais, a síntese de hemoglobina, por exemplo, ocorre predominantemente na fase de eritroblasto e, embora continue no reticulócito, essa quantidade corresponde a aproximadamente 20% do total de hemoglobina presente na hemácia (Liebhaber *et al.*, 1986; Weatherall e Clegg, 2001). Esse argumento é também válido para os genes das vias da PIP5KIIA: a expressão observada nos reticulócitos reflete apenas parcialmente o que ocorre nos precursores eritróides.

Quanto ao fator de transcrição NF-E2, potencialmente envolvido com a regulação da expressão de globinas por interagir tanto com seqüências regulatórias dos genes β LCR) como dos genes α (α -MRE), o qRT-PCR demonstrou aumento da expressão desse gene nos reticulócitos do indivíduo com maior proporção de Hb H, o que pode estar relacionado às diferenças fenotípicas encontradas. Importante lembrar novamente que a expressão gênica foi avaliada em reticulócitos maduros, portanto em RNAs mensageiros processados, e os dados obtidos indicam uma atuação do fator NF-E2 também em mecanismos de controle pós-transcricional dos genes de globina.

Voltando à enzima PIP5KIIA, uma série de eventos celulares mediados por receptores são ativados por quinases. As PIPKs são classificadas em 3 sub famílias: tipos I, II e III. As sub famílias I e II incluem três isoformas (α , β e γ). Atualmente sabe-se que os

membros da subfamília PIPK tipo I (isoformas α , β e γ) preferencialmente utilizam PI(4)P (fosfatidilinositol 4 fosfato) como substrato para gerar a maioria do PI4,5P₂ na célula, enquanto a PIPK tipo II, sintetiza PI4,5P₂ utilizando PI(5)P (fosfatidilinositol 5 fosfato) como substrato e PIPK tipo III, gera o mesmo produto a partir de PI(3)P (fosfatidilinositol 3 fosfato) (Itoh et al., 1998; Heck et al., 2007). As diferenças entre as PIPKs, além dos substratos utilizados para gerar PI4,5P₂, são seus alvos sub-celulares: a PIPK tipo I está presente na membrana plasmática, em focos de adesão, no núcleo celular, no Complexo de Golgi, e está envolvida com a remodelagem de actina, adesão, secreção, endocitose e regulação de canais iônicos; a PIPK tipo II é encontrada no citosol, no núcleo e associada ao retículo endoplasmático (Boronenkov et al., 1998; Doughman et al., 2003). Suas atribuições funcionais não estão bem estabelecidas mas, assim como a PIPK tipo I, parece estar envolvida com expressão gênica, processamento do pré-mRNA e exportação do mRNA para o citoplasma (Boronenkov et al., 1998; Anderson et al., 1999; Doughman et al., 2003). A PIPK tipo III localiza-se na membrana interna da célula e é um dos responsáveis pela manutenção de sua integridade (Doughman et al., 2003).

A PIP5KIIA pertence à família de lipídioquinasas responsáveis pela produção parcial de PI4,5P₂, cuja hidrólise resulta na formação de diacilglicerol (DAG), que ativa membros da família da proteína quinase C e do inositol trifosfato (IP₃), responsável pela sinalização para a liberação de Ca⁺⁺ das reservas celulares (Bazenet et al., 1990). O PI4,5P₂ é um importante segundo mensageiro que regula uma série de eventos celulares incluindo modulação do citoesqueleto de actina, transporte de vesículas (entre membrana plasmática e compartimento endossomal não derivado de clatrina) (Brown et al., 2001), formação de adesão focal (sítios de adesão para feixes de filamentos de actina) e eventos nucleares como a expressão gênica (Brown et al., 2001; Doughman et al., 2003; Hinchliffe e Irvine, 2006). O gene correspondente foi mapeado no braço curto do cromossomo 10 (10p12.32), e a PIP5KIIA foi a primeira das PIPKs a ser clonada dos eritrócitos humanos (Heck et al., 2007); ela produz, através da fosforilação do fosfatidil inositol-5-fosfato [PI(5)P], o produto lipídico PI4,5P₂, sendo assim um importante modulador da regulação das vias de transdução de sinal do fosfatidilinositol (Loijens et al., 1996; Doughman et al., 2003; Hinchliffe e Irvine, 2006). Os fosfolipídios inositóis são reconhecidos atualmente como uma importante família de moléculas regulatórias envolvidas com movimentos de

íons dentro da célula, polimerização da actina e expressão gênica (Doughman et al., 2003). Seus derivados fosforilados participam de diversos processos celulares. O mais bem caracterizado desses lipídios é o fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato [PI(3,4,5) P₃], um segundo mensageiro que atua sob o efeito de numerosas tirosinoquinasas e receptores acoplados à proteína G (Hinchliffe e Irvine, 2006).

Estudos têm sido realizados para melhor elucidar as funções da PIP5KIIA. Foi recentemente demonstrado que essas enzimas podem ser fosforiladas pela proteína quinase D (PKD), nos seus resíduos treonina do “looping” de ativação, região localizada na porção C-terminal de todas as quinases e constituída de cerca de 25 aminoácidos, que é por onde a PIPK reconhece e se liga ao seu substrato (Doughman et al., 2003). Mutações nesta região demonstraram uma reduzida atividade enzimática, consistente com a hipótese de que a fosforilação inibe a atividade da quinase (Hinchliffe et al., 1998; Hinchliffe e Irvine, 2006).

Este foi, de nosso conhecimento, o primeiro estudo feito sobre expressão gênica diferencial em pacientes α -talassêmicos. Dos quatro transcritos triados nos reticulócitos dos pacientes investigados (PIP5KIIA, globina β , EIF4E-BP1 e FAM46C), a dois se deu maior importância no momento por terem sido detectados por ambas as técnicas empregadas: o correspondente ao gene da PIP5KIIA e o correspondente ao gene da globina β . Ambos estiveram mais representados no paciente que apresenta maiores níveis de Hb H, sugerindo que a proporção mais elevada de Hb anômala se deve a uma taxa maior de transcrição desse último gene, e que, de alguma forma, sua expressão é influenciada pela PIP5KIIA e pela via de sinalização celular do fosfatidilinositol. Transcritos dessa enzima não se encontram descritos entre aqueles identificados pela técnica de SAGE em reticulócitos normais (Bonafox et al., 2004); além disso, Boronenkov et al., em 1998, demonstraram que essas quinases estão associadas a domínios subnucleares, identificados como “*nuclear speckles*”, que também contêm fatores participantes do processamento de mRNA. Muito pouco se sabe, porém, sobre esses processos. Estudos que busquem elucidar o papel da PIP5KIIA em células eritróides e determinar sua relação com a expressão dos genes de globina são necessários para que uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos seja alcançada. Um número maior de pacientes, para esclarecer se o aumento de expressão do gene da PIP5KIIA está sempre correlacionado com o aumento de expressão do gene β ou se esse foi

um achado encontrado especificamente no caso aqui estudado, e o papel da proteína EIF4E-BP1 neste contexto, devem ser investigados. Estudos funcionais da enzima PIP5KIIA poderiam esclarecer de forma consistente o seu papel nas células eritróides, e se o aumento de expressão desse gene está correlacionado com o aumento de expressão do gene β . Uma análise mais cuidadosa de outros transcritos encontrados nos dois perfis, ou mesmo a continuidade nos sequenciamentos dessas bibliotecas, poderão trazer elementos que possam elucidar outros mecanismos envolvidos na Doença da Hb H.

6- CONCLUSÃO

Os dados deste trabalho constituem o primeiro estudo sobre expressão gênica diferencial em pacientes α -talassêmicos. Os resultados obtidos sugerem que as diferenças nos níveis de Hb H dos pacientes estudados se devam a diferentes taxas de transcrição do gene da globina β e que, de alguma forma, este processo é influenciado pela enzima PIP5KIIA, via sinalização celular pelo fofatidilinositol, tendo em vista a correlação da expressão observada entre esse gene e o da globina β .

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25 (17): 3389-3402.

Anderson RA, Boronenkov IV, Doughman SD, Kunz J, Loijens J. Phosphatidylinositol Phosphate Kinases, a Multifaceted Family of Signaling Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274 (15): 9907-10.

Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempest P, Orkin SH. Erythroid transcription factor NFE-2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 1993; 362: 722-8.

Andrade TG, Peterson KR, Cunha AF, Moreira LS, Fattori A, Saad STO, Costa FF. Identification of novel candidate genes for globin regulation in erythroid cells containing large deletions of the human β -globin gene cluster. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 2006; 37: 82-90.

Assmann EM, Ottoboni LMM, Ferraz A, Rodriguez J, Mello MP. Iron-responsive genes of *Phanerochaete chrysosporium* isolated by differential display reverse transcription polymerase chain reaction. *Environmental Microbiology* 2003; 5(9): 777-86.

Bals R, Jany B. Review: Identification of disease genes by expression profiling. *Eur Respir J* 2001; 18: 882-9.

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

Bonafoux B, Lejeune M, Piquemal D, Queré R, Baudet A, Assaf L, Marti J, Aguilar-Martinez P, Commes T. Analysis of remnant reticulocytes mRNA reveals new genes and antisense transcripts expressed in the human erythroid lineage. *Haematologica* 2004; 89 (12): 1434-40.

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

Bottardi S, Ross J, Pierre-Charles N, Blank V, Milot E. Lineage-specific activators affect beta-globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors. *EMBO J* 2006; 25 (15): 3586-95.

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

Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, WB Saunders Company; 1986.

Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, Baselga J, Ramon y Cajal S. Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer* 2006; 107(8): 1801-11.

Crawford DR, Kochheiser JC, Schools GP. Differential Display: a critical analysis. *Gene Expression* 2002; (10): 101-7.

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

Dale GL. Phosphatidylinositol 4 – phosphate kinase is associated with the membrane skeleton in human erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1985; 133 (1): 189-94.

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

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Supression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6025-30.

Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA. Phosphatidylinositol Phosphate Kinases Put PI4,5P₂ in Its Place. *J. Membrane Biology* 2003; 194: 77-89.

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

Embury SH, Miller JA, Dozy AM, Kan YW, Chan V, Todd D. Two Different Molecular Organizations Account for the Single α -Thalassemia-2 Genotype. *L Clin Invest* 1980; 66:1319-25.

Erneux C, Govaerts C, Communi D. The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5- phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1436(1-2): 185-99.

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

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

Fosberg EC, Downs KM, Bresnick EH. Direct interaction of NFE-2 with hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region in living cells. *Blood* 2000; (1): 334-9.

Forrester WC, Takegawa S, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Groudine M. Evidence for a locus activation region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 10159-77.

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

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

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

Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SLC, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:992-7.

Heck JN, Mellman DL, Ling K, Sun Y, Wagoner MP, Schill NJ, Anderson RA. A Conspicuous Connection: Structure Defines Function for the Phosphatidylinositol-Phosphate Kinase Family. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 42: 15-39.

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

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

Higgs DR, Wainscoat JS, Flint J, Hill AVS, Thein SL, Nicholls RD, Teal H. Analysis of the human α -globin cluster reveals a highly informative genetic locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5165-69.

Higgs DR, Vickers MA, Vikie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A Review of the Molecular Genetics of the Human α -Globin Gene Cluster. *Blood* 1989; 73: 1081-104.

Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, Sharpe J, Lida J, Pretorius IM, Ayyub H. A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus. *Genes and Dev* 1990; 4: 1588-601.

Higgs DR. The haemoglobinopathies. *Baillière's Clinical Haematology* 1993; 6:117-150.

Higgs DR, Garrick D, Anguitta E, DE Gobbi M, Hughes J, Muers M, Vernimmek D, Lower K, Law M, Argentaro A, Deville MA, Gibbons R. Understanding α -globin gene regulation: aiming to improve the management of thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1054 (1): 92-102.

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

Hinchliffe KA, Irvine RF. Regulation of type II PIP Kinase by phosphorylation. *Cellular Signalling* 2006; 18: 1906- 13.

Hodge D, Coghill E, Keys J, Manguire T, Hartmann B, McDowall A, Weiss M, Grimmond S, Perkins A. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood* 2006; 107 (8): 3359-70.

Hughes JR, Cheng JF, Ventress N, Prabhakar S, Clark K, Anguita E, Gobbi M, Jong P, Rubin E, Higgs DR. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and functional assessment of multispecies conserved sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9830-35.

Itoh T, Ijuin T, Takenawa T. A Novel Phosphatidylinositol-5-phosphatase 4-Kinase (Phosphatidylinositol-phosphate Kinase II γ) Is Phosphorylated in the Endoplasmatic Reticulum in Response to Mitogenic Signals. *J Biol Chem* 1998; 273 (32): 20292-99.

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

Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Fortina P. Human α Thalassemia Syndromes: Detection of Molecular Defects. *Am J Hematol* 1996; 53:81-91.

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

Kanavakis E, Trager-Synodinos JM, Papasotiriou I, Vrettou C, Metaxotou-Mavromati A, Stamoulakatou A, Lagona E, Kattamis C. The interaction of α^0 thalassaemia with Hb Icaria: three unusual cases of haemoglobinopathie H. *Br J Haematol* 1996; 92: 332-35.

Liebhaber SA, Cash FE, Main MD. Compensatory increase in α_1 -globin gene expression in individuals heterozygous for the α -Thalassaemia-2 deletion. *J Clin Invest* 1985; 76: 1057-64.

Liebhaber AS, Cash FE, Ballas SK. Human α -globin gene expression. The dominant role of the α_2 -locus in mRNA and protein synthesis. *J Biol Chem* 1986; 261:15327-33.

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

Linskens MHK, Tonkin LA, Saati SM. Enhanced Differential Display: A Reproducible Method for the Analysis of Differential Gene Expression. *Cell Biology: a laboratory handbook*, 2nd Ed. Academic Press; 1998. V.4.

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

Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1170-1177.

Manwani D, Galdass M, Bieker JJ. Altered regulation of beta-like globin genes by a redesigned erythroid transcription factor. *Exp Hematol* 2007; 35 (1): 39-47.

Martinez G, Colombo B. Alpha-Thalassaemia in Cuba. *Acta Haematol* 1976; 55: 36-9.

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

Nicholls RD, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. α^0 Thalassemia Due to Recombination Between the $\alpha 1$ -Globin Gene and *Alu* I Repeat. *Blood* 1985; 65: 1434-38.

Orkin SH, Antonarakis SE, Kazazian JR. Polymorphism and molecular pathology of the human beta globin gene. *Prog Hematol* 1983; 13: 49-73.

Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992; 80: 575-81.

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

Patrinos GP, Krom M, Boer E, Langeveld A, Imam AMA. Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. *Gene & Development* 2004; 18:1495-1509.

Pressley L, Higgs DR, Metaxatou-Mavromati A, Clegg JB, Weatherall DJ. Characterization of a new α thalassemia-1 defect due partial deletion of the α globin gene complex. *Nucleic Acids Research* 1980; 8 (21): 4889-98.

Rau M, Ohlmann T, Morley SJ, Pain VM. A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 1996; 271 (15): 8983-90.

Rousseau D, Gingras AC, Pause A, Sonenberg N. The eIF4E - binding proteins 1 and 2 are negative regulators on cell growth. *Oncogene* 1996; 13(11): 2415-20.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor; 1989.

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

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

Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA. Generation and initial analysis of more than 15, 000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99 (29): 16899-903.

Shyu YC, Lee TL, Wen SC, Chen H, Hsiao WY, Chen X, Hwang J, Shen CKJ. Subcellular Transport of EKLF and Switch-On of Murine Adult β_{maj} Globin Gene Transcription. *Mol Cell Biol* 2007; 27(6): 2309-23.

Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Tzetis M, Kattamis A, Kattamis, C. Characterization of Nondeletional α -Thalassemia Mutations in the Greek Population. *Am J Hematol* 1993; 44: 162-7.

Tsukiyama-kohara K, Vidal SM, Gingras AC, Glover TW, Hanash SM, Heng H, Sonenberg N. Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-BP binding proteins 1 and 2. *Genomics* 1996; 38 (3): 353-63.

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

Velculescu VE, Zhang L., Vogelstein B. Serial analysis of gene expression. *Science* 2000; 270 (5235): 484-487.

Viprakasit V, Harteveld C, Ayyub H, Stanley J, Giordano PC, William GW, Higgs DR. A novel deletion causing α thalassemia clarifies the importance of the major human alpha regulatory element. *Blood* 2006; 107: 3811-3812.

Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassaemia Syndromes*. 4th ed. Oxford, Ed. Blackwell Science Ltda; 2001.

Wen S, Roder K, Hu K, Rombel I, Gavva NR, Daftari P, Kuo Y, Wang C, Shen CJ. Loading of DNA-Binding Factors to an Erythroid Enhancer. *Mol Cell Biol* 2000; 20 (6): 1993-2003.

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

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

Zhang Q, Rombel I, Reddy N G, Gang J-B, Shen CKJ. Functional Roles of *in Vivo* Footprinted DNA Motifs within an α -globin Enhancer. *The journal of Biological Chemistry* 1995; 270 (15): 8501- 05.

Zhang H, Liu D-P, Liang C, The Control of Expression of the α -Globin Gene Cluster. *Int J Hematol* 2002; 76: 420-29.

Zhou G, Xin L, Song W, Di L, Liu G. Active chromatin hub of the mouse α -globin locus forms in transcription factory of clustered housekeeping genes. *Mol Cell Biol* 2006; 26 (13): 5096-5105.

Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Sieberet PD. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* 2001; 30: 892-7.

8- ANEXOS

ANEXO 1

Termo de Consentimento Informado

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do projeto: “EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM RETICULÓCITOS NA DOENÇA DA Hb H”

Responsáveis pela condução das pesquisas: Profa.Dra. Maria de Fátima Sonati e Márcia Regina S.C. Wenning

Nome do Paciente: _____

Idade: _____ anos RG: _____

Endereço: _____

No. H.C.: _____

Esse projeto de pesquisa tem como justificativa e objetivo investigar quais os genes que se expressam diferencialmente em reticulócitos de pacientes com Doença da HbH / talassemia α para explicar porque indivíduos com os mesmos genótipos α produzem diferentes quantidades de Hb anômala e, conseqüentemente, apresentam diferentes quadros clínico-laboratoriais.

O procedimento a que os voluntários serão submetidos será uma única punção de sangue venoso, por ocasião de seus retornos de seguimento ao Ambulatório de Hematologia Clínica (onde essa coleta deve ser feita, de qualquer maneira, para os exames laboratoriais de rotina), não sendo necessário o jejum absoluto.

O benefício esperado para os que voluntariamente participarem será um monitoramento mais detalhado dos valores hematológicos, cujos resultados serão encaminhados às respectivas pastas, no HC.

Os exames laboratoriais aos quais os participantes serão submetidos em conseqüência da pesquisa são: Hemograma com contagem automatizada dos reticulócitos e suas frações, e investigação molecular da talassemia α (no caso dos controles).

Fica claro que, no caso de pacientes do HC, os mesmos poderão não participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento, cuidado e tratamento pelas especialidades do Hospital.

Serão mantidos o sigilo e o caráter confidencial das informações, zelando-se pela privacidade do paciente e garantindo-se que sua identificação não será exposta nas conclusões ou publicações.

O telefone da Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para os casos de recursos ou reclamações dos pacientes é: (019) 3788.8936.

Telefone dos pesquisadores, para esclarecimentos de eventuais dúvidas: (19) 3788 7064

Campinas, ____ de _____ de 2002.

Assinatura do participante

Profa.Dra. Maria de Fátima Sonati

Márcia Regina S.C. Wenning

ANEXO 2

Resultados obtidos pela SSH

Transcritos diferencialmente expressos encontrados na SSH de FKS

Gene	Símbolo	Tamanho (pb)	E- Value BLAST X	E-Value BLAST N	Cromos- somo
Genes eritróides					
CD44 molecule (indian blood group)	CD44	318	---	0	11p13
Ferrochelatase (protoporphyria)	FECH	399	---	0	18q2.13
55KDA erythrocyte	55KDA	428	9E-18	0	Xq28
Fatores de transcrição					
Transcription elongation factor A 1, variant 4	TCEA1; TFIIIS	402	6E-11	2E-51	3p22-p21.3
nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)	NFIX	143	54	8E-90	19p13.3
Fator de replicação					
Topoisomerase (DNA) II Binding protein 1	TOPBP1	390	8E-10	1E-45	3q22.1
Outras funções					
Vacuolar protein sorting 24 (transporte endossomal)	VPS24	412	0,0000008	0	2p24
SMT3 supressor of mif two 3 variant 3 (modificam proteína celular após tradução)	SUMO1	242	No hits found	8E-28	2q32.2-q33
Cyclin-dependent kinase-like 1(regulam transição do ciclo celular)	CDC2; CDKL1	382	18	0	14q21.1
Casein kinase 1 alpha S isoform 7 – regula SMO (receptor acoplado à proteína G	CKI	291	5E-21	1E-10	13q13
Squale epoxidase (envolvida na biossíntese do estero)	SQLE	159	No hits found	4E-11	8q24
Homeodomain interacting protein kinase 1 (proteína tirosino quinase	HIPK1	513	No hits found	0	1p13.2
GTP-binding protein 9	GTPBP9	222	1E-29	3E-98	2q31.1
Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein	TERF2IP	105	16	8E-74	16p23.1
ORF (open reading frames)					

Chromossome 13 ORF 12	C13orf12	368	5E-31	0
Chromossome 6 ORF 32	C6orf32	304	No hits found	0

EST (Express Sequence Tags)

Homo sapiens cDNA clone Image:5529619		488		0
Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 6455511		195		5E-26
Homo sapiens cDNA FLJ36227 fis, clone THYMU2001071		418	No hits found	0
Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 5920354		175	No hits found	0
Homo sapiens cDNA FLJ27086 fis clone SPL03794		398	No hits found	0
Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 6502197		208	No hits found	1E-15
Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 6106210		297	No hits found	4E-60
Homo sapiens cDNA FLJ42464 fis clone BRACE2029644		93	No hits found	9E-46
Homo sapiens cDNA FLJ31063 fis clone HSYRA2001105		346	No hits found	0
Homo sapiens cDNA clone Image:3630100		271	No hits found	0
Homo sapiens cDNA FLJ43807 fis clone TEST14001106		240	2E-37	0
Homo sapiens cDNA FLJ40496 fis clone TESTI2044788		332	No hits found	0

Sequências genômicas

Chromosome 1, clone RP11-212H11	310	No hits found	0
Chromosome 1q25.1-25.3 RP1-223H12	248	No hits found	0
Chromosome Xq21.33-22 clone RP4-545K15	361	25	0
Chromosome 9, clone RP11-386D8	163	9E-14	0
Chromosome Xq25-26.3 clone RP6-102F8	364	No hits found	0
Chromosome 6p24.1, clone RP3-430A16	237	No hits found	0
Chromosome 1, clone RP11—142L4	201	No hits found	3E-51
Chromosome 8, clone RP11—108L9	378	No hits found	0
Chromosome 14, BAC C-2190G12	406	2E-19	0
Chromosome 17, clone RP11-38F9	277	No hits found	2E-22
Chromosome 8q23, clone KB1434A12	370	2E-22	0
Chromosome 1, clone RP11—496H15	171	No hits found	3E-79

Transcritos diferencialmente expressos encontrados na SSH de MKS

Gene	Símbolo	Tamanho (pb)	E- Value BLAST X	E-Value BLAST N	Cromos-somo
Genes eritróides					
5' nucleotidase, cytolitic III, variant 3	NT5C3	359	2E-11	1E-97	7q14.3
Glycophorin C	GYPC	155	2E-17	1E-60	2q14-q21
Hemoglobin - α mRNA	HBB	107	16	1E-38	11p15.5
Fatores de transcrição					
Zinc finger, AN1-type domain 6	ZFAND6	211	2E-29	0	15q
Zinc finger, RAN- binding domain containing	ZRANB1	103	No hits found	1E-41	10q26.13
Zinc finger protein 403	ZNF403	207	3E-23	0	17q2
Fatores de tradução					
Translation initiation factor 4E binding protein 2	EIF4E-BP1	204	No hits found	3E-92	10q21-q22
Translation initiation factor 1B	EIF1B	102	2E-20	4E-79	3p22.1
Outras funções					
Thyroid hormone receptor interactor 12	TRIP12	431	1E-66	0	2q36.3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRPA3	119	No hits found	1E-60	2q31.32
Neutrophil-activating peptide ENA-78, platelet basic protein	ENA-78	283	No hits found	0	4q12-q13
A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9, transcript variant 4 – proteína regulatória	AKAP9	146		2E-43	7q21-q22
Methionine adenosyltransferase II beta variant 2	MAT2B	424	No hits found	0	5q34
c-myc promoter binding protein	DENND4A	487	3E-33	0	4q12-q13
Nuclear receptor coactivator 4		304	No hits found	0	4q22.1
ribose 5-phosphatase isomerase A (ribose 5-phosphatase epimerase	RPIA	360	No hits found	2E-89	2p11.2
Tyrosine 3 – monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein zeta polypeptide		424	No hits found	0	8q23.1

Beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein)	BECN1	201	9E-24	0	7q21
TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like, transcript variant 1	TIAL1	308	No hits found	0	10q
Tousled-like kinase 1	TLK1	156	No hits found	0	2q31
Methyltransferase like 9 variant 1	METTL9	362	No hits found	0	16p13-p12
Checkpoint supressor 1	CHES1	128	No hits found	1E-82	
Protein translation factor siu1 homolog	EIF-1B	194	2E-13	0	3p22.1
Centrosome related protein	TCC52	153	No hits found	1E-44	
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5 – kinase II alpha	PIP5KIIA	108	5E-11	3E-47	10p12.32
Junction-mediating and regulatory protein	JMY	157	1E-18	4E-91	5q41
Ubiquitin specific peptidase 15		115		2E-31	0

Proteínas hipotéticas

Family with sequence similarity 46, member C	FAM46C	395	No hits found	0	1p12
Hypothetical protein LOC88523	LOC88523	268	1E-48	2E-20	13q12-q13

ORF (open reading frames)

Chromossome 10 ORF 84	C10orf84	146	12	4E-32	
Chromossome 6 ORF 62	C6orf62	138	0,0000007	0	
Chromossome 13 ORF 12	C13orf12	138	6E-77	0	
Chromossome 1 ORF 26	C1orf26	329	48	0	

EST (Express Sequence Tags)

Homo sapiens cDNA FLJ26401 fis, clone HTR08960		177	3E-17	0	
Homo sapiens cDNA clone		411	No hits found	0	

IMAGE:55441030			
Homo sapiens cDNA clone	349	No hits found	0
IMAGE:6455511			
Homo sapiens cDNA FLJ43425 fis, clone	453	No hits found	0
OCBBF 2027197			
Homo sapiens cDNA FLJ45086 fis, clone	187	No hits found	1E-51
BRAWH3028796			
Homo sapiens cDNA FLJ13267 fis, clone	267	No hits found	0
OVARC1000964			
Homo sapiens cDNA clone	316	No hits found	0
IMAGE:5541030			
Homo sapiens cDNA DKFZp586M141	161	No hits found	0
Homo sapiens cDNA FLJ41016 fis, clone	242	No hits found	0
UTERU2018784			
Homo sapiens cDNA FLJ30728 fis, clone	373	No hits found	0
FEBRA2000021			
Homo sapiens cDNA clone	323	No hits found	0
IMAGE:4447822			
Homo sapiens FP15737	182	No hits found	5E-71
Homo sapiens cDNA FLH1880454 0.1L	270	6E-54	0
RZPDo839C06133D RPS6			

Sequências genômicas

Chromosome 3, clone RP11—447D11	177	No hits found	1E-72
Chromosome 5, clone CTC-487M23	244	No hits found	0
Chromosome 9, clone RP11-346E17	205	No hits found	2E-27
Chromosome 1q24, clone RP1-106H8	105	No hits found	1E-93
Chromosome 10, clone RP1-1145E8	200	No hits found	4E-94
Chromosome 18p, clone RP-1178A 19	319	No hits found	0
Chromosome 6q13, clone RP1-75K24	266	No hits found	0

Transcritos encontrados nas duas bibliotecas

Transcrito	Símbolo	Cromossomo
tubulin beta 2 ^a	TUBB 2A	6p25
deubiquitinating enzyme 1	YOD1 OTU	1q32.1
tetratricopeptide repeat domain 14	TTC14	3q26.33
Pan troglodytes, mitochondrial solute carrier protein		

Dados brutos do qRT-PCR obtidos através do programa GNorm

Name	Primer	Média Ct	dct	Q
Amostra MKS_ 5ng final	Bac	31,97	-0,925	0,526681
Amostra FKS_ 5ng final	Bac	31,045	0	1
Amostra CN_ 5ng final	Bac	33,99	-2,945	0,129857
	Ctminimo	31,045		
Amostra MKS_ 5ng final	GAPDH	31,695	0	1
Amostra FKS_ 5ng final	GAPDH	33,39	-1,695	0,308855
Amostra CN_ 5ng final	GAPDH	33,995	-2,3	0,203063
	Ctminimo	31,695		

Name	Primer	Média Ct	dct	Q		
MKS_ 10ng final	GAPDH	26,555	-1,305	0,404721		
FKS_ 10ng final	GAPDH	28,23	-2,98	0,126745		
CN_ 10ng final	GAPDH	25,25	0	1		
	ct mínimo	25,25				
					Normalisa tion Factor	
MKS_ 10ng final	B globina	8,415	0	1	0,8781	1,138822
FKS_ 10ng final	B globina	9,65	-1,235	0,424842	0,5977	0,710796
CN_ 10ng final	B globina	8,895	-0,48	0,716978	1,9053	0,376307
	ct mínimo	8,415				

MKS_ 10ng final	Beta actina	24,08	-0,93	0,524858	
FKS_ 10ng final	Beta actina	23,515	-0,365	0,776469	
CN_ 10ng final	Beta actina	23,15	0	1	
	ct mínimo	23,15			
MKS_ 10ng final	EKLF	30,505	-3,335	0,099098	0,112855
FKS_ 10ng final	EKLF	27,17	0	1	1,67308
CN_ 10ng final	EKLF	31,135	-3,965	0,064035	0,033609
	ct mínimo	27,17			
MKS_ 10ng final	NFE2	25,145	-3,215	0,107693	0,122644
FKS_ 10ng final	NFE2	27,39	-5,46	0,022718	0,03801
CN_ 10ng final	NFE2	21,93	0	1	0,524852
	ct mínimo	21,93			
MKS_ 10ng final	FAM 46	21,68	-0,53	0,692555	0,788697
FKS_ 10ng final	FAM 46	24,78	-3,63	0,080772	0,135138
CN_ 10ng final	FAM 46	21,15	0	1	0,524852
	ct mínimo	21,15			
MKS_ 10ng final	GYPR	23,825	-1,795	0,288172	0,328176
FKS_ 10ng final	GYPR	23,4	-1,37	0,386891	0,6473
CN_ 10ng final	GYPR	22,03	0	1	0,524852
	ct mínimo	22,03			
MKS_ 10ng final	CSNK1	31,2	-1,61	0,327598	0,373076
FKS_ 10ng final	CSNK1	32,21	-2,62	0,162668	0,272156
CN_ 10ng final	CSNK1	29,59	0	1	0,524852
	ct mínimo	29,59			
MKS_ 10ng final	TCEA1	26,82	-1,27	0,41466	0,472224
FKS_ 10ng final	TCEA1	27,81	-2,26	0,208772	0,349292
CN_ 10ng final	TCEA1	25,55	0	1	0,524852
	ct mínimo	25,55			
MKS_ 10ng final	CDC2	33,065	-0,535	0,690159	0,785968
FKS_ 10ng final	CDC2	35,17	-2,64	0,160428	0,268409
CN_ 10ng final	CDC2	32,53	0	1	0,524852
	ct mínimo	32,53			
MKS_ 10ng final	GSN	32,795	-2,11	0,231647	0,263805
FKS_ 10ng final	GSN	31,69	-1,005	0,49827	0,833646
CN_ 10ng final	GSN	30,685	0	1	0,524852
	ct mínimo	30,685			
MKS_ 10ng final	VCL	29,61	-3,925	0,065835	0,074974
FKS_ 10ng final	VCL	30,98	-5,295	0,025471	0,042615
CN_ 10ng final	VCL	25,685	0	1	0,524852
	ct mínimo	25,685			

MKS_ 10ng final	RHOA	28,25	-2,88	0,135842		0,1547
FKS_ 10ng final	RHOA	28,56	-3,19	0,109576		0,183329
CN_ 10ng final	RHOA	25,37	0	1		0,524852
	ct mínimo	25,37				
MKS_ 10ng final	RAC1	34,57	-1,58	0,334482		0,380915
FKS_ 10ng final	RAC1	35,085	-2,095	0,234068		0,391615
CN_ 10ng final	RAC1	32,99	0	1		0,524852
	ct mínimo	32,99				
MKS_ 10ng final	PIK3CA	33,115	-1,825	0,282241		0,321423
FKS_ 10ng final	PIK3CA	34,74	-3,45	0,091505		0,153096
CN_ 10ng final	PIK3CA	31,29	0	1		0,524852
	ct mínimo	31,29				
MKS_ 10ng final	INPP5B	33,64	-1,915	0,265172		0,301984
FKS_ 10ng final	INPP5B	34,33	-2,605	0,164368		0,275001
CN_ 10ng final	INPP5B	31,725	0	1		0,524852
	ct mínimo	31,725				
MKS_ 10ng final	PIK4CA	30,865	-1,91	0,266093		0,303032
FKS_ 10ng final	PIK4CA	32,955	-4	0,0625		0,104568
CN_ 10ng final	PIK4CA	28,955	0	1		0,524852
	ct mínimo	28,955				
MKS_ 10ng final	EIF4	29,295	-0,59	0,664343	0,8781	0,756569
CN_ 10ng final	EIF4	28,705	0	1	1,9053	0,524852
	ct mínimo	28,705				
MKS_ 10ng final	ACTN	30,53	-4,39	0,047696		0,054317
FKS_ 10ng final	ACTN	29,655	-3,515	0,087474		0,146351
CN_ 10ng final	ACTN	26,14	0	1		0,524852
	ct mínimo	26,14				
FKS_ 10ng final	PKD1	36,24	-2,855	0,138216	0,5977	0,231247
CN_ 10ng final	PKD1	33,385	0	1	1,9053	0,524852
	ct mínimo	33,385				
FKS_ 10ng final	PLCB1	33,9	-0,045	0,96929		1,6217
CN_ 10ng final	PLCB1	33,855	0	1		0,524852
	Ct mínimo	33,855				