



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO

Gisele Cristine de Souza Carrocini

*Elementos de regulação e microRNAs envolvidos na modulação
dos níveis de Hemoglobina Fetal em indivíduos portadores de beta-
hemoglobinopatias*

*São José do Rio Preto
2015*

Gisele Cristine de Souza Carrocini

*Elementos de regulação e microRNAs envolvidos na modulação
dos níveis de Hemoglobina Fetal em indivíduos portadores de beta-
hemoglobinopatias*

*Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor
em Genética, junto ao Programa de Pós-
Graduação em Genética, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do
Rio Preto.*

*Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Regina
Bonini-Domingos*

*São José do Rio Preto
2015*

Carrocini, Gisele Cristine de Souza.

Elementos de regulação e microRNAs envolvidos na modulação dos níveis de hemoglobina fetal em indivíduos portadores de beta- hemoglobinopatias / Gisele Cristine de Souza Carrocini. -- São José do Rio Preto, 2015

134 : il., tabs.

Orientador: Cláudia Regina Bonini Domingos

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Hemoglobina fetal. 3. Anemia falciforme – Aspectos genéticos. 4. Talassemia beta. 5. MicroRNAs. I. Domingos, Cláudia Regina Bonini. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575.1

*Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto*

Gisele Cristine de Souza Carrocini

Elementos de regulação e microRNAs envolvidos na modulação dos níveis de Hemoglobina Fetal em indivíduos portadores de beta-hemoglobinopatias

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

*Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Bonini-Domingos
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador*

*Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Silva Pinto
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – USP – Ribeirão Preto*

*Prof^a. Dr^a. Maria Stella Figueiredo
UNIFESP – São Paulo*

*Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Ilha Solteira*

*Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon
UNESP – São José do Rio Preto*

*São José do Rio Preto
27 de fevereiro de 2015*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP - São José do Rio Preto, em parceria com o Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, da Universidade de São Paulo, USP - Ribeirão Preto.

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os indivíduos com beta-hemoglobinopatias que, independente das complicações clínicas com as quais convivem, vêem nos pesquisadores, e em suas respectivas pesquisas, motivos de confiança e esperança.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela sabedoria e discernimento para que eu pudesse tomar minhas decisões.

Aos meus pais, **Valdir e Marilza**, pelo incentivo, força, apoio, carinho, confiança, dedicação, amor incondicional e por me acompanharem no caminho que escolhi para mim. Essa conquista também é de vocês.

Aos meus irmãos, **Diego e Beatriz**, pela admiração, respeito, amizade, apoio, carinho e companheirismo.

À minha cunhada **Joseane**, pelo carinho, apoio e amizade.

À minha sobrinha **Lorena**, que chegou para trazer alegria, amor e paz na minha vida.

A todos os meus familiares que, mesmo distantes geograficamente, acreditaram em mim e me tiveram como motivo de orgulho e exemplo.

À minha querida orientadora, **Profa Dra Claudia Regina Bonini Domingos**, por ter acreditado nas minhas ideias e no meu potencial e ter aberto muitas portas para inúmeros acontecimentos na minha vida, por ter compartilhado um pouquinho do seu conhecimento comigo, por sempre estar disposta a me auxiliar nos momentos de indecisão, pela imensa amizade e por tratar seus alunos como verdadeiros amigos, dedicando a todos muito carinho e amor. Serei eternamente grata por ter tido o privilégio de fazer parte de sua equipe.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), **Paula, Larissa, Belini, Gustavo, Danilo, Tiago, Lidiane, Jéssika, Renan, Patrícia, Nathália, Vanessa Cardoso, Vanessa Urbinatti, Mariana, Marina, Gabriela, Lucas, Nayara, Izabella, Willian, Isabela e Luis Felipe**, e àqueles que passaram pelo laboratório, pelos momentos de discussão, aprendizagem, amizade e diversão.

Ao **Prof Dr Wilson Araujo da Silva Junior** e toda a equipe do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática – USP/RP, pelo auxílio na realização das análises e interpretação dos dados. Agradeço imensamente à **Dra Dalila Zanette, Dr Julio César Cetrullo Lorenzi e MSc Bruna Rodrigues Muys** por me receberem carinhosamente e me acompanharem durante a padronização das técnicas, realização dos experimentos e discussão dos resultados.

*À equipe do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – Hemorio-RJ nas pessoas da **Dra Clárisse Lobo, Dra Viviani Pessoa, Thaís Oliveira e Elisabeth Pereira**, pelo auxílio nas coletas de amostras, contato com os pacientes, levantamento de informações dos prontuários e pela receptividade com que me receberam.*

*À equipe do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP nas pessoas do **Dr Octávio Ricci Junior e Dr Alexandre Lorenzetti**, pelo auxílio nas coletas de amostras e contato com os pacientes.*

*Ao **Prof Dr Eduardo Alves de Almeida**, e a toda a equipe do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental da Unesp/Ibilce, pela contribuição no uso de equipamentos.*

A todos os indivíduos que, gentilmente, doaram amostras de sangue e participaram desse trabalho.

*Aos amigos **Lidiane Torres, Larissa Venancio, Edis Belini e Danilo Grünig**, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório, pela imensa amizade que construímos nesses anos e por tudo que aprendi ao lado de vocês.*

*Aos amigos **Renan Garcia e Jéssika Okumura** pela companhia e auxílio nos períodos de coletas de amostras e dados dos pacientes.*

*Aos meus amigos de república, **Lidiane, Fábio e Eduarda (Duda)** pelo carinho, amizade, respeito e convivência durante esses anos.*

*Aos meus amigos da graduação, **Adriana (Lurdes), André (Jim), Fernando, Marcelo, Marina, Naty, Paula, Taty e Raduan**, por terem feito parte de um dos momentos mais importantes da minha vida e por estarem sempre perto de mim.*

*Aos meus amigos de Ribeirão Preto, **André, Patrícia, Renata, Saulo, Tássia e Tiago**, pela imensa amizade, por me acolherem e me proporcionarem momentos de alegria e descontração.*

*Aos amigos que eu fiz durante meus anos de pós-graduação, **Yuri, Kaio, Rafael (Detô), Luis Felipe (Coxinha), Maitê, Vinícius (Puto), Lara e Ivã**. Agradeço pelos momentos divertidos que passamos juntos nesses anos.*

*Aos amigos **Lucas Casanova, Patrícia Nascimento e Mariana Molina**, pelo imenso carinho, amizade, companheirismo e por todas as mensagens que sempre chegaram na hora certa e me deixaram comovida, aliviada e feliz.*

*Aos meus eternos pupilos, **Willian Barberino e Isabela Chinelato**, pelo carinho, confiança, admiração, respeito e amizade.*

*Aos amigos **Mizael, João, Renan (Ombrinho), Ariane, Carlos Eduardo (Prego), Aline, Pedro, Fernando, Péricles, Andrey, Michele, Matheus, Marina (Masseyzona), Luiz, Raul, Juliana, Nayara e Willian** pela amizade, pelos momentos de diversão e pela paixão compartilhada pelo esporte, que foi meu refúgio em muitos momentos de pressão.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo no. 2011/15570-1) pelo auxílio financeiro.

“Nada de grande se faz sem paixão”

Friedrich Hegel

RESUMO

*Níveis elevados de Hb F na vida adulta podem apresentar efeitos benéficos para indivíduos com anemia falciforme e talassemia beta. Dentre os elementos genéticos que atuam na regulação da expressão da Hb F são conhecidos os fatores de transcrição e os microRNAs. Os objetivos do trabalho foram rastrear, por footprinting filogenético, fatores de transcrição que apresentam sítios de ligação nas regiões não-codificantes dos genes da γ -globina, e microRNAs candidatos à regulação desses genes, além de avaliar a expressão desses microRNAs selecionados *in silico* em diferentes grupos de indivíduos com perfis distintos de expressão de Hb F. As análises *in silico* para o rastreamento dos fatores de transcrição foram realizadas comparando as sequências dos genes HBG1 e HBG2 de espécies de primatas do Velho e do Novo Mundo com as sequências da espécie *Homo sapiens*. O rastreamento *in silico* dos microRNAs preditos à regulação dos genes da γ -globina foi realizado a partir da utilização de bancos de dados públicos de microRNA. Para as análises de expressão dos microRNAs selecionados foram analisadas 38 amostras de sangue periférico, divididas em cinco grupos de estudo: grupo controle, anemia falciforme em uso ou não de hidroxureia (HU), e talassemia beta na presença e ausência do alelo β^0 . Todas as amostras foram submetidas aos testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinopatias, quantificação das frações de globinas por cromatografia e análise molecular para a genotipagem dos indivíduos com anemia falciforme (PCR-RFLP) e talassemia beta (PCR-AE e sequenciamento genômico), além da caracterização dos haplótipos β^S e β -Tal (PCR-RFLP). Os reticulócitos foram isolados a partir do sangue total e submetidos à extração de microRNA. As análises de expressão dos microRNAs foram realizadas por PCR em tempo real (RT-PCR e q-PCR). As análises *in silico* apontaram 13 fatores de transcrição conservados entre as espécies analisadas que apresentam sítios de ligação nas regiões não-codificantes de ambos os genes da γ -globina, envolvidos na regulação da expressão da Hb F: CDC5, c-MYB, CP2, GATA-1, GATA-2, NF-E2, NF-Y, RUNX-1, TAL-1, YY1, BP1, COUP-TFII e PAX-1. Esses elementos apresentam papel na ativação e repressão transcricional, atuando direta ou indiretamente na modulação dos níveis de Hb F. O rastreamento em banco de dados públicos, juntamente com informações provenientes da literatura, indicaram*

20 microRNAs como candidatos à regulação da Hb F. Destes, 14 apresentaram expressão diferencial entre os grupos analisados: miR-451, miR-144, miR-221, miR-222, miR-15a, miR-16, miR-210, miR-26b, miR-151-3p, miR-362-5p, miR-760, miR-4795-3p, miR-449a e miR-449b. Além do possível envolvimento na regulação da Hb F, esses elementos estão associados à eritropoiese, hipóxia, estresse oxidativo e controle da proliferação e ciclo celular. A maioria dos miRNAs avaliados apresentaram expressão diferencial entre os grupo controle e/ou talassemia beta β^0 em relação aos demais grupos portadores de beta-hemoglobinopatias. Esse dado pode indicar que a ocorrência de processos transfusionais frequentes pode modular a expressão de elementos candidatos à regulação dos genes da γ -globina. Além disso, não houve diferença na expressão dos miRNAs candidatos à regulação da Hb F nos indivíduos portadores de anemia falciforme em uso ou não de HU, indicando que o uso dessa droga não interfere na regulação dos níveis dessa hemoglobina, mediado por miRNAs. No entanto, o perfil de correlação entre esses elementos mostrou que, na presença da HU, as relações entre os miRNAs e os níveis de Hb F diferem do perfil encontrado na ausência dessa medicação, sugerindo que a HU, ao aumentar os níveis de expressão da Hb F, pode alterar o perfil de correlação desses elementos de regulação. A expressão diferencial observada nos grupos portadores de talassemia beta β^0 e β^+ reforça o importante papel da transfusão sanguínea na modulação da expressão de fatores reguladores dos genes componentes da família β -globina. Os miR-362-5p, miR-760, miR-4795, miR-449a e miR-449b não apresentam relação estabelecida com os processos eritropoiéticos e síntese de globinas, de modo que nossos resultados podem representar os primeiros relatos do envolvimento desses elementos de regulação em processos vinculados às beta-hemoglobinopatias. Além disso, a expressão diferencial dos miRNAs em grupos com concentrações de Hb F distintas pode indicar participação desses elementos na modulação dos níveis dessa hemoglobina. Dessa forma, os miRNAs podem representar elementos candidatos ao estabelecimento de novas estratégias terapêuticas na modulação dos níveis de Hb F para o tratamento das beta-hemoglobinopatias.

Palavras-chave: Hb F, anemia falciforme, talassemia beta, fatores de transcrição, microRNA.

ABSTRACT

High levels of Hb F in adulthood may have beneficial effects for sickle cell anemia and beta-thalassemia. Some of the genetic elements that act in the regulation of Hb F expression are transcription factors and microRNAs. The aim of this study was to use phylogenetic footprinting to screen transcription factors that have binding sites in the γ -globin genes' noncoding regions, and miRNAs candidates to modulating Hb F levels, also evaluating the expression of microRNAs selected from in silico analyses in different groups with distinct profiles of Hb F expression. In silico analysis to screening of transcription factors were performed using bioinformatics tool VISTA, comparing the sequences of HBG1 and HBG2 genes in species of the Old and New World primates with the Homo sapiens sequences. The screening of predicted microRNAs to regulation of γ -globin genes was performed using public databases of microRNA. For the expression analyses of the selected microRNAs, we analyzed thirty-eight peripheral blood samples, divided into five groups: control group, sickle cell anemia using or not hydroxyurea (HU), and beta-thalassemia with and without allele β^0 . All samples were tested to hemoglobinopathies by classical diagnostic tests, quantification of globin fractions by chromatography and molecular analyses for genotyping of sickle cell anemia (PCR-RFLP) and beta-thalassemia (PCR-AE and genomic sequencing), and the characterization of haplotypes β^S and β -Tal (PCR-RFLP). The reticulocytes were isolated from whole blood and submitted to microRNAs extraction. The analyses of the microRNAs expression were performed by real-time PCR (RT-PCR and qPCR). In silico analyses showed 13 transcription factors conserved between the analyzed species, which have binding sites in non-coding regions of both γ -globin genes, involved in regulating of the Hb F expression: BP1, CDC5, c-MYB, COUP-TFII, CP2, GATA-1, GATA-2, NF-E2, NF-Y, PAX-1, RUNX-1, TAL-1 and YY1. These elements have a role in the transcriptional activation and repression, acting directly or indirectly in the modulation of Hb F levels. The screening in public database, along with information from literature, indicated 20 microRNAs as candidates to regulation of Hb F. Of these, 14 showed differential expression between the analyzed groups: miR-451, miR-144, miR-221, miR -222, miR-15a, miR-16, miR-210, miR-26b, miR-151-3p, miR-362-5p, miR-760, miR-4795-3p, miR-449a and miR-449b. In addition to the possible involvement in the regulation

of Hb F, these elements are associated with erythropoiesis, hypoxia, oxidative stress, globin synthesis and control of cellular proliferation and cell cycle. Most of miRNAs showed differential expression between the control group and/or beta-thalassemia β^0 in relation to the other groups with beta-hemoglobinopathies. This finding may indicate that the occurrence of frequent transfusions processes can modulate the expression of candidate elements to regulation of the γ -globin genes. In addition, there was no difference in the expression of the miRNAs candidates to regulation of Hb F levels in sickle cell anemia, indicating that the use of HU does not interfere in the regulation of this hemoglobin levels, mediated by miRNAs. However, the correlation profile between these elements showed that, in the presence of HU, the relation between miRNAs expression and Hb F levels differed from the profile found in the absence of this medication, suggesting that HU, by increasing Hb F levels, is able to change the correlation profile of regulatory elements. The differential expression observed in the groups of beta-thalassemia β^0 and β^+ reinforces the important role played by the blood transfusion in modulating of the expression of regulatory factors in the β -globin gene cluster. The miR-362-5p, miR-760, miR-4795, miR-449a and miR-449b have not established relationship with erythropoietic processes and globin synthesis yet, so our results may represent the first reports of the involvement of these regulation elements in processes related to beta-hemoglobinopathies. Furthermore, the differential expression of miRNAs in groups with different Hb F concentrations may indicate the involvement of these components in regulation of these hemoglobin levels. Thus, miRNAs may represent candidate elements for the establishment of new therapeutic strategies to modulate the Hb F levels for the treatment of beta-hemoglobinopathies.

Keywords: Hb F, sickle cell anemia, beta-thalassemia, transcription factors, microRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de ontogenia das cadeias globínicas.....	23
Figura 2: Biogênese dos microRNAs.....	31
Figura 3: Foto do gel de agarose para confirmação da mutação β^S	44
Figura 4: Foto de gel de para detecção da mutação CD39.....	44
Figura 5: Sítios polimórficos usados na determinação dos haplótipos β^S	47
Figura 6: Sítios polimórficos usados na determinação dos haplótipos β -Tal.....	48
Figura 7: Perfil das complicações clínicas e tratamento dos indivíduos com anemia falciforme.....	58
Figura 8: Frequência alélica das mutações de indivíduos com talassemia beta.....	60
Figura 9: Sequenciamento genômico dos indivíduos com talassemia beta.....	62
Figura 10: Complicações clínicas dos indivíduos com talassemia beta.....	63
Figura 11: Comparação das sequências não codificantes dos genes da γ -globina.....	65
Figura 12: Interação entre os fatores de transcrição na hematopoiese, eritropoiese e expressão dos genes das globinas.....	69
Figura 13: Representação esquemática dos sítios de ligação para miRs presentes nos genes que codificam os fatores de transcrição.....	73
Figura 14: Expressão diferencial dos miR-144 e miR-451.....	78
Figura 15: Expressão diferencial dos miR-221 e miR-222.....	80
Figura 16: Expressão diferencial dos miR-15a e miR-16-1.....	82
Figura 17: Expressão diferencial do miR-210.....	84
Figura 18: Expressão diferencial dos miR-26b e miR-151-3p.....	88
Figura 19: Expressão diferencial do miR-362-5p.....	90
Figura 20: Expressão diferencial do miR-760.....	91
Figura 21: Expressão diferencial do miR-4795-3p.....	92
Figura 22: Expressão diferencial dos miR-449a e miR-449b.....	93

Figura 23: Correlação negativa entre a expressão relativa do miR-221 e da concentração de Hb F em indivíduos sem queixas de anemia.....95

Figura 24: Correlação negativa entre a expressão relativa do miR-15a e da concentração de Hb F em indivíduos com anemia falciforme em uso de HU.....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Detalhamento da casuística do estudo.....	38
Tabela 2: Oligonucleotídeos sintetizados para o sequenciamento genômico e definição das mutações de talassemia beta.....	45
Tabela 3: Protocolo de ciclagem para a técnica de PCR- <i>touchdown</i>	46
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para determinação dos haplótipos β^S	47
Tabela 5: Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem com as endonucleases de restrição para determinação dos haplótipos β^S	48
Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados para determinação dos haplótipos β -Tal.....	49
Tabela 7: Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem com as endonucleases de restrição para determinação dos haplótipos β -Tal.....	50
Tabela 8: Protocolo de reação para a síntese de cDNA.....	53
Tabela 9: Protocolo de ciclagem da reação de síntese de cDNA.....	53
Tabela 10: Protocolo de reação para análise da expressão dos microRNAs.....	54
Tabela 11: Protocolo de ciclagem da etapa de expressão dos microRNAs.....	54
Tabela 12: Mutações de talassemia beta identificadas na população de talassêmicos do Rio de Janeiro.....	59
Tabela 13: Frequência das principais mutações de talassemia beta em diferentes localidades do Brasil.....	60
Tabela 14: Caracterização dos haplótipos β -Tal identificados nos indivíduos com talassemia beta.....	62
Tabela 15: MicroRNAs preditos candidatos à regulação dos níveis de Hb F.....	71
Tabela 16: Caracterização dos processos celulares, fatores de transcrição relacionados, função e genes alvos validados aos quais os 20 miRs analisados estão envolvidos.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AE	Alelo-Específico
Atp	Atípico
AVE	Acidente vascular encefálico
BEN	Haplótipo Benin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Avaliação Ética
CAR	Haplótipo República Central da África ou Bantu
CD	Mutação em códon
CD15	Códon 15
CD24	Códon 24
CD39	Códon 39
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CT	<i>Thershold cycle</i>
EDTA	Ácido etinoadaminotetracético
g	Grama
GWAS	Estudos de associação de genomas amplos
H ₂ O	Água
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina A (normal)
Hb C	Hemoglobina C
Hb D	Hemoglobina D
Hb F	Hemoglobina fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb S/beta	Interação Hb S e beta talassemia
HBB	Gene da β-globina
HEMORIO	Instituto Estadual Arthur de Siqueira Cavalcanti
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HU	Hidroxiureia

IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IVS	Mutação em íntron
IVSI-1	Mutação no íntron 1, nucleotídeo 1
IVSI-110	Mutação no íntron 1, nucleotídeo 110
IVSI-5	Mutação no íntron 1, nucleotídeo 5
IVSI-6	Mutação no íntron 1, nucleotídeo 6
IVSII-745	Mutação no íntron 2, nucleotídeo 745
Kb	kilobase
KCl	Cloreto de potássio
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
miRNA ou miR	microRNA
mL	Mililitro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng/uL	Nanograma por microlitro
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PM	Peso molecular
qPCR	PCR quantitativa
QTL	<i>Locus</i> de característica quantitativa
RFLP	Polimorfismo por Tamanho de Fragmentos de Restrição
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	PCR em tempo real
SAUDI	Haplótipo Índia-Arábia Saudita
SEN	Haplótipo Senegal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
uL	Microlitro
UTR	Região transcrita e não traduzida
UV	Ultravioleta
δβ-Talassemia	Delta-beta Talassemia

α	Gene alfa
ζ	Gene zeta
μ	Gene mi
ρ	Gene rho
θ	Gene teta
ε	Gene epsílon
γ^G	Gene gama glicina
γ^A	Gene gama alanina
δ	Gene delta
β	Gene beta
ψ	Pseudogene
β^S	Gene beta S mutante
β^+	Beta mais talassemia
β^0	Beta zero talassemia
+	Presença de sítio polimórfico
-	Ausência de sítio polimórfico

SUMÁRIO

1. Introdução.....	22
1.1 As Hemoglobinas Humanas.....	22
1.2 Hemoglobinopatias.....	23
1.2.1 Anemia Falciforme.....	23
1.2.2 Talassemia Beta.....	25
1.3 A Hemoglobina Fetal e sua importância para as beta-hemoglobinopatias.....	26
1.3.1 Regulação da expressão da Hb F.....	27
1.4 Fatores de Transcrição.....	30
1.5 MicroRNAs.....	30
2. Objetivos.....	34
3. Material e Método.....	36
3.1 Casuística e Critérios de Inclusão.....	36
3.2 Considerações Éticas.....	38
3.3 Método.....	39
3.3.1 Rastreamento de elementos de regulação por <i>footprinting</i> filogenético.....	39
3.3.2 Rastreamento e seleção dos microRNAs.....	41
3.3.3 Fenotipagem e Genotipagem das amostras analisadas.....	41
3.3.4 Separação de reticulócitos do sangue total.....	50
3.3.5 Extração enriquecida de microRNA.....	51
3.3.6 Síntese de cDNA (RT-PCR).....	52
3.3.7 Análise da expressão dos microRNAs (qPCR).....	53
3.3.8 Análise Estatística.....	54
4. Resultados e Discussão.....	57
4.1 Caracterização dos grupos de beta-hemoglobinopatias.....	57
4.1.1 Anemia Falciforme.....	57
4.1.2 Talassemia Beta.....	58
4.2 Análise <i>in silico</i> dos elementos de regulação por meio de genômica comparativa.....	64
4.3. Análise <i>in silico</i> dos microRNAs envolvidos na regulação da Hb F.....	71
4.4 Relação entre os fatores de transcrição e os microRNAs rastreados <i>in silico</i>	72
4.5 Análise da expressão dos microRNAs.....	74
4.5.1 Expressão dos miRNAs envolvidos na eritropoiese.....	76
4.5.2 Expressão dos miRNAs envolvidos na hipóxia.....	84
4.5.3 Expressão dos miRNAs envolvidos no estresse oxidativo.....	85
4.5.4 Expressão dos miRNAs envolvidos no controle da proliferação e ciclo celular.....	86
4.5.5 Correlação entre miRNA e Hb F nos grupos avaliados.....	94
5. Conclusões.....	98
6. Referências.....	101
7. Apêndice: Artigo científico aceito para publicação.....	115
8. Anexos.....	130
8.1 Anexo 1: Caracterização dos indivíduos com anemia falciforme.....	130
8.2 Anexo 2: Caracterização dos indivíduos com talassemia beta.....	131
8.3 Anexo 3: miRNAs com ausência de expressão diferencial.....	133

Introdução

1 Introdução

1.1 As Hemoglobinas Humanas

A molécula de hemoglobina (Hb) é uma proteína constituída por quatro subunidades: duas cadeias do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β). Cada uma dessas subunidades é composta de uma fração protéica, a globina, e de um grupo prostético, o heme, que contém uma molécula de ferro que se combina ao oxigênio, fazendo com que a hemoglobina seja capaz de transportá-lo e promover a oxigenação tecidual e trocas gasosas, dentre outras funções (HONIG; ADAMS III, 1986; SCHECHTER, 2008).

Os genes da hemoglobina humana estão localizados em duas famílias gênicas, denominadas α -globina (alfa) e β -globina (beta). A família de genes α -globina está localizada no braço curto do cromossomo 16 e cada gene codifica uma cadeia polipeptídica que totaliza 141 aminoácidos. É composta por genes inativos, os pseudogenes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha$, μ e $\theta 1$), e genes funcionais (ζ , $\alpha 1$ e $\alpha 2$). A família de genes β -globina está localizada no braço curto do cromossomo 11 e cada gene codifica uma cadeia polipeptídica que apresenta 146 aminoácidos. Essa família é composta por um pseudogene ($\psi\beta$) e cinco genes funcionais, expressos na mesma ordem em que estão dispostos no segmento de DNA (5' - $\epsilon \gamma^G \gamma^A \delta \beta$ - 3') (WEATHERALL; CLEGG, 2001; SCHECHTER, 2008).

A expressão dos genes das globinas ocorre de maneira temporal específica, de modo que cada tetrâmero proteico é sintetizado de acordo com as etapas do desenvolvimento. A mudança na expressão dos genes ocorre em dois estágios distintos: (1) do período embrionário para o fetal, no início da gestação; e (2) do período fetal para o adulto. No período embrionário são expressas as Hb Gower 1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$). No período fetal a Hb Fetal ($\alpha_2 \gamma_2$) é predominantemente expressa. Na vida adulta, aproximadamente seis meses após o nascimento, a Hb Adulta ($\alpha_2 \beta_2$) é majoritariamente expressa, juntamente com a fração minoritária da Hb A₂ ($\alpha_2 \delta_2$). (STAMATOYANNOPOULOS; GROSVELD, 2001). A Figura 1 ilustra o processo de ontogenia das cadeias globínicas.

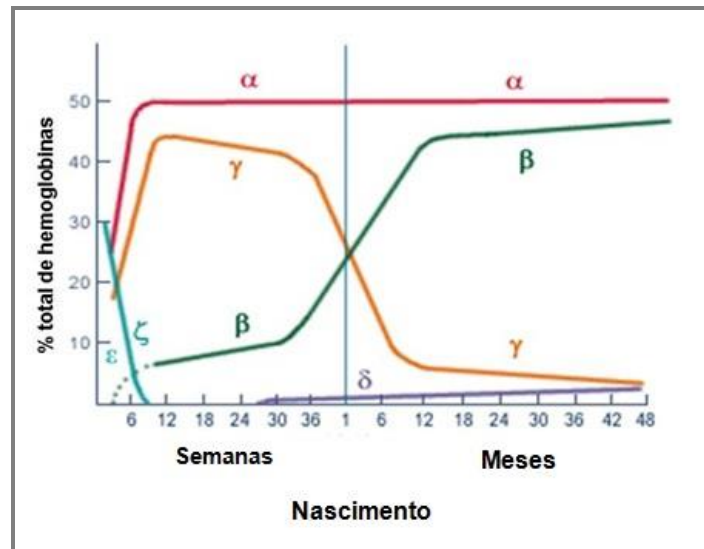


Figura 1: Processo de ontogenia das cadeias globínicas. As cadeias ϵ -globina e ζ -globina são expressas durante as primeiras semanas do desenvolvimento. Posteriormente, as cadeias α -globina iniciam seu processo de expressão que atingem 50% do total de cadeias expressas até a vida adulta. Após o declínio da expressão da ϵ -globina, as cadeias γ -globina são altamente expressas e, juntamente com as cadeias α -globina, formam a Hb F, hemoglobina característica do período fetal do desenvolvimento. Após o nascimento, intensifica-se a troca de expressão das cadeias γ -globina para β -globina, formando a Hb A, e a expressão minoritária das cadeias δ -globina, formando a Hb A₂. Imagem modificada de <http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Gene_Expression_II9-Regulation_of_Gene_Expression.htm>.

1.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias caracterizam a presença de alterações genéticas nos genes que codificam as diferentes cadeias globínicas. Dentre as hemoglobinopatias mais frequentes e que apresentam significância clínica no Brasil estão a anemia falciforme e a talassemia beta (ZAGO; COSTA, 1985).

1.2.1 Anemia Falciforme

O termo “anemia falciforme” se refere especificamente a homozigose para o alelo β^S . O termo “doença falciforme” se refere à presença de outras mutações de hemoglobinas associadas à Hb S: Hb SC e Hb SD, que caracterizam interações entre hemoglobinas variantes, e Hb S/ β -talassemia, cuja variabilidade das manifestações clínicas é dependente do tipo de mutação talassêmica herdada (SERJEANT; SERJEANT, 2001; NAGEL et al, 2003; REES et al., 2010).

A Hb S (HBB.c20A>T) é resultado de uma mutação pontual, do tipo transversão, em que ocorre a troca do nucleotídeo adenina por timina (A > T) no sexto códon da β -globina, resultando na substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina, originando uma hemoglobina com características físicas e bioquímicas alteradas (STEINBERG,

1998). Essa mudança estrutural influencia a modificação na arquitetura e flexibilidade do eritrócito, pela desidratação celular, bem como pelo estresse físico e oxidativo (BRITTENHAM et al., 1985; REES et al., 2010).

Em condição de hipóxia, desidratação ou acidose, a Hb S sofre processo de polimerização, no qual ocorre agregação dessas moléculas e formação de um feixe de polímeros, que se alongam e rompem a ligação existente entre a membrana do eritrócito e proteínas do citoesqueleto, resultando em protrusões na membrana que culminam na falcização dos eritrócitos (STEINBERG, 1999; ZAGO; PINTO, 2007). As células falcizadas apresentam tempo de vida útil reduzido e características que resultam na piora da qualidade de vida e aumento da taxa de mortalidade dos indivíduos com anemia falciforme (ZAGO; PINTO, 2007; CANÇADO et al., 2009).

O processo de polimerização das moléculas de Hb S é proporcional à extensão e duração da desoxigenação da hemoglobina e às concentrações intracelulares de Hb S e Hb F (BUNN, 1997; REES et al., 2010). A polimerização da Hb S representa em um dos principais determinantes de gravidade na doença, cujos efeitos protetores consistem na co-herança de fatores genéticos que modulam as concentrações de Hb S e Hb F, tais como a talassemia alfa e as mutações de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) (REES et al., 2010). Dentre as manifestações clínicas são observadas na anemia falciforme estão as crises de dor, infecções, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, infarto, priapismo, osteonecrose, insuficiência renal, úlcera de perna, retinopatia e doenças cardíacas (FRENETTE; ATWEH, 2007; STEINBERG, 2008; DRISS et al., 2009; AKINSHEYE; KLINGS, 2010).

A mutação β^S está relacionada com a presença de cinco haplótipos, combinação de sítios polimórficos que influenciam determinadas características como, por exemplo, a conduta clínica e os níveis de Hb F expressos. O haplótipo Bantu (República da África Cantral, CAR) está associado com maior gravidade da doença e menores níveis de Hb F (~5%). Os haplótipos Senegal (SEN) e Índia-Arábia Saudita (SAUDI) estão relacionados com menor gravidade clínica e maiores níveis de Hb F devido à presença do sítio polimórfico *XmnI* (-158 C>T) no promotor do gene γ^G , conhecido por influenciar o aumento na expressão de cadeias γ -globina. O haplótipo Benin (BEN) é associado com gravidade clínica e níveis de Hb F intermediários (NAGEL et al, 1987; GREEN et al., 1993 apud AKINSHEYE et al., 2011; STEINBERG et al., 2014).

Em relação ao tratamento, a terapia com hidroxureia (HU), um agente quimioterápico utilizado no tratamento de doenças neoplásicas por sua ação no bloqueio da

síntese de DNA, representa a medicação utilizada como padrão ouro na anemia falciforme. Dentre os principais efeitos dessa droga na doença estão a indução na produção de níveis aumentados de Hb F, melhora nos índices hematimétricos (Hb total, hematócrito, volume corpuscular médio do eritrócito e hidratação celular), produção de óxido nítrico, importante na manutenção do tônus vascular, e redução da adesão celular ao endotélio vascular, relacionado à ocorrência de vaso-oclusão (DAVIS, GILMORE, 2003; WARE et al., 2011). Apesar dos benefícios clínicos provenientes do tratamento com HU, é observada variação fenotípica na melhora do quadro clínico dos pacientes em relação ao aumento de Hb F, com os níveis de expressão podendo variar de 10% a 40% do total de hemoglobinas (CHARACHE et al., 1992; WARE et al., 2011).

1.2.2 Talassemia Beta

As talassemias consistem em um grupo de alterações moleculares causadas pela redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias de globina beta, resultando em menor produção de Hb A e anemia em graus variados, de característica microcítica e hipocrômica (WEATHERALL; CLEGG, 1981; BUNN; FORGET, 1986). Estima-se que aproximadamente 1,5% da população mundial seja portadora dessa afecção (GALANELLO; ORIGA, 2010).

Existem duas variantes alélicas da talassemia beta: o alelo β^0 , associado à ausência de síntese de cadeia β -globina, que está relacionado às formas mais graves da doença, e o alelo β^+ , associado à síntese reduzida de tal cadeia, que leva a uma forma mais branda de expressão da doença (WEATHERALL; CLEGG, 2001). Os indivíduos com talassemia beta são diagnosticados por análises laboratoriais e moleculares e classificados de acordo com a evolução clínica. Molecularmente, podem ser divididos em homozigotos e heterozigotos. Indivíduos homozigotos apresentam os dois alelos mutados, com os seguintes genótipos: $\beta^0\beta^0$, $\beta^+\beta^+$, $\beta^0\beta^+$ ou $\beta^+\beta^0$. Portadores da talassemia beta em heterozigose apresentam um dos alelos mutados e podem apresentar os seguintes genótipos: $\beta^0\beta$, $\beta^+\beta$, $\beta\beta^0$, $\beta\beta^+$. Estudos realizados na população brasileira mostraram que as mutações de talassemia beta mais frequentes são a CD39 (HBB:c.118C>T), IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A), IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C) e IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A) (ARAUJO et al., 2003; REICHERT et al., 2008).

Os fenótipos da talassemia beta são variáveis, desde uma forma grave, dependente de transfusões sanguíneas e tratamento, até uma forma discreta, na qual o indivíduo é considerado assintomático (BORGNA-PIGNATTI et al., 2004; DANJOU et al., 2011).

Clinicamente a talassemia beta pode ser classificada em três grupos, de acordo com o fenótipo: talassemia beta menor, talassemia beta intermediária e talassemia beta maior (CAO et al., 1997).

Os indivíduos com talassemia beta menor, que apresentam apenas um alelo mutado, são assintomáticos e não necessitam de tratamento, já que seus níveis de hemoglobina ficam levemente abaixo dos valores de normalidade. Já os indivíduos intermediários são sintomáticos, mas não dependem de transfusões de sangue regularmente (ZAGO et al., 2004). Os pacientes portadores da talassemia beta maior apresentam anemia grave, de característica microcítica e hipocrômica. A fisiopatologia na talassemia beta é resultante da síntese ineficiente de cadeias β -globina que se ligam às cadeias α -globina para formar o tetrâmero de Hb. Na falta da β -globina, ocorre precipitação de cadeias do tipo alfa nos eritrócitos maduros, causando danos à membrana dessas células e hemólise. Essas modificações geram, como consequências, quadros anêmicos, expansão medular e desenvolvimento de massas extramedulares hematopoiéticas, que incluem deformidades nos ossos longos das pernas e mudanças crânio-faciais, e acúmulo de ferro, que acabam por resultar, em longo prazo, em danos aos órgãos (GALANELLO; ORIGA, 2010; WEATHERALL; CLEGG, 2001; HIGGS et al, 2012). A ausência de tratamento pode resultar na ocorrência de hepatoesplenomegalia, comprometimento do crescimento e desenvolvimento e diminuição da expectativa de vida. O tratamento consiste em programas regulares de transfusão sanguínea acompanhada por terapia quelante, com objetivo de aumentar a expectativa de vida do indivíduo e reduzir a sobrecarga de ferro tecidual (BORGNA-PIGNATTI et al., 2004; DANJOU et al., 2011).

1.3 A Hemoglobina Fetal e sua importância para as beta-hemoglobinopatias

A hemoglobina Fetal (Hb F) é formada por duas cadeias α -globina e duas cadeias γ -globina ($\alpha_2 \gamma_2$). Os genes γ (*HBG1* e *HBG2*) são resultantes de uma duplicação *em tandem* de 5 kilobases (kb) e diferem em apenas um aminoácido, glicina (γ^G) ou alanina (γ^A), na posição 136 da cadeia polipeptídica. Até o nascimento, as cadeias γ^G são mais abundantes, enquanto as cadeias γ^A predominam na vida adulta (SHEN et al., 1981; ZAGO et al., 2004).

Essa hemoglobina é produzida em altos níveis durante o período fetal, devido à elevada expressão dos genes γ nessa etapa do desenvolvimento. Em indivíduos adultos, o gene da β -globina é predominantemente expresso e a hemoglobina adulta compreende 98%

do total de hemoglobinas, enquanto os genes γ são pouco expressos e a Hb F engloba até 1% do total (MENZEL et al., 2007; XU et al., 2009).

Por sua alta afinidade pela molécula de oxigênio, níveis elevados de Hb F podem ser benéficos para indivíduos portadores de beta-hemoglobinopatias. Quando os genes γ são altamente expressos, a presença de níveis aumentados de Hb F nos eritrócitos pode compensar os produtos da β -globina alterada e reduzir significativamente os sintomas de ambas as doenças (WEATHERALL; CLEGG, 1981; STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; STEINBERG et al., 2001; SANKARAN, 2011).

Na anemia falciforme, a concentração de Hb F e sua distribuição entre os eritrócitos são importantes moduladores genéticos da doença, visto que o aumento na síntese de Hb F reduz o processo de polimerização da Hb S em condições de desoxigenação celular, diminuindo a expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular, aumentando a hidratação eritrocitária, dentre outros. Esses mecanismos, em conjunto, conferem benefícios no que diz respeito à redução do processo hemolítico e dos fenômenos inflamatórios e vaso-oclusivos, refletindo na diminuição do requerimento transfusional e ocorrência de hospitalizações (COVAS et al., 2004; ZIMMERMAN et al., 2004 apud CANÇADO et al., 2009; KOVACIC, 2010).

Na talassemia beta homozigota, altas concentrações de Hb F aumentam a quantidade total de hemoglobina circulante e reduzem o desequilíbrio entre as cadeias α -globina e não α -globina, podendo auxiliar na redução do quadro hemolítico dessa doença e na diminuição da periodicidade dos processos transfusionais. Os níveis de Hb F são aumentados devido à sobrevivência seletiva dos precursores eritróides, que sintetizam mais cadeias γ -globina. Assim, a maior expressão dos genes γ tem relevância clínica no tratamento das doenças relacionadas à β -globina alterada (THEIN, 2005; XU et al., 2009; CAO; GALANELLO, 2010).

1.3.1 Regulação da Expressão da Hb F

Devido ao importante papel da hemoglobina na manutenção das atividades metabólicas, muitos fatores são conhecidos por regular a expressão dos genes das globinas e, especificamente, os genes γ . Dentre eles são conhecidas mutações que conferem Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) e Delta-Beta Talassemia ($\delta\beta$ -Talassemia) (CRAIG et al., 1994; CARROCINI et al., 2011) e *loci* de características quantitativas (QTLs) presentes no cromossomo 2 (*Bcl11a*), cromossomo 6 (região intergênica entre os genes *Hbs11* e *Myb*) e no cromossomo 11 (polimorfismo *XmnI*, na

região promotora do gene γ^G) (THEIN, 2004; MENZEL et al., 2007; LETTRE et al., 2008).

A PHHF é uma condição benigna decorrente da ausência de mudança completa da síntese de γ -globina para β -globina, resultando em produção substancial de cadeias γ -globina e, conseqüentemente, de Hb F. As PHHF podem ocorrer por mutações pontuais na região promotora dos genes γ , sendo que essas mutações supostamente alteram a afinidade das proteínas reguladoras necessárias para a repressão pós-natal da expressão dos genes γ , ou por deleções de parte da família β -globina, sem causar alterações nos genes codificadores das cadeias γ^G e γ^A (OLAVE et al., 2007; NUSSBAUM et al., 2008). A variação nos níveis de Hb F é maior para as mutações pontuais (0,6% a 38,5%) do que para as mutações deletórias (16,0% a 30,0%). De maneira geral, indivíduos heterozigotos para as mutações de PHHF apresentam eritrócitos morfologicamente normais.

A $\delta\beta$ -Talassemia é caracterizada pela expressão persistente dos genes γ durante a vida adulta em associação com a expressão diminuída ou a ausência de expressão dos genes δ e β , ocasionando aumento nas concentrações de Hb F, além da presença de células com hipocromia e microcitose. São caracterizadas por grandes deleções envolvendo os genes δ e β [$\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^0$ -Talassemia] e também o gene γ^A [$\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^0$ -Talassemia]. Indivíduos heterozigotos para as mutações de $\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^0$ -Talassemia apresentam variação de Hb F entre 4,0% e 18,6%, enquanto que para as mutações $\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^0$ -Talassemia os níveis de Hb F encontrados variam de 9,3% a 25% (CRAIG et al., 1997; FORGET, 1998; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

O polimorfismo *XmnI* (rs7482144), decorrente de uma mutação na posição 158 da região promotora do gene γ^G (C > T) é comumente conhecido por influenciar a expressão desse gene e predispõe ao aumento na expressão de Hb F. Na presença desse sítio polimórfico, as taxas de produção das cadeias $\gamma^G:\gamma^A$ atingem valores semelhantes aos encontrados ao nascimento, período em que os níveis das cadeias γ^G estão mais elevados (SAMPIETRO et al., 1992; NEMATI et al., 2009). Em relação aos níveis de Hb F associados a esse polimorfismo em indivíduos sem alterações de hemoglobinas, relatos da literatura mostraram variação de 2,9% a 5,1%. Outro trabalho revelou níveis de Hb F de 2% a 20% na presença desse polimorfismo (STAMATOYANNOPOULOS; NIENHUIS, 1987).

Estudos de associação de genomas amplos (GWAS) mostraram que regiões não pertencentes à família β -globina, dentre elas 2q16, 6q23, 8q e Xp22.2-22.3, estão implicadas na regulação de Hb F (NGUYEN et al., 2010).

HMIP, localizado na região intergênica *HBSIL-MYB*, no cromossomo 6q23, influencia os níveis de Hb F. O gene *HBSIL* está envolvido na regulação de uma gama de processos celulares e é expresso em células da linhagem hematopoética, enquanto que o gene *MYB* está envolvido na oncogênese e desempenha papel essencial no processo de eritropoese (THEIN et al., 2009; WAHLBERG et al., 2009). Acredita-se que a região gênica 6q seja responsável por codificar um fator envolvido na via de maturação eritróide, resultando em aumento nos níveis de células F e Hb F (GARNER et al. 1998). Estudos realizados com famílias de origem asiático-indiana mostraram que o *locus* 6q23 apresentou maior associação com os níveis elevados de expressão de Hb F em indivíduos beta talassêmicos (de 10% a 24%) (CRAIG et al., 1996).

Outro QTL associado com níveis elevados de Hb F está localizado na região 2q16, no cromossomo 2. Trabalhos realizados em busca de associação com os níveis de Hb F revelaram que o QTL *BCL11A* apresenta forte relação com a variação de Hb F (MENZEL et al., 2007; UDA et al., 2008). Uda e colaboradores (2008) verificaram maior frequência do SNP rs11886868 em indivíduos com talassemia beta intermediária em relação aos indivíduos com talassemia maior. Na anemia falciforme, Lettre e colaboradores (2008) mostraram que a variação de Hb F foi fortemente associada com a presença do QTL *BCL11A*, principalmente em relação aos SNPs rs4671393, rs11886868 e rs7557939. Pesquisadores sugerem que o produto do gene *BCL11A*, o fator de transcrição BCL11A, é o mediador central no processo de silenciamento dos genes da γ -globina (SANKARAN et al., 2008; CHEN et al., 2009, XU et al., 2010).

Aproximadamente 45% da variação nos níveis de Hb F está associada com a presença do polimorfismo *XmnI* no cromossomo 11 (11p15), do *locus HMIP* no cromossomo 6 (6q23) e os SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) presentes no gene *BCL11A* no cromossomo 2 (2q16) (MENZEL et al., 2007; THEIN et al., 2009).

Os níveis de Hb F também são influenciados pela região Xp22.2, no cromossomo X. Estudos com mulheres, portadoras de anemia falciforme e sem alterações de hemoglobinas, mostraram aumento das concentrações de células F, sugerindo que essa região genômica possa influenciar a Hb F (MIYOSHI et al., 1988; DOVER et al., 1992). Estudos de associação em famílias identificaram um QTL no cromossomo 8, mais precisamente na região 8q, que apresentou ligação com os níveis elevados de células F e Hb F, em associação com o sítio polimórfico *XmnI*. O QTL 8q pode ser responsável por codificar um fator de regulação que atua como repressor ou ativador transcricional, que se liga diretamente ao sítio *XmnI* ou em regiões próximas a ele (GARNER et al. 2002).

Além desses reguladores genéticos, fatores de transcrição e microRNAs constituem elementos de regulação importantes na expressão das diferentes cadeias globínicas, sendo que alguns deles estão envolvidos, especificamente, na modulação dos níveis de Hb F.

1.4 Fatores de Transcrição

Fatores de transcrição são proteínas reguladoras que se ligam a regiões específicas do DNA e controlam o processo de transcrição gênica, ativando ou reprimindo a expressão dos genes (LODISH et al., 2005).

Relatos da literatura mostraram a influência de fatores de transcrição na hematopoiese, na eritropoiese e na regulação dos genes das globinas, evidenciando o importante papel desses elementos na expressão das diferentes moléculas de hemoglobinas. Em relação à expressão da Hb F, o fator de transcrição *zinc-finger* BCL11A é conhecido por atuar no processo de silenciamento dos genes da γ -globina e na troca de expressão desses genes para os genes da β -globina (SANKARAN et al., 2008). Estudos utilizando células K562 mostraram que BCL11A se liga a uma região central no promotor do gene γ formando um complexo repressor que atua como agente silenciador na expressão desse gene (CHEN et al., 2009).

Estudos realizados por Xu e colaboradores (2010) mostraram que o silenciamento dos genes da γ -globina são resultado da ampla interação que ocorre entre o fator de transcrição BCL11A e a família β -globina, além da interação com a cromatina, na formação de um *looping* cromossômico, em associação com outro fator de transcrição, o SOX6, nos promotores dos genes da γ -globina. Tais achados evidenciam que os fatores de transcrição BCL11A e SOX6 podem ser considerados reguladores genéticos no controle do silenciamento dos genes da γ -globina em adultos.

1.5 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs, não codificantes, de fita simples (de 19 a 25 nucleotídeos), formados a partir de transcritos endógenos, com estrutura de grampo (*hairpin*), que regulam a expressão gênica inibindo o processo traducional ou promovendo a degradação do RNA mensageiro (mRNA) alvo, por meio da ligação à região 3'-UTR (região não traduzida) (FILIPOWICZ et al., 2005; LYTLE et al., 2007). Mais de um terço dos genes humanos são preditos como alvos dos miRNAs e

aproximadamente 40% dos *loci* que codificam miRNAs estão localizados em regiões não codificantes (introns) (KIM et al., 2009).

Os miRNAs são transcritos em um microRNA primário (pri-miRNA) dupla-fita que apresenta estrutura em grampo (*hairpin*). Esse transcrito primário é processado pela *Drosha*, uma enzima RNase III que se liga ao RNA dupla-fita, clivando-o em uma sequência precursora denominada pré-miRNA (~ 70 nucleotídeos). Após a clivagem, o pré-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pela ação da Exportina 5 (complexo *Exportin-5-Ran-GTP-dependent*). Uma vez no citoplasma, esse precursor é clivado pela *Dicer*, uma enzima RNase III, perdendo a estrutura em grampo e originando duas fitas simples que constituem miRNAs maduros de, aproximadamente, 22 nucleotídeos. Uma das fitas é acoplada ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) e a outra fita sofre degradação. O miRNA maduro acoplado ao complexo RISC liga-se ao mRNA alvo, degradando-o ou inibindo o processo de tradução da proteína (BARTEL, 2004; HE; HANNON, 2004; CAMPOS et al., 2011). A Figura 2 resume o processo de biogênese dos microRNAs.

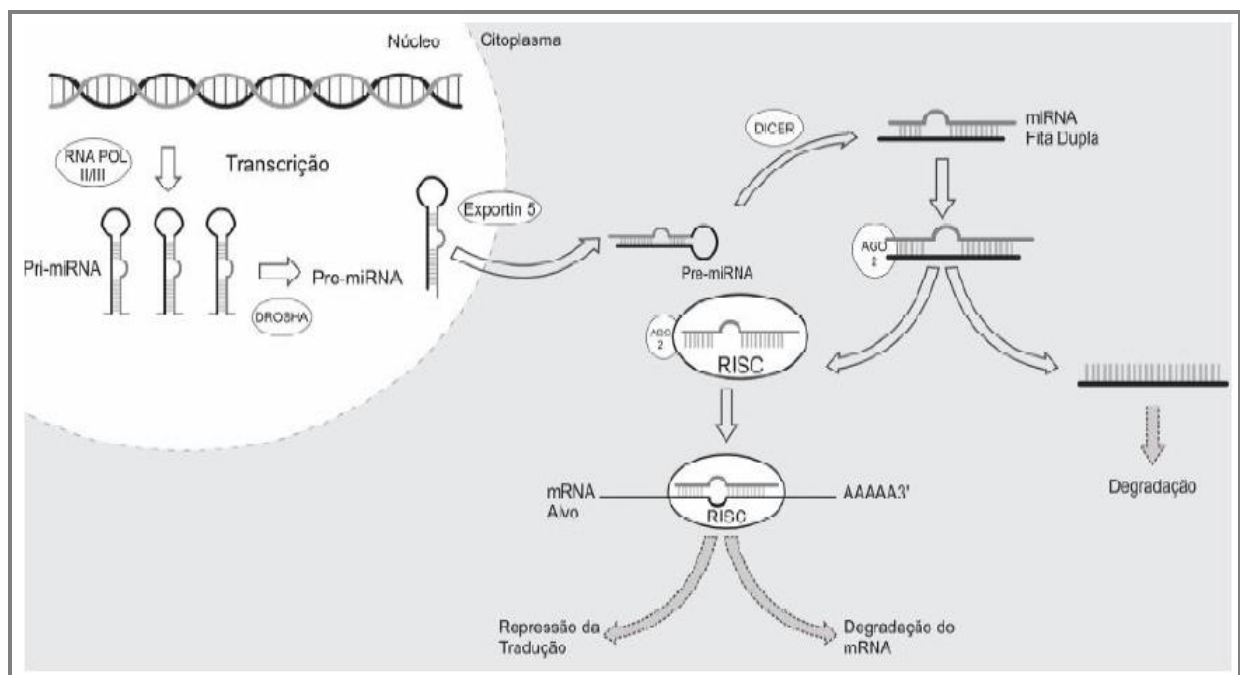


Figura 2: Biogênese dos microRNAs. Após a transcrição, o pri-miRNA sofre clivagem pela ação da *Drosha*, formando o pré-miRNA. Esse precursor é exportado para o citoplasma, onde sofre ação da *Dicer* perdendo a estrutura em grampo e originando duas fitas simples, que constituem o miRNA maduro (~ 22 nucleotídeos). Uma das fitas é acoplada ao complexo RISC e se liga ao mRNA alvo, degradando-o ou inibindo o processo traducional (CAMPOS et al., 2011).

Os microRNAs estão envolvidos em processos importantes, tais como proliferação, diferenciação celular e apoptose. Consequentemente, problemas na regulação dessas sequências desencadeiam uma série de doenças humanas, dentre elas as doenças hematológicas (WU; BELASCO, 2005; HURST, 2006).

Os microRNAs são componentes importantes na hematopoiese e na eritropoiese (O'CARROLL et al., 2007; GARZON; CROCE, 2008). Trabalhos mostraram que alguns microRNAs estão desregulados nos eritrócitos de portadores da anemia falciforme e talassemia beta. Sangokoya e colaboradores (2010) mostraram aumento da expressão do miR-144 em portadores de anemia falciforme. Em relação à talassemia beta, Svasti e colaboradores (2010) observaram aumento na expressão do miR-451, comparado à indivíduos sem hemoglobinopatias.

Esses elementos parecem estar envolvidos na troca de expressão que ocorre entre a Hb F e a Hb A, processo importante na clínica de portadores de anemia falciforme e talassemia beta (NOH et al., 2009). Em relação à regulação dos genes da γ -globina, Azzouzi et al. (2011) demonstraram que a expressão do miR-96 reduz os níveis de Hb F, enquanto o *knockdown* desse microRNA aumenta a expressão dessa hemoglobina, suprimindo a repressão dos genes da γ -globina e contribuindo, dessa forma, para a regulação da Hb F.

A co-herança de determinantes genéticos relacionados aos níveis de Hb F pode desempenhar papel importante na modulação do fenótipo de portadores de anemia falciforme e talassemia beta homocigota (GARNER et al. 2002). O transplante de medula óssea representa uma possibilidade de cura, mas apresenta dificuldades em relação à compatibilidade de doação e rejeição pós-transplante. O tratamento dessas afecções genéticas é baseado em processos transfusionais periódicos e utilização de medicação específica como, por exemplo, a HU que, em conjunto, atuam na redução da anemia, na melhoria dos parâmetros hematológicos e, consequentemente, na melhor clínica. Apesar da melhora clínica resultante desses dois tratamentos, não são todos os indivíduos que respondem ao tratamento com HU. Assim, a identificação de genes e variantes genéticas que contribuem para a variabilidade da expressão de Hb F, e os mecanismos moleculares envolvidos nessa variação podem auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de novos agentes farmacológicos que possam elevar os níveis dessa hemoglobina, na tentativa de reduzir a gravidade do quadro clínico dos indivíduos que apresentam manifestações clínicas graves.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Rastrear elementos de regulação e microRNAs que influenciam a expressão dos genes *HBG1* (γ^A) e *HBG2* (γ^G) e em portadores de beta-hemoglobinopatias (anemia falciforme e talassemia beta homozigota), e em indivíduos sem alterações de hemoglobinas [grupo controle negativo (Hb AA)], a fim de conhecer os reguladores genéticos que atuam na modulação da Hb F.

2.2 Objetivos Específicos

- Rastrear os elementos de regulação e microRNAs envolvidos na regulação dos genes *HBG1* (γ^A) e *HBG2* (γ^G) por meio de ferramentas de bioinformática;
- Avaliar a expressão de microRNAs envolvidos na regulação dos genes da γ -globina;
- Comparar a influência desses elementos genéticos associados à regulação da Hb F em indivíduos portadores de talassemia beta na presença e na ausência do alelo β^0 , de anemia falciforme em uso de HU e sem uso de HU, e em grupo controle negativo;
- Correlacionar os microRNAs com expressão diferencial aos níveis de Hb F e as possíveis relações que cada elemento apresenta, dentro de cada grupo, objetivando conhecer o perfil desses reguladores nas beta-hemoglobinopatias avaliadas.

Material e Métodos

3 Material

3.1 Casuística e Critérios de Inclusão

A casuística inicialmente proposta consistia em 50 indivíduos no total, distribuídos em cinco diferentes grupos: grupo controle negativo (Hb AA), anemia falciforme em uso de HU, anemia falciforme sem uso de HU, talassemia beta na presença e ausência do alelo β^0 . No entanto, alguns dos indivíduos convocados para coleta de amostras para prosseguimento das análises de expressão de miRNA não compareceram ou se recusaram a realizar nova coleta. Dessa forma, o número amostral foi reduzido e consistiu em 38 amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA como anticoagulante, provenientes de indivíduos sem anemias (10 amostras), portadores de anemia falciforme em uso de HU (10 amostras), portadores de anemia falciforme sem uso de HU (6 amostras), indivíduos com talassemia beta na presença do alelo β^0 (8 amostras) e indivíduos com talassemia beta na ausência do alelo β^0 (4 amostras). Inicialmente, havíamos previsto a inclusão de um grupo de estudo constituído por indivíduos com mutações de PHHF, caracterizando um grupo controle positivo. No entanto, os indivíduos não foram localizados para coleta ou não concordaram em participar da pesquisa e, dessa forma, esse grupo não foi incluso na casuística do trabalho.

As amostras dos indivíduos sem queixas de anemia, que constituíram o grupo controle negativo, foram provenientes de estudantes da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto-SP. O grupo foi composto por seis homens e quatro mulheres, com mediana de idade de 24,5 anos (variando de 22 a 30 anos). Foram incluídos nesse grupo indivíduos que apresentaram valores de Hb F dentro dos parâmetros de normalidade, inferiores a 1%. A mediana dos níveis de Hb F para esse grupo foi de 0%, variando de 0% a 0,8% do total de hemoglobinas.

As amostras de sangue dos grupos de indivíduos com anemia falciforme foram colhidas no Hemocentro de São José do Rio Preto-SP e no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – HEMORIO, Rio de Janeiro-RJ, locais onde os pacientes fazem acompanhamento clínico. As amostras dos indivíduos com talassemia beta foram colhidas no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – HEMORIO, Rio de Janeiro-RJ.

Todos os portadores de anemia falciforme participantes do estudo apresentaram perfil homocigoto para o haplótipo β^S Bantu. Esse critério de inclusão foi adotado devido

ao envolvimento dessa combinação polimórfica na modulação de menores níveis de Hb F (POWARS, 1991 apud SILVA; GONÇALVES, 2010). Com base nessa informação, optamos por reduzir a influência dos haplótipos β^S em nossas análises, adotando apenas o haplótipo Bantu em homozigose como fator genético associado à mutação β^S e, conseqüentemente, favorecendo a homogeneização dos grupos com anemia falciforme. Essa homogeneização em relação à homozigose para a mutação e os haplótipos β^S foi adotada, a fim de reduzir possíveis vieses decorrentes da presença de diferentes padrões de haplótipos β^S .

O grupo de anemia falciforme em uso de HU foi composto por quatro homens e seis mulheres, com mediana de idade de 28,5 anos (variando de 11 a 54 anos), que faziam uso do fármaco há, pelos menos, um ano. As informações a respeito do uso de HU foram obtidas a partir de questionários aplicados no momento da coleta de sangue e da consulta aos prontuários de cada um dos pacientes. Nesse grupo foram incluídos indivíduos que apresentaram níveis de Hb F superior a 8%, inferindo a atuação da droga na expressão dessa hemoglobina. A mediana dos níveis de Hb F para esse grupo foi de 11,3%, variando de 8% a 29,9%.

O grupo de anemia falciforme sem uso de HU foi formado por dois homens e quatro mulheres, com mediana de idade de 18,5 anos (variando de 16 a 56 anos). Nesse grupo foram incluídos indivíduos com Hb F inferior a 5% do total de hemoglobinas, uma vez que, na ausência do uso de HU, quantidades de Hb F superiores a 5% indicam a presença de outro marcador, além do haplótipo, que exerce influência na regulação da Hb F. Como não avaliamos outros marcadores conhecidos por influenciar a expressão dos genes γ -globina como, por exemplo, os *locus* de características quantitativas (QTLs), optamos por minimizar possíveis interferentes que poderiam gerar questionamentos futuros a respeito da regulação da Hb F. Dessa maneira, a mediana dos níveis de Hb F para esse grupo foi de 2,85%, variando de 0,9% a 4,5%.

Os portadores de talassemia beta β^0 compuseram um grupo formado por cinco homens e três mulheres, com mediana de idade de 17,5 anos, variando de 7 a 41 anos, com níveis de Hb F de 2,45% (variando de 0,8% a 6,1%). O grupo com talassemia beta β^+ foi formado por três homens e uma mulher, com mediana de idade de 42 anos variando de 17 a 59 anos, com níveis de Hb F de 12,65% (variando de 1,7% a 52,3%). É importante destacar que, nesses indivíduos, os níveis de Hb F encontrados refletem, na maioria das vezes, o perfil do doador de sangue e não do indivíduo talassêmico, uma vez que esses

pacientes estão em regime de hipertransfusão, quinzenal para o grupo β^0 , que consiste no tratamento da doença.

A Tabela 1 apresenta a casuística do estudo.

Tabela 1: Detalhamento da casuística do estudo.

Grupo de Estudo	Composição dos Sexos	Idade (mínima – máxima)	Hb F (mínima – máxima)
Grupo controle negativo	H: 6	24,5 anos	0%
	M: 4	(22 – 30)	(0% - 0,8%)
Anemia falciforme com HU	H: 4	28,5 anos	11,3%
	M: 6	(11 – 58)	(8% - 29,9%)
Anemia falciforme sem HU	H: 2	18,5 anos	2,85%
	M: 4	(16 – 56)	(0,9% - 4,5%)
Talassemia beta β^0	H: 5	17,5 anos	2,45%
	M: 3	(7 – 41)	(0,8% - 6,1%)
Talassemia beta β^+	H: 3	42 anos	12,65%
	M: 1	(17 – 59)	(1,7% - 52,6%)

Legenda: H = homem; M = mulher.

3.2 Considerações Éticas

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) sob o número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 09673412.3.0000.5466, obedecendo aos princípios estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Além disso, está inserido em um projeto amplo, em parceria com o Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – HEMORIO-RJ, intitulado “*Estudo de Polimorfismos Genéticos em Pacientes Portadores de Doença Falciforme e sua associação com complicações clínicas*”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEMORIO, formalizado pelo processo de número 000054/33/01/2012. Todos os indivíduos concordaram em participar da pesquisa. Anteriormente à coleta de sangue, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A identidade dos participantes da pesquisa foi mantida em sigilo.

3.3 Método

3.3.1 Rastreamento de elementos de regulação dos genes γ por análise comparativa de sequências (*Footprinting* Filogenético)

A comparação de sequências de DNA de diferentes espécies é um método fundamental para a identificação de elementos funcionais em genomas. A ferramenta de bioinformática VISTA (<http://www-gsd.lbl.gov/vista/>) foi desenvolvida com a finalidade de responder diversas questões, desde comparação de sequências gênicas de mesma família (PARENT et al, 2002), descoberta de elementos não codificantes funcionais (ANGUITA et al., 2002; TOUCHMAN et al., 2001) a identificação de padrões de conservação em escala genômica (COOPER et al., 2004). O pacote VISTA inclui ferramentas de genômica comparativa, possibilitando o alinhamento de genomas de várias espécies. A genômica comparativa requer, pelo menos, duas sequências de DNA que são evolutivamente relacionadas (FRAZER et al., 2003; 2004). O método de *footprinting* filogenético e análise comparativa de sequências baseiam-se na hipótese de que sequências com importância biológica, em especial as regiões não codificantes, são conservadas entre espécies relacionadas, devido a pressões funcionais (NOBREGA; PENACCHIO, 2003).

A escolha das espécies para a comparação das sequências, nesse estudo, foi baseada na história evolutiva dos genes de interesse. O processo evolutivo dos genes γ foi diferente durante a divergência dos mamíferos. Os primatas prossímios (Subordem Strepsirhini) apresentam um único gene γ , cuja expressão ocorre na vida embrionária, juntamente com o gene ε . Os primatas símios (Subordem Haplorhini) possuem dois genes γ na composição da família β -globina, e a expressão desses genes ocorre no período fetal, diferindo do que ocorreu nos prossímios (CHIU et al., 1996; JOHNSON et al., 1996). Relatos da literatura, com base em evidências moleculares, sugerem que a expressão do gene γ no período fetal pode ter ocorrido após a divergência entre os primatas prossímios e símios, cerca de 55 milhões de anos atrás (FITCH et al., 1991 apud MEIRELES et al., 1995). A história evolutiva desses genes indica a ocorrência de uma duplicação *em tandem* de um fragmento de DNA de aproximadamente 5.5 kilobases (kb), anteriormente à divergência entre Platyrrhini e Catarrhini (aproximadamente 35 milhões de anos atrás). Baseado nessas informações acredita-se que o recrutamento fetal do gene da γ -globina e o processo de duplicação gênica ocorreram no mesmo período da história evolutiva (FITCH et al., 1991 apud MEIRELES et al., 1995; FITCH et al., 1991 apud JOHNSON et al., 2002).

Embora os primatas símios apresentem dois genes γ , há uma diferenciação em relação à expressão e período de ativação desses genes. Nos Platyrrhini, apenas um dos genes é funcional, enquanto nos Catarrhini os dois genes são expressos. Dentre os primatas do Novo Mundo, evidências moleculares relatam a ocorrência de deleção de 1.8 kb no gene γ^1 tornando-o um pseudogene. Além disso, outras espécies de primatas Platyrrhini acumularam mutações pontuais na região promotora do gene γ^1 , mais especificamente na região CCAAT box, que caracteriza uma sequência importante para a expressão dos genes das globinas. Outras espécies possuem um único gene γ , resultado de fusão entre os dois genes existentes devido à ocorrência de *crossing-over* desigual (MEIRELES et al., 1995; CHIU et al., 1996).

Com base nos requisitos necessários para a utilização do pacote VISTA e nas informações da literatura acerca da evolução dos genes γ , foram realizadas comparações nas sequências de primatas do Novo Mundo, popularmente conhecidos como sagui de tufos brancos (*Callitrix jacchus*) e macaco-prego (*Cebus apella*) e dos primatas do Velho Mundo, conhecidos como macaco-rhesus (*Macaca mulatta*), orangotango de Sumatra (*Pongo abelli*) e chimpanzé-comum (*Pan troglodytes*), e o macaco tarsius (*Tarsius syrichta*), um primata basal da subordem Haplorrhini, com o DNA de humanos (*Homo sapiens*), para a busca de fatores de transcrição envolvidos na regulação dos genes γ .

As sequências genômicas referentes a cada uma das espécies selecionadas para a análise foram obtidas do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): *Homo sapiens* (GenBank: NG_000007.3), *Pan troglodytes* (GenBank: NW_001249430.1), *Macaca mulatta* (GenBank: NC_007871.1), *Pongo abelli* (GenBank: NC_012602.1), *Callitrix jacchus* (GenBank: NC_013906.1), *Cebus apella* (GenBank: U57043.1) e *Tarsius syrichta* (GenBank: M3397.1). O esquema computacional para alinhamento e análise de conservação baseou-se no programa de alinhamento local BLAT para identificação de homologia, que foram então processadas e globalmente alinhadas utilizando o programa mLAGAN (alinhamento múltiplo). Os alinhamentos foram visualizados por meio do VISTA Browser, que define por cores e padrões de “picos e vales”, a conservação da região avaliada. Para avaliação da conservação, foram utilizados os parâmetros *default* do programa (70% de identidade em pelo menos 100 pb). Para identificação de fatores de transcrição foi utilizado o rVISTA que associa o banco de dados TRANSFAC (913 *motifs*) com análise comparativa de sequências (FRAZER et al., 2004).

3.3.2 Rastreamento e seleção dos microRNAs envolvidos na regulação dos genes γ

O rastreamento dos microRNAs envolvidos na regulação dos genes da γ -globina foi realizado com base em diferentes bancos de dados, dentre eles *miRNAPath* (<http://lgmb.fmrp.usp.br/mirnapath>), *Diana Lab* (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>), *Miró-The miR ontology database* (<http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/>), *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>), *miRecords* (<http://mirecords.biolead.org/>), e *miRBase* (www.mirbase.org). As informações obtidas foram cruzadas entre si para que fossem selecionados os microRNAs que estivessem presentes em maior número de bancos de dados. Além disso, foi realizada uma busca na literatura, a fim de verificar se os microRNAs indicados pelos bancos de dados já foram validados, mostrando alguma relação efetiva com os genes γ .

3.3.3 Fenotipagem e Genotipagem das amostras dos portadores de beta-hemoglobinopatias e grupo controle

Os pacientes portadores de beta-hemoglobinopatias em acompanhamento no HEMORIO-RJ são caracterizados de acordo com a conduta clínica que apresentam. Sendo assim, todas as amostras coletadas foram submetidas aos testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinopatias, análise cromatográfica e confirmação molecular para a genotipagem dos indivíduos no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) – UNESP/IBILCE.

- **Testes Seletivos:**

- 1) **Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)**

Esta técnica avalia a resistência dos eritrócitos à hemólise. Resultados positivos para este teste são encontrados em heterozigose para hemoglobina C e, principalmente, em casos de beta talassemia heterozigota, em que os eritrócitos microcíticos presentes são mais resistentes ao processo de hemólise.

2) Análise da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)

Consiste na análise do tamanho, da forma e da quantidade de Hb nos eritrócitos em esfregaço sanguíneo. Em casos de talassemia beta heterozigota, os eritrócitos apresentam microcitose, hipocromia e moderada anisopoiquilocitose. A interpretação dos resultados segue padronização do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH/UNESP):

- Alterações discretas: (+)
- Alterações moderadas: (++)
- Alterações acentuadas: (+++)
- Células normais: (N)

3) Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965)

Utilizada para qualificar as hemoglobinas normais e grande parte das hemoglobinas anormais. Alterações nas cargas elétricas das hemoglobinas anormais, causadas por substituições e aminoácidos diferentes nas cadeias globínicas, promovem mobilidades eletroforéticas variadas.

- **Testes complementares para fenotipagem:**

4) Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido (VELLA, 1968)

Técnica específica para detectar hemoglobinas anormais que, em eletroforese em pH alcalino, migram na mesma posição da Hb A, dificultando a identificação correta das mesmas. Além disso, este método propicia a caracterização semiquantitativa da Hb F.

5) Cromatografia Líquida de Alta Performance de frações globínicas (TRINITY BIOTECH, 2011)

A quantificação das frações globínicas foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com utilização do equipamento *Ultra 2* (Trinity Biotech[®]) e kit de análise *Genesys*, em modo *High Resolution*, de acordo com recomendações do fabricante. Nesse sistema, a quantificação da Hb F é resultante da soma dos percentuais totais e acetilados dessa fração proteica. Consiste da cromatografia de troca iônica em sistema semi-aberto no qual as amostras são detectadas em absorbância de 413 nm. Os dados de análise provenientes do detector são processados e impressos no

relatório da amostra de acordo com tempos de retenção relativos. Esses tempos de retenção são relativos a uma solução padrão de hemoglobinas contendo Hb F, Hb A, Hb S e Hb C que é previamente injetado no sistema.

- **Genotipagens:**

6) Extração de DNA de sangue periférico por meio de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989 modificado por BONINI-DOMINGOS, 2006)

Este método promove a extração de DNA genômico de sangue periférico utilizando-se fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Neste procedimento, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. Adiciona-se álcool isoamílico ao fenol/clorofórmio durante a extração do DNA. A adição de etanol faz com que os sais e outros solutos, como os resíduos da extração com fenol/clorofórmio, permaneçam em solução, enquanto os ácidos nucleicos precipitam-se e podem ser separados facilmente por centrifugação. O DNA obtido nesse processo é adequado para aplicação em métodos de biologia molecular como a amplificação por PCR.

7) Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP (SAIKI et al., 1985)

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação que envolve o códon 6 foram o *primer* P 277 (sense): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e o *primer* P 278 (antisense): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'. Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido pela enzima *FastDigest DdeI* a 37 °C por 5 minutos. A Hb S elimina o sítio de restrição para a enzima *DdeI*, de modo que, na presença da mutação, são verificados os fragmentos de 288 pb, 88 pb e 6 pb (não visualizado em gel de agarose). Na ausência da mutação, são verificados os fragmentos de 201 pb, 88 pb, 87 pb, e 6 pb. A Figura 3 ilustra o padrão de fragmentos de DNA na presença e na ausência da mutação β^S .

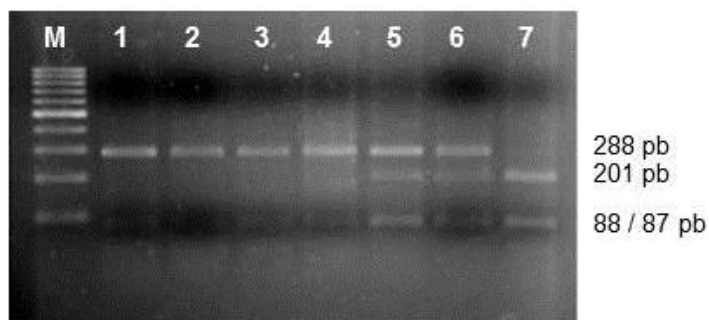


Figura 3: Foto do gel de agarose 2,0% mostrando os fragmentos de DNA obtidos após a digestão enzimática para confirmação da mutação β^S . M: Marcador molecular 100 pares de base. Linhas 1 a 4 representam indivíduos homocigotos para a mutação. Linhas 5 e 6 representam indivíduos heterocigotos para a mutação. A linha 7 representa ausência da mutação.

8) Análise molecular para as mutações de Beta Talassemia por PCR-AE (BERTHOLO, 2005)

Foram investigadas quatro mutações de talassemia beta: CD39 (HBB:c.118C>T), IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A), IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C) e IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A), devido à maior frequência dessas na população brasileira. A detecção das mutações foi realizada por PCR-AE utilizando-se os *primers* PS39W (5' GAC TCA AAG AAC CTC TG 3') e PS39M (5' GAC TCA AAG AAC CTC TA 3') para a mutação CD39; os *primers* TB110W (5' GGG TGG GAA AAT AGA CC 3') e TB110M (5' GGG TGG GAA AAT AGA CT 3') para a mutação IVSI-110; os *primers* IVSI6W (5' GTC TTG TAA CCT TGA TA 3') e IVSI6M (5' GTC TTG TAA CCT TGA TG 3') para a mutação IVSI-6 e os *primers* IVSI1W (5' GTG ACC TTG ATA CCA AC 3') e IVSI1M (5' GTG ACC TTG ATA CCA AA 3') para a mutação IVSI-1. A Figura 4 ilustra o resultado da PCR-AE para a identificação da mutação CD39.

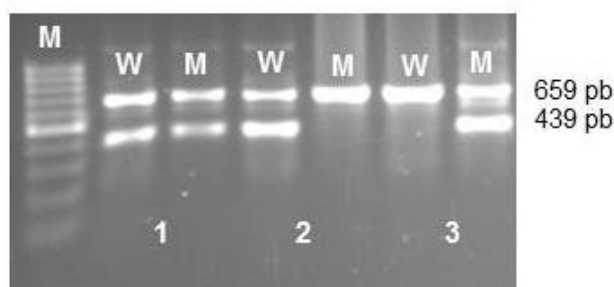


Figura 4: Foto de gel de agarose a 2,0%, resultado da técnica de PCR-AE para detecção da mutação CD39. Indivíduo 1 - heterocigoto para a mutação. Indivíduo 2 - ausência da mutação. Indivíduo 3 - homocigoto para a mutação. M= marcador molecular de 100 pares de base. W - alelo normal, M - alelo mutante.

9) Estratégia Molecular para o Sequenciamento Genômico das mutações de Talassemia Beta

Para os pacientes portadores de talassemia beta homocigota que não tiveram o genótipo definido pelas análises moleculares por meio de PCR-AE, foi necessário elaborar uma estratégia de sequenciamento genômico para a definição da mutação presente. Foram sintetizados três pares de oligonucleotídeos para rastrear mutações em parte da região promotora da β -globina, éxons, íntrons e regiões não-traduzidas (UTRs). Utilizamos o programa *Primer 3 Input* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) para a definição das sequências específicas, que foram posteriormente blastadas para verificação do sítio de reconhecimento no genoma, por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A Tabela 2 apresenta as sequências dos três pares de oligonucleotídeos sintetizados e o tamanho do fragmento amplificado.

Tabela 2: Sequências e tamanho dos fragmentos amplificados com os pares de oligonucleotídeos sintetizados para o sequenciamento genômico e definição das mutações de talassemia beta.

Par de oligonucleotídeos	Região Amplificada	Sequência dos oligonucleotídeos	Fragmento amplificado
HBB seq 1	Região Promotora 5'-UTR Éxon 1 Íntron 1 Éxon 2 (incompleto)	F 5' ACTCCTAAGCCAGTGCCAGA 3' R 5' CACGTGCAGCTTGTCACAG 3'	640 pb
HBB seq 2	Éxon 2 (incompleto) Íntron 2 (incompleto)	F 5' TCTGTCCACTCCTGATGCTG 3' R 5' GCAAAATTACCCTGATTTGGTC 3'	663 pb
HBB seq 3	Íntron 2 (incompleto) Éxon 3 3'-UTR	F 5' TTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC 3' R 5' GACCTCCCACATTCCTTTT 3'	829 pb

Legenda: F = *forward*; R = *reverse*; pb = pares de base. UTR = região transcrita e não traduzida.

As reações foram submetidas ao programa de ciclagem por PCR-*touchdown*, que consiste em um protocolo de reação no qual a temperatura de anelamento sofre uma redução de 1°C a cada ciclo, no total de 10 ciclos. Essa diminuição na temperatura garante que os primeiros eventos de hibridização envolvam as sequências com maior especificidade (ROUS, 1995). Na ciclagem estabelecida para as nossas reações, a temperatura de anelamento foi iniciada em 73°C e diminuída até 63°C, nos primeiros 10 ciclos de reação. Outros 30 ciclos posteriores foram realizados na temperatura de

anelamento referente à 63°C, totalizando 40 ciclos de reação. A Tabela 3 apresenta a ciclagem estabelecida para a estratégia de PCR-*touchdown*.

Tabela 3: Protocolo de ciclagem estabelecido para a técnica de PCR-*touchdown*.

Etapas da reação	Temperatura	Tempo	Quantidade de ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	5'	1x
Desnaturação	95°C	30''	
Anelamento	73°C – 63°C (-1°C por ciclo, por 10 ciclos)	45''	40x
Extensão	72°C	1'	
Extensão Final	72°C	7'	1x
	4°C	∞	

Legenda: x = número de ciclos. ' = minutos. '' = segundos.

Após as reações de amplificação das sequências de interesse, as amostras foram preparadas para posterior sequenciamento genômico. O sequenciamento das amostras foi realizado por serviços terceirizados de sequenciamento (ACTGene Análises Moleculares Ltda e pelo serviço de sequenciamento de DNA por *facilities* do Núcleo de Serviços em Biotecnologia, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo – USP/Ribeirão Preto-SP), utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3500 XL Genetic Analyzer*.

As sequências foram analisadas utilizando-se o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Também foram utilizados os programas *Phred/Phrap/Consed*, que são essenciais na montagem de sequências, na avaliação da qualidade do resultado do sequenciamento e na leitura dos eletroferogramas.

10) Análise dos Haplótipos β^S (SUTTON et al., 1989)

A determinação dos haplótipos β^S foi realizada por PCR-RFLP, por meio da análise de seis sítios polimórficos, e a classificação segundo Sutton e colaboradores (1989) (Figura 5). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos sítios polimórficos específicos são listadas na Tabela 4.

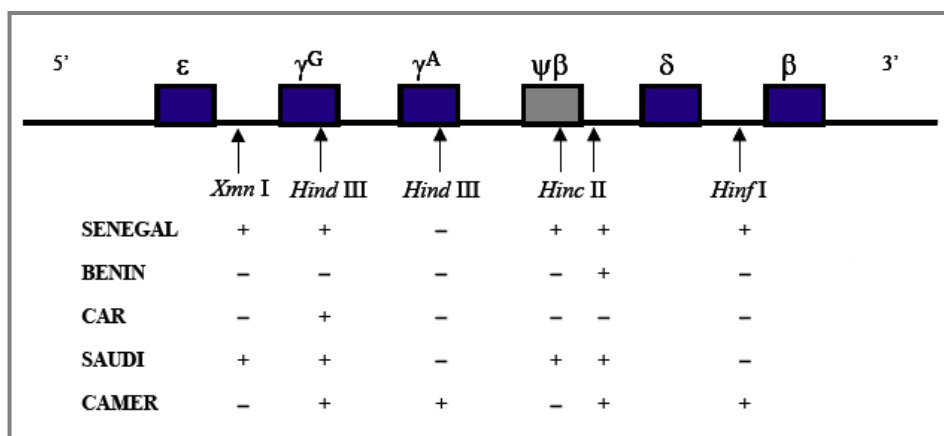


Figura 5: Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S (Sutton et al., 1989).

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para determinação dos haplótipos β^S .

Oligonucleotídeo	Sequência dos oligonucleotídeos (5' – 3')	Direção	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	←	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	$\Psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	3' $\Psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	

Legenda: →: *sense* ; ← *anti-sense*.

O produto da PCR foi digerido a 37°C por 5 minutos, com endonucleases de restrição específicas para cada sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após a clivagem pode ser observados na Tabela 5. O produto de digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado no

Sistema de Captura de imagem *L-PIX Touch* (Loccus Biotecnologia). Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição.

Tabela 5: Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem com as endonucleases de restrição para a determinação dos haplótipos β^S .

Oligonucleotídeos	Enzima de Restrição	Região	Fragmento amplificado	Fragmentos após a clivagem
H0 e H1	<i>Xmn</i> I	5' γ^G	657 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>Hind</i> III	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>Hind</i> III	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>Hinc</i> II	$\Psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$	590 p b	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf</i> I	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb

Legenda: pb = pares de bases.

11) Análise do polimorfismo *Xmn*I (SUTTON et al., 1989) e dos Haplótipos β -Tal (ORKIN et al., 1982)

A definição do polimorfismo *Xmn*I e dos haplótipos β -Tal foi realizada por PCR-RFLP, por meio da análise de sítios polimórficos (Figura 6). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos sítios polimórficos específicos são evidenciadas na Tabela 6.

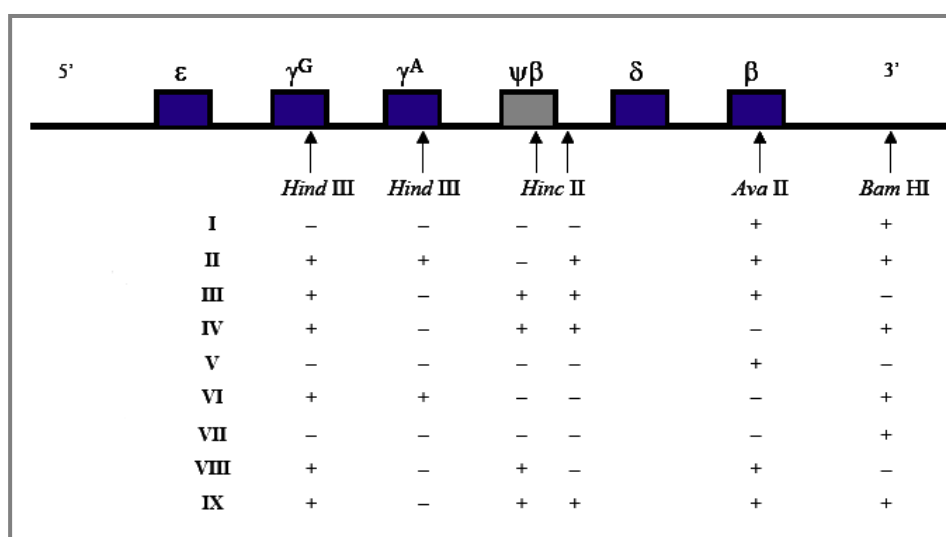


Figura 6: Sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β -globina segundo Orkin e colaboradores (1982).

Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados para determinação dos haplótipos β -Tal.

Oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo (5' – 3')	Direção	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	$5'\gamma^G$
H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	←	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	$\Psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	$3'\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	
P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	β
P5	TCATTTCGTCTGTTTCCCATTTC	←	
SF1	GCCCACATCACCAAGGCAAT	→	$3'\beta$
SF2	ATCTCACACATCCGTAGAGC	←	

Legenda: →: *sense* ; ←: *anti-sense*.

O produto da PCR foi digerido a 37°C durante 5 minutos, com endonucleases de restrição específicas para cada sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem pode ser observados na Tabela 7. O produto de digestão foi visualizado no Sistema de Captura de imagem *L-PIX Touch* (Loccus Biotecnologia). Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição.

A avaliação da distribuição das frequências entre os sítios polimórficos usados na classificação dos haplótipos foi realizada por meio do uso do software *Haploview 4.2*, que analisa os polimorfismos par a par, de acordo com sua heterozigosidade. Esse software calcula a probabilidade de determinado haplótipo ser herdado pelo indivíduo. Além disso, mostra a existência de desequilíbrio de ligação entre os *loci*, quando houver.

Tabela 7: Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem com as endonucleases de restrição para a determinação dos haplótipos β -Tal.

Oligonucleotídeos	Enzima de Restrição	Região	Fragmento amplificado	Fragmento após a clivagem
H0 e H1	<i>Xmn</i> I	5' γ^G	657 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>Hind</i> III	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>Hind</i> III	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>Hinc</i> II	$\psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$	590 p b	470 pb + 120 pb
P1 e P5	<i>Ava</i> II	β	763 pb	449 pb + 214 pb + 103 pb
SF1 e SF2	<i>Bam</i> HI	3' β	1520 pb	1228 pb + 292 pb

Legenda: pb = pares de bases.

3.3.4 Separação de Reticulócitos do sangue total

A metodologia para a separação de reticulócitos seguiu o protocolo utilizado no *The New York Blood Center*. Nesse protocolo, a amostra de sangue periférico é submetida a diferentes etapas de centrifugação e adição de tampões que isolam os leucócitos, os eritrócitos maduros e, ao final do processo, os reticulócitos em um *pellet*. O protocolo adotado para a separação de reticulócitos segue abaixo:

Protocolo para separação de reticulócitos a partir de sangue periférico:

1. Coletar 4 mL de sangue periférico em anticoagulante EDTA;
2. Transferir o sangue coletado para um tubo falcon de 15 mL;
3. Centrifugar a 3000 RPM por 10 minutos e temperatura de 4°C;
4. Descartar o plasma e o *buffy-coat* com auxílio de uma pipeta *Pasteur*;
5. Adicionar 5 volume de solução NH_4CL (0,144 M) com 0,5 volume de NH_4HCO_3 (0,01M) ao *pellet* para lisar as células;
6. Incubar no gelo por 30 minutos, agitando vigorosamente a cada 5 minutos;
7. Centrifugar a 3000 RPM por 15 minutos e temperatura de 4°C,
8. Transferir o sobrenadante para um novo tubo falcon de 15 mL;
9. Adicionar 1/10 do volume de sucrose (1,5 m)/KCl (0.15 M) ao sobrenadante;
10. Homogeneizar a solução;
11. Centrifugar a 5000 RPM por 20 minutos e temperatura de 4°C;
12. Transferir o sobrenadante para um novo tubo falcon de 15 mL;

13. Adicionar 700 uL de ácido acético 10% gelado;
14. Centrifugar a 5000 RPM por 20 minutos e temperatura de 4°C;
15. Descartar o sobrenadante;
16. Deixar o tubo falcon invertido numa gaze para escorrer todo o sobrenadante;
17. Retirar o excesso de sangue do interior do tubo com auxílio de uma gaze;
18. Reservar o *pellet* de reticulócitos para a extração enriquecida de microRNA.

SOLUÇÕES UTILIZADAS

A. Solução NH₄Cl 0,144 M/ NH₄HCO₃ 0,01 M

NH ₄ Cl (PM = 53,49).....	3,850 g
NH ₄ HCO ₃ (PM = 79,06).....	0,395 g
H ₂ O (q.s.p.).....	500 mL

B. Solução Sucrose 1,5 M/ KCl 0,15 M

Sucrose (PM = 342,30).....	256,725 g
KCl (PM = 74,56).....	5,591 g
H ₂ O (q.s.p.).....	500 mL

3.3.5 Extração enriquecida de microRNA

Após separação dos reticulócitos foi realizada a extração enriquecida de microRNA com auxílio do kit *mirVana™ PARIS™ RNA and Native Protein Purification Kit* (Ambion®). Nesse protocolo, diferentes reagentes são empregados para extração do RNA total e do microRNA, simultaneamente. O protocolo para extração de microRNA é descrito abaixo:

Protocolo de extração enriquecida de microRNA:

- 1) Adicionar 300 uL de “*Cell Disruption*” (gelado) ao *pellet* de reticulócitos;
- 2) Adicionar 1 volume da solução “*2x Denaturation*”;
- 3) Incubar no gelo por 5 minutos;
- 4) Adicionar 1 volume da solução “*Phenol/Chlorophorm*” (pipetar a fase inferior);
- 5) Usar vortex por 1 minuto;
- 6) Centrifugar por 5 minutos, em 13000 RPM;
- 7) Coletar o sobrenadante;

- 8) Ao sobrenadante, acrescentar 1/3 do volume de etanol 100%;
- 9) Passar a solução na coluna;
- 10) Coletar o filtrado e guardar a coluna 1;
- 11) Ao filtrado, adicionar 2/3 do volume de etanol 100%;
- 12) Passar a solução na coluna (descartar os sobrenadantes e usar somente as colunas 1 e 2);
- 13) Nas colunas 1 e 2, lavar com 700 uL da solução “*Wash 1*” e centrifugar por 1 minuto, em 13000 RPM;
- 14) Descartar o sobrenadante, adicionar 500 uL da solução “*Wash 2/3*” e centrifugar por 1 minuto, em 13000 RPM;
- 15) Descartar o sobrenadante e guardar as colunas;
- 16) Repetir as etapas 14 e 15;
- 17) Adicionar 50 uL da solução “*Elution Solution*”, em temperatura de 95°C;
- 18) Armazenar os tubos em freezer -80°C.

Posteriormente, a solução contendo os microRNAs foi quantificada, utilizando-se o equipamento *NanoDrop*[®] *ND-1000 Spectrophotometer*, e os resultados obtidos mostraram qualidade e concentração de RNA adequadas para dar continuidade às análises.

3.3.6 Síntese de DNA complementar (cDNA) (RT-PCR)

Após a extração do RNA foi realizada a etapa de síntese do cDNA, utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems[®]), seguindo as recomendações do fabricante em relação ao protocolo de reação e ciclagens. Aos *mixes* de reação, além dos reagentes necessários para processo de síntese de cDNA, adicionamos os *primers* específicos para as sondas de microRNAs, constituindo uma reação de PCR-multiplex. A Tabela 8 apresenta o protocolo de reação utilizado na etapa de síntese de cDNA e a Tabela 9 refere-se à ciclagem da reação. Após a ciclagem, as amostras de cDNA foram armazenadas em freezer com temperatura de -4°C para posterior utilização nas análises de expressão dos microRNAs.

Tabela 8: Protocolo de reação para a síntese de cDNA.

Reagentes	Volume (uL)
Água <i>Nuclease free</i>	6,274 uL
Tampão (10x RT)	2,5 uL
dNTPs (100 mM)	0,25 uL
RNase <i>Inhibitor</i> (50 U)	0,316 uL
<i>Primer A</i> (50 RT)	1,0 uL
<i>Primer B</i> (50 RT)	1,0 uL
<i>Primer C</i> (50 RT)	1,0 uL
<i>Primer D</i> (50 RT)	1,0 uL
<i>MultiScribe Reverse Trnascriptase</i> (100 uL)	1,66 uL
RNA (10 ng/uL)	5,0 uL
Volume da reação	20 uL

Legenda: Os *primers A a D* são referentes aos microRNAs específicos, constituindo uma reação de PCR-multiplex.

Tabela 9: Protocolo de ciclagem da reação de síntese de cDNA.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Hold	16 °C	30 min
Hold	42 °C	30 min
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

3.3.7 Análise da Expressão dos microRNAs (qPCR)

Para as análises de expressão dos microRNAs, as reações foram feitas em duplicatas utilizando como sistema de detecção o sistema *TaqMan[®] MiRNA assay* (Invitrogen[®]), que apresenta uma sonda que reconhece sequências específicas em fragmentos de PCR. Durante a qPCR a sonda *TaqMan[®]* hibridiza com a sequência da fita simples complementar e ocorre a amplificação. O equipamento utilizado foi o *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems[®]). A Tabela 10 apresenta o protocolo de reação utilizado para a análise da expressão dos microRNAs selecionados e a Tabela 11 mostra a ciclagem referente ao processo.

Tabela 10: Protocolo de reação para análise da expressão dos microRNAs.

Reagente	Volume (uL)
<i>TaqMan</i> Universal PCR Master Mix	5,0 uL
Água <i>Nuclease free</i>	0,5 uL
<i>TaqMan</i> [®] <i>microRNA assay</i> (50 RT)	0,5 uL
cDNA (2,5 ng/uL)	4,0 uL
Volume da reação	10,0 uL

Tabela 11: Protocolo de ciclagem da etapa de expressão dos microRNAs.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Início	95 °C	10 min
40 ciclos	95 °C	15 seg
	60 °C	1 min

Os resultados da expressão foram analisados a partir da curva de amplificação gerada pela emissão de fluorescência, utilizando os valores de CT (*threshold cycle*). O valor de CT consiste na intersecção entre uma curva de amplificação e uma linha de limiar (*threshold*). Ela é uma medida relativa da concentração da sequência alvo na reação de PCR. O CT é inversamente proporcional ao nível de expressão relativa original do fragmento de interesse. Para a normalização dos dados de expressão dos miRNAs específicos, foram testados miRNAs endógenos a fim de identificar aquele que apresenta melhor expressão nos reticulócitos.

3.3.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos softwares *Statistica 8.0* (StatSoft[®]), *GraphPad Prism* versão 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) e *Estatística R* versão 3.1.1 (<http://www.r-projet.org>). Foram analisadas a normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica. Para a comparação dos níveis de expressão dos miRNAs entre os grupos foram utilizados os testes ANOVA *one-way* complementado por Tukey, para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis complementado por Dunn para os

dados não paramétricos. Para averiguação de relações entre a expressão dos miRNAs dentro de cada grupo de estudo e com os níveis de Hb F, foram realizadas análises de correlação de Spearman (dados não paramétricos). Para tanto, foram consideradas as correlações que apresentaram coeficiente de correlação igual ou superior a 70% ($\rho \geq 0,70$). Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos grupos de beta-hemoglobinopatias

4.1.1 Anemia Falciforme

Conforme descrito na casuística do trabalho, os indivíduos com anemia falciforme foram agrupados de acordo com os níveis de Hb F (inferiores a 5% e superiores a 8%) e com uso de medicação específica. Por apresentarem características diferentes em relação a esses dois parâmetros, esses grupos também diferiram no que diz respeito ao regime transfusional, terapia quelante e complicações clínicas. Todas as informações acerca dessas ocorrências foram obtidas a partir de consulta aos prontuários individuais e questionário aplicado no momento da assinatura do TCLE.

Os indivíduos com anemia falciforme sem uso de HU, com níveis de Hb F inferiores a 5% do total de hemoglobinas, estavam em regime transfusional regular de troca de hemácias (30 dias) e em uso diário de quelante de ferro (Exjade[®]), com exceção de um dos pacientes. Em relação às manifestações clínicas, todos os indivíduos, com exceção de um deles, haviam sofrido um ou mais episódios de acidente vascular encefálico (AVE), sendo essa a complicação clínica mais frequente nesse grupo de pacientes. Esses indivíduos também apresentaram osteonecrose (1 indivíduo), úlcera de perna recorrente (1 indivíduo) e sobrecarga de ferro hepática grave (T2* 1,88 ms) (1 indivíduo).

O grupo com anemia falciforme em uso de HU, com níveis de Hb F superiores a 8%, foi composto por indivíduos que não estavam em regime transfusional regular e não faziam uso de quelante de ferro. Dentre as ocorrências clínicas, 40% dos indivíduos (4 pacientes) apresentaram úlcera de perna (já cicatrizada ou recorrente), sendo essa a manifestação clínica mais frequente nesses pacientes. Em menor frequência, esses indivíduos apresentaram osteonecrose (2 pacientes), AVE (2 pacientes) e hepatite C (2 pacientes). A Figura 7 ilustra o perfil dos grupos com anemia falciforme em relação ao tratamento e características clínicas.

As informações genéticas e as características do tratamento e das manifestações clínicas dos indivíduos com anemia falciforme estão em anexo (Anexo 1).

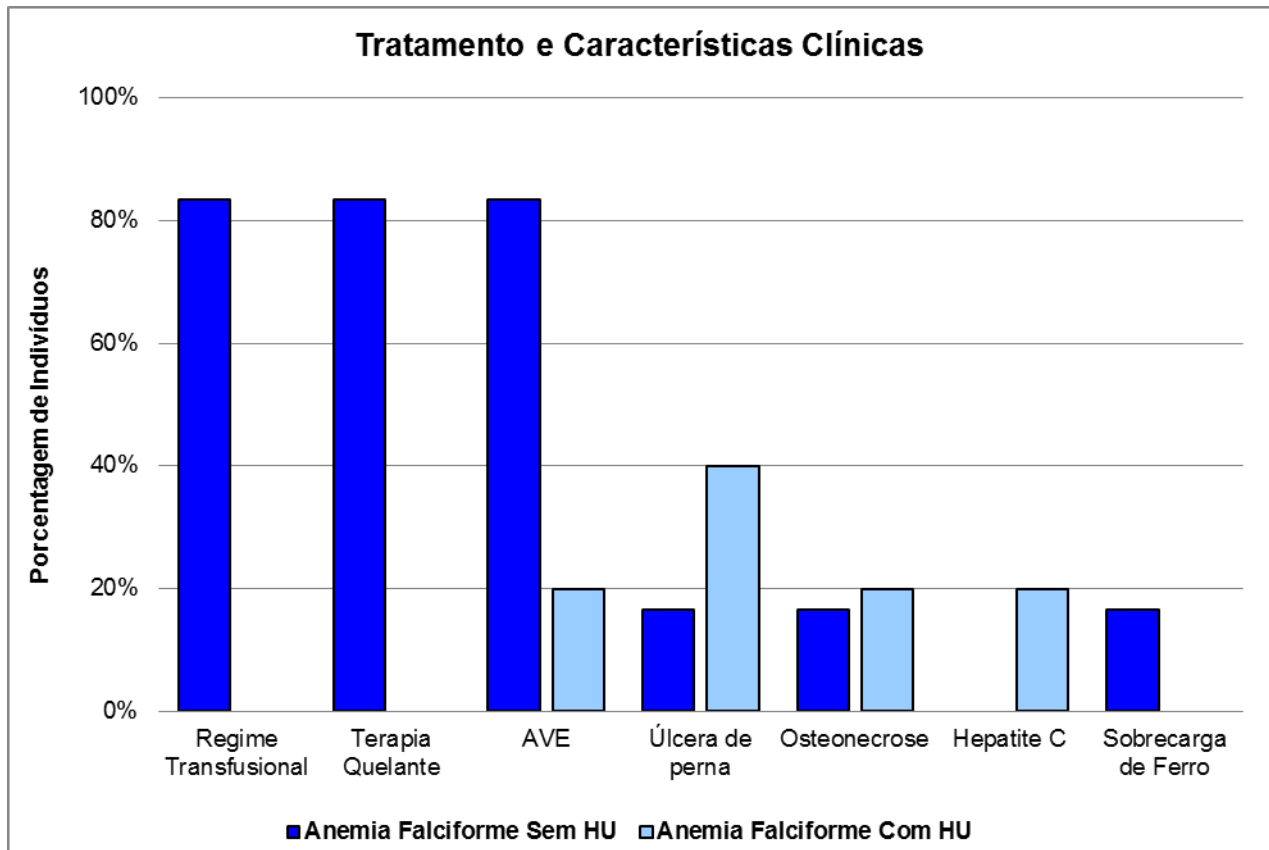


Figura 7: Perfil das complicações clínicas e tratamento apresentado pelos indivíduos com anemia falciforme em uso e não uso de hidroxiureia (HU). AVE: acidente vascular encefálico.

4.1.2 Talassemia Beta

Todos os indivíduos com talassemia beta foram submetidos à análise molecular para definição da mutação presente, uma vez que a presença ou ausência do alelo β^0 caracterizou um dos critérios de inclusão utilizados para esse grupo. Foram genotipados, no total, 25 indivíduos com talassemia beta. Dos 50 cromossomos submetidos à caracterização molecular, 36 (72%) apresentaram 11 mutações em diferentes regiões do gene da β -globina. A maioria das mutações foi encontrada em regiões de íntron (45,45%), seguido por mutações na região codificante (27,27%), região promotora (18,18%) e 5'-UTR (9,1%). Para 14 alelos (28%) a mutação de talassemia beta não foi definida. A Tabela 12 apresenta as mutações identificadas nas diferentes regiões sequenciadas, bem como o fenótipo e a população de origem relacionada às mutações.

No grupo avaliado, a mutação IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C) foi a mais frequente (24%), seguida pelas mutações IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A) (12%), IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A) e CD39 (HBB:c.118C>T) (ambas com frequência de 8%). As demais

mutações foram encontradas em menos de 5% dos alelos. A Figura 8 ilustra a frequência alélica das diferentes mutações encontradas no grupo amostral avaliado.

Tabela 12: Mutações de talassemia beta identificadas na população de talassêmicos do Rio de Janeiro.

Gene β -globina	Mutação	Fenótipo	Origem Étnica*
Promotor	- 29 (HBB:c.-79A>G)	β^+	Afro-americana e Chinesa
	- 88 (HBB:c.-138C>T)	β^+	Afro-americana e Asiático-Indiana
5' UTR	+20 (HBB:c.-31C>T)	β^+	Mediterrânea**
Éxon	CD15 (HBB:c.48G>A)	β^0	Portuguesa
	CD24 (HBB:c.75T>A)	β^+	Afro-americana, Japonesa
	CD39 (HBB:c.118C>T)	β^0	Mediterrânea
Íntron	IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A)	β^0	Asiático-Indiana, Mediterrânea
	IVSI-5 (HBB:c.92+5G>A)	β^+ grave	Mediterrânea
	IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C)	β^+	Mediterrânea
	IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A)	β^+	Mediterrânea
	IVSII-745 (HBB:c.316-106C>G)	β^+	Mediterrânea

Legenda: UTR: região transcrita e não traduzida. β^+ : redução da síntese de cadeia β -globina. β^0 : ausência da síntese de cadeia β -globina.

* Informações obtidas no site Globin Gene Server (<http://globin.bx.psu.edu/>).

** Por estar associada à mutação IVSII-745 (C>G), a mutação 5'-UTR + 20 (C>T) seja, provavelmente, de origem mediterrânea.

As mutações encontradas nos talassêmicos analisados em nosso estudo refletem o perfil de mutações mais frequentes no Brasil. Relatos da literatura mostraram que a mutação IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C) é a mais frequente em indivíduos com talassemia beta da região nordeste do país, seguida pela mutação IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A) (ARAÚJO et al., 2003; ROCHA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2011). Ao contrário, a mutação CD39 (HBB:c.118C>T) é a mais frequente nas regiões sudeste e sul, seguida pela mutação IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A) (COSTA et al., 1990; MARTINS et al., 1993; FONSECA et al., 1998; REICHERT et al., 2008). Nos indivíduos avaliados em nosso trabalho, provenientes do estado do Rio de Janeiro, a mutação IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C) foi mais frequente do que a mutação característica da região sudeste (HBB:c.118C>T). Esse resultado também foi encontrado em indivíduos talassêmicos do estado de São Paulo (FERNANDES et al., 2011), mostrando que, ainda que as mutações de talassemia beta no Brasil apresentem

aspecto regional, a heterogeneidade da população pode evidenciar diferentes perfis mutacionais. A Tabela 13 traz uma comparação entre a frequência das principais mutações de talassemia beta em diferentes localidades brasileiras.

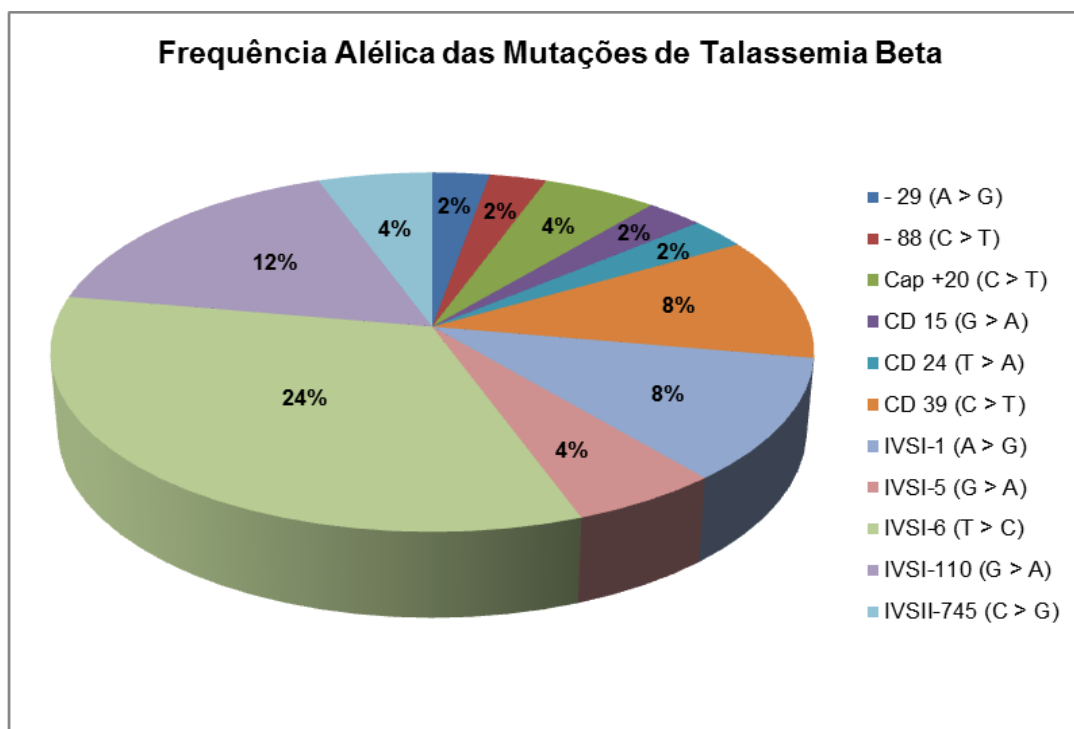


Figura 8: Frequência alélica das mutações encontradas no grupo de indivíduos com talassemia beta.

Tabela 13: Frequência das principais mutações de talassemia beta em diferentes localidades do Brasil.

Localidades	Mutações			
	CD39 (C > T)	IVSI-110 (G > A)	IVSI-6 (T > C)	IVSI-1 (G > A)
Ribeirão Preto – SP ¹	47%	15%	27%	-
Campinas – SP ²	64,3%	20%	7,1%	5,7%
São Paulo – SP ³	54,3%	18,6%	18,6%	4,3%
São Paulo – SP ⁴	17,0%	12,0%	31,0%	10,0%
Fortaleza – CE ⁵	21,4%	-	35,7%	14,3%
Recife – PE ⁶	3,5%	8,2%	62,8%	15,1%
Rio Grande do Norte ⁷	-	5,1%	53,8%	38,5%
Porto Alegre – RS ⁸	50,9%	18,1%	9,5%	12,9%
Rio de Janeiro ⁹	8,0%	12,0%	24,0%	8,0%

¹ Costa et al., 1990; ² Martins et al., 1993; ³ Fonseca et al., 1998; ⁴ Fernandes et al., 2011; ⁵ Rocha et al., 2010;

⁶ Araujo et al., 2003; ⁷ Silveira et al., 2011; ⁸ Reichert et al., 2008; ⁹ Presente estudo.

Dentre as demais mutações encontradas em nosso grupo amostral, algumas já foram identificadas na população brasileira. As mutações IVSI-5 (HBB:c.92+5G>A), de origem mediterrânea, -29 (HBB:c.-79A>G), muito frequente em populações afro-americanas, e CD15 (HBB:c.48G>A), de origem portuguesa, foram relatadas, com baixa frequência, em talassêmicos da região sul do país (REICHERT et al., 2008). Essas mutações também foram pouco frequentes nos indivíduos talassêmicos do nosso estudo (2% e 4% dos alelos). As mutações IVSII-745 (HBB:c.316-106G>C) e 5'-UTR Cap +20 (C>T) são, geralmente, encontradas em associação (YAVARIAN et al., 2001; ROPERO et al., 2013). Na população brasileira, Fattori e colaboradores (2012) identificaram a presença da mutação 5'-UTR Cap +20 (C>T) não associada à mutação IVSII-745 (HBB:c.316-106G>C). Ao contrário, nossos achados corroboram a associação dessas mutações.

As mutações -88 (HBB:c.-138C>T) e CD24 (HBB:c.75T>A) não apresentam relato de ocorrência na população brasileira. Ambas as mutações são frequentes em populações afro-americanas. Estudos realizados com indivíduos da Geórgia, Carolina do Sul e Alabama, nos Estados Unidos, mostraram frequência de 21% para a mutação -88 (HBB:c.-138C>T) e 8% para a mutação CD24 (HBB:c.75T>A) (GONZALEZ-REDONDO et al., 1988). Nos talassêmicos avaliados nesse trabalho, ambas as mutações foram encontradas em heterozigose em indivíduos com talassemia beta intermediária. Essas mutações foram pouco frequentes (2% dos casos), mas reforçam a participação de africanos na formação da nossa população não apenas na herança de mutações características desses povos como, por exemplo, a mutação β^S , mas também das mutações que conferem a talassemia beta, e evidenciam a heterogeneidade das mutações que caracterizam a talassemia beta no Brasil. A Figura 9 ilustra os eletroferogramas que evidenciam a presença dessas mutações.

O polimorfismo *Xmn*I (γ^G - 158 C > T) e o padrão de haplótipos β -Tal foram investigados. Dentre os indivíduos analisados, cinco (10%) apresentaram o polimorfismo *Xmn*I em heterozigose (três com talassemia beta intermediária e dois com talassemia beta maior). Em relação aos haplótipos β -Tal, 50,2% apresentaram padrão típico de combinação e 49,8% apresentaram padrão atípico. Dentre os padrões típicos foram observados o haplótipo I (30,2%), haplótipo III (8%) e haplótipo V (12%). Foram encontrados os padrões atípicos Atp 1 (8,25%), Atp 2 (17,8%), Atp 3 (14%), Atp 4 (4%) e Atp 5 (5,75%). A Tabela 14 mostra as combinações polimórficas encontradas nos indivíduos talassêmicos analisados.

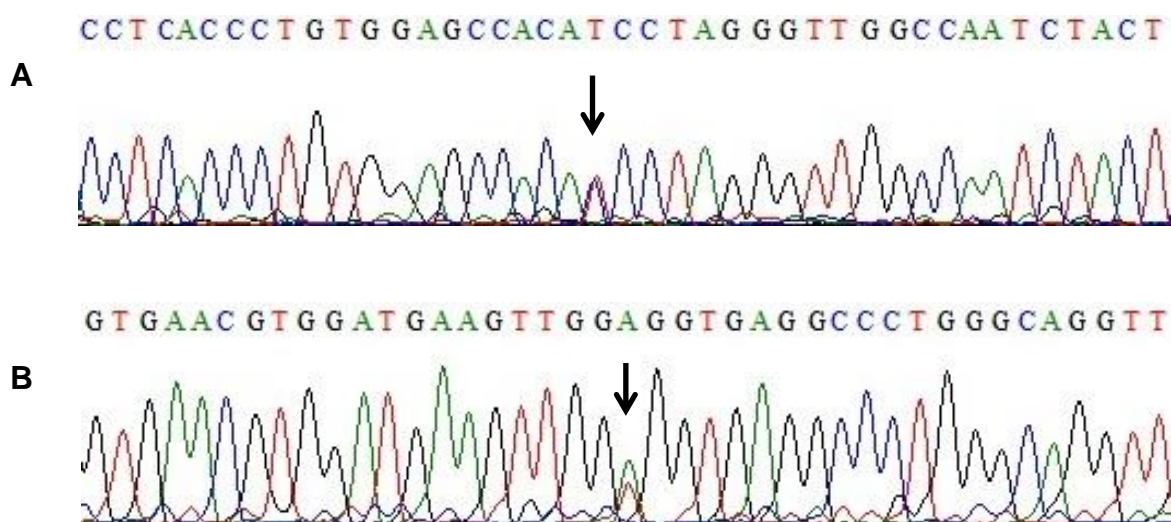


Figura 9: Eletroferogramas provenientes do sequenciamento genômico dos indivíduos com talassemia beta. As setas evidenciam as mutações -88 (HBB:c.-138C>T) (A) e CD24 (HBB:c.75T>A) (B) em heterozigose.

Tabela 14: Caracterização dos haplótipos β -Tal identificados nos indivíduos com talassemia beta.

Haplótipo β -globina	<i>Hind III</i>		<i>Hinc II</i>		<i>Ava II</i>	<i>BamH I</i>
	γ^G	γ^A	$\Psi\beta$	3' $\Psi\beta$	β	3' β
I	-	-	-	-	+	+
III	+	-	+	+	+	-
V	-	-	-	-	+	-
Atp 1	+	+	-	+	+	-
Atp 2	+	+	-	-	+	+
Atp 3	+	+	-	-	+	-
Atp4	+	-	-	+	+	+
Atp 5	-	-	-	+	+	-

Legenda: Atp = padrão atípico; (+) presença do sítio polimórfico; (-) ausência do sítio polimórfico.

Complicações clínicas dos indivíduos com talassemia beta

A consulta dos prontuários médicos foi realizada apenas para os 12 indivíduos que compararam à convocação de coleta de amostra. Os indivíduos com talassemia beta β^0 e β^+ apresentaram diferenças nas características clínicas, dentre elas o regime transfusional, sobrecarga de ferro tecidual e outras complicações clínicas. Todas as informações acerca dessas ocorrências foram obtidas a partir de consulta aos prontuários individuais, informações do médico responsável pelo acompanhamento clínico desses pacientes e questionário aplicado no momento da assinatura do TCLE.

Todos os indivíduos com talassemia beta β^0 foram clinicamente classificados com talassemia beta maior, estavam em regime de hipertransfusão quinzenal e em uso diário de quelante de ferro (Ferriprox[®] ou Exjade[®]). Em relação às manifestações clínicas, todos os indivíduos apresentaram sobrecarga de ferro hepática, com exceção de um deles que, após oito anos de terapia quelante regular, não apresenta sobrecarga de ferro. Os pacientes também apresentaram deformidade óssea (4 indivíduos), esplenomegalia ou esplenectomia (4 indivíduos), sobrecarga de ferro cardíaca (3 indivíduos) e osteoporose (2 indivíduos).

No grupo com talassemia beta β^+ , três indivíduos foram clinicamente classificados com talassemia beta intermediária e um com talassemia beta maior. Dois indivíduos estavam em regime transfusional regular (15 e 20 dias). Todos eles apresentaram sobrecarga de ferro hepática, ausência de sobrecarga de ferro cardíaca e presença de esplenomegalia ou esplenectomia. Dentre as demais ocorrências clínicas foram verificadas úlcera de perna (50%), deformidades ósseas e osteoporose (25%). A Figura 10 ilustra o perfil dos grupos com talassemia beta em relação ao tratamento e características clínicas.

As informações genéticas e as características do tratamento e das manifestações clínicas estão em anexo (Anexo 2).

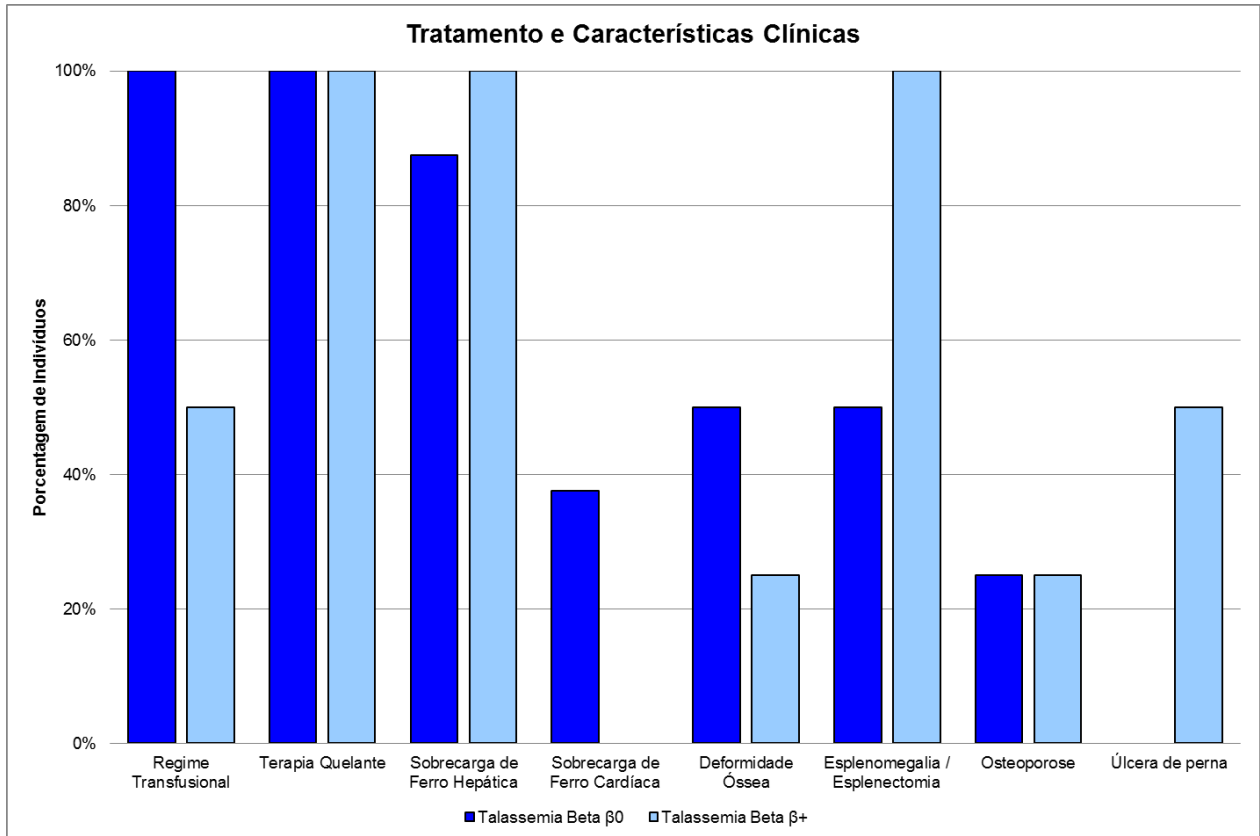


Figura 10: Perfil das complicações clínicas e tratamento apresentado pelos indivíduos com talassemia beta β^0 e talassemia beta β^+ .

4.2 Análise *in silico* dos elementos de regulação por meio de Genômica Comparativa

A comparação das sequências genômicas de *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Pongo abelli*, *Callitrix jacchus*, *Cebus apella* e *Tarsius syrichta* revelou níveis de conservação acima de 70% em pelo menos 100 pb na análise dos genes da γ -globina. O padrão de similaridade observada para as regiões codificantes (éxons, em azul) reflete uma situação esperada para a comparação entre as espécies escolhidas, visto que essas sequências são responsáveis pela codificação de proteínas específicas e importantes para o desenvolvimento do organismo. O elevado grau de similaridade observado para as regiões não codificantes (íntrons, em rosa) sugere a existência de funcionalidade conservada entre as espécies comparadas. Regiões não codificantes que apresentam taxas elevadas de conservação podem indicar possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição específicos (ANGUITA et al., 2002; TOUCHMAN et al., 2001; FRAZER et al., 2004; BOFELLI et al., 2004). Assim, essas regiões neutras podem refletir função importante no que diz respeito à regulação dos genes da γ -globina.

Além disso, os resultados mostraram que o grau de conservação observado entre as espécies analisadas diferiu para cada gene, sendo que o gene *HBG1* (γ^A -globina) apresentou maiores níveis de conservação das regiões não codificantes. A Figura 11 apresenta os resultados gráficos fornecidos pelo pacote VISTA na comparação das sequências.

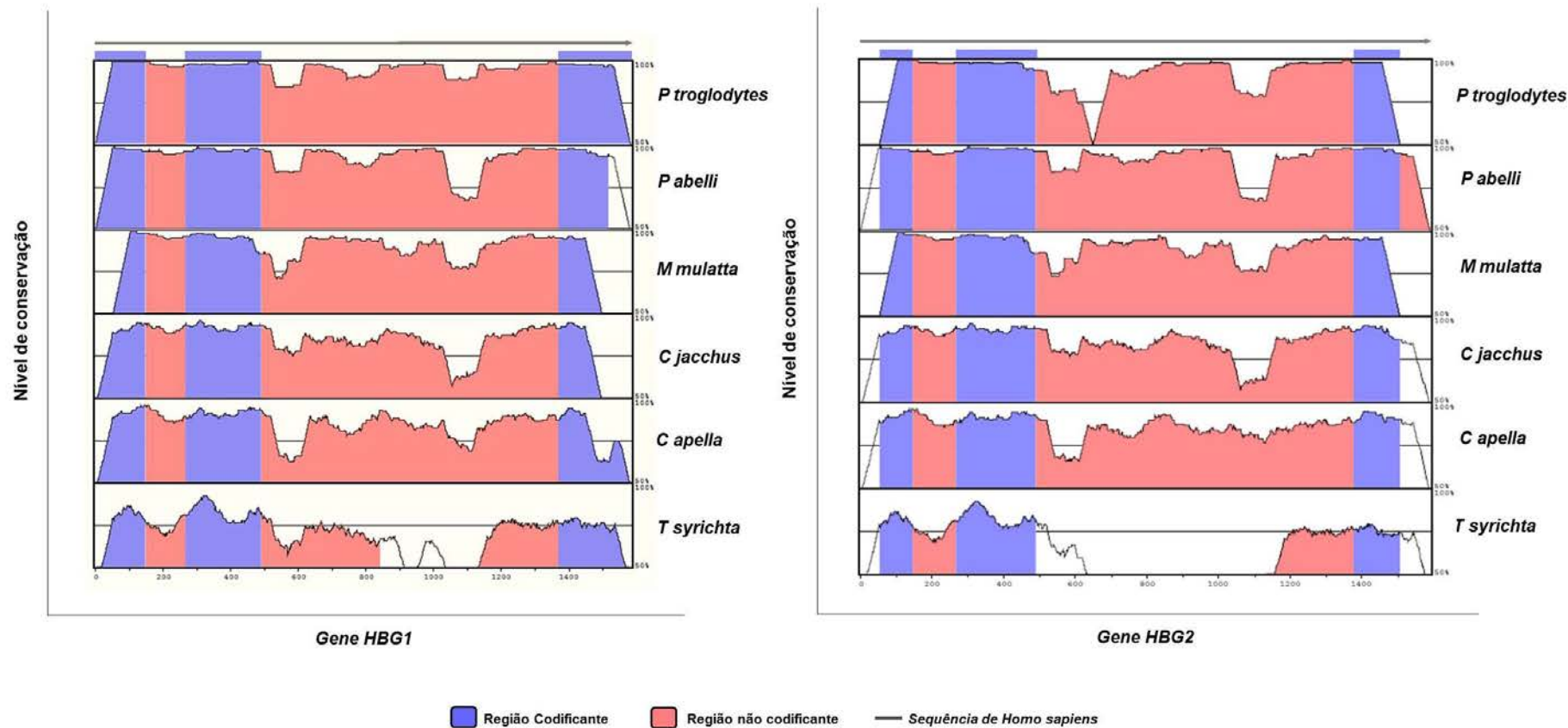


Figura 11: Plots obtidos a partir das análises de comparação das sequências codificantes e não codificantes dos genes da γ -globina. São apresentadas as comparações entre as sequências genômicas dos genes γ^A -globina (*HBG1*) e γ^G -globina (*HBG2*) de *Homo sapiens* (seta em cinza), *Pan troglodytes* (linha 1), *Pongo abelli* (linha 2), *Macaca mulatta* (linha 3), *Callithrix jaccus* (linha 4), *Cebus apella* (linha 5) e *Tarsius syrichta* (linha 6), mostrando o padrão de “picos e vales”. Em azul estão representadas as regiões codificantes (éxons) dos genes e em rosa as regiões não codificantes (íntrons). Os resultados indicam conservação das sequências não codificantes superiores a 70% em determinados segmentos, sugerindo funcionalidade para tais regiões dos genes analisados.

A análise de footprinting filogenético e o rastreamento dos fatores de transcrição baseado no banco de dados TRANSFAC revelaram 354 motifs conservados nas regiões não codificantes do gene *HBG1* e 231 motifs conservados no gene *HBG2* entre as sete espécies analisadas. Após a análise de informações da literatura acerca da função e do envolvimento de cada um dos fatores de transcrição na modulação dos níveis de Hb F, foi possível elencar 13 elementos envolvidos na regulação do gene γ^A -globina e 10 elementos associados com a regulação do gene γ^G -globina.

Os 10 fatores de transcrição candidatos à regulação de ambos os genes γ são CDC5, c-MYB, CP2, GATA-1, GATA-2, NF-E2, NF-Y, RUNX-1, TAL-1, e YY1. Três outros fatores (BP1, COUP-TFII e PAX-1) estão envolvidos na regulação do gene γ^A -globina, mas não na regulação do gene γ^G -globina. Dentre os elementos destacados em nossas análises, alguns deles se comportam como ativadores transcricionais dos genes γ e atuam como reguladores positivos da expressão da Hb F. Ao contrário, alguns elementos reguladores atuam como repressores transcricionais e outros fatores formam complexos proteicos que atuam na regulação dos genes das globinas. Há também fatores de transcrição que atuam indiretamente na regulação dos genes da γ -globina.

GATA-2 e TAL-1 são ativadores transcricionais dos genes γ -globina. GATA-2 (*GATA binding protein 2*) é expresso durante os estágios iniciais dos precursores eritróides e parece estar envolvido em processos como a auto-renovação, proliferação e sobrevivência celular. Alguns trabalhos mostraram que a família gênica da β -globina tem 16 sítios de ligação conservados para o fator de transcrição GATA e que a maioria desses sítios está localizada na LCR (*locus control region*). Além disso, apenas os genes ϵ -globina e γ -globina apresentam sítios de ligação para GATA, que são ausentes nos genes δ -globina e β -globina (IKONOMI et al., 2000). TAL-1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*) participa da formação do looping de cromatina entre a LCR e os genes γ -globina e atua recrutando proteínas importantes para esse processo, tais como Ldb1 e LMO2 (YUN et al., 2014). Por promover a interação entre os genes e a região reguladora da expressão das globinas, TAL-1 atua como um ativador da expressão da Hb F.

Alguns ativadores dos genes da γ -globina estão envolvidos com mutações de PHHF. Quando combinado com DNMT1, RAP74 e SNEV, CDC5 (*cell division cycle-5*) pode ligar-se a mutação pontual -198 (T > C) (PHHF não deletional de origem britânica) na região promotora do gene γ^A -globina, cujos níveis de Hb F na presença dessa mutação variam de 1.8% a 13% (OLAVE et al., 2007; GLOBIN GENE SERVER¹). Na PHHF não deletional de origem brasileira (γ^A -195 C>G), PAX-1 (*paired box 1*) é capaz de se ligar à

¹ Globin Gene Server. Human Hemoglobin Mutations. Hb Var: A database of human hemoglobin variants and thalassemia. Disponível em <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>.

sequência TTCCGC na região promotora do gene *HBG1* apenas na presença da mutação, fato que indica que esse fator de transcrição pode desempenhar papel importante na ativação da expressão da Hb F (ROVERSI et al., 2010). A ligação desses fatores de transcrição em mutações pontuais que conferem níveis aumentados de Hb F pode indicar que esses elementos genéticos atuam como reguladores da Hb F.

BP1 (*beta protein 1*) e CP2 (*transcription factor CP2*) são ativadores transcricionais indiretos dos genes da γ -globina. BP1 reduz a expressão do gene β -globina em células da linhagem eritróide, tanto em fases iniciais da maturação celular como nas células maduras. Por sua ação como regulador negativo da expressão da hemoglobina adulta (Hb A), BP1 pode atuar como um fator ativador da Hb F (MPOLLO et al., 2006). CP2 está envolvido na ativação transcricional dos genes da α -globina e desempenha papel importante na troca de expressão das globinas por meio da formação de um complexo proteico com GATA-1 (NCBI²; BOSE et al., 2006). Juntamente com NF-E4 (*nuclear factor erythroid 4*), CP2 forma o complexo proteico heterodimérico SSP (*stage selector protein*), que está envolvido na expressão preferencial dos genes da γ -globina (ZHOU et al., 2004).

Por outro lado, c-MYB (*myeloblastosis viral oncogene homolog*), COUP-TFII (*chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II*) e GATA-1 (*GATA binding protein 1*) atuam como reguladores negativos dos níveis de Hb F. c-MYB regula a diferenciação dos progenitores eritróides (SOZA-RIED et al., 2010). Relatos da literatura mostraram que níveis elevados de c-MYB inibiram a expressão do gene da γ -globina em células K562 (BAUER et al., 2012), sugerindo que esse elemento seja um regulador negativo da expressão da Hb F. Aerbajinai e colaboradores (2009) usaram transfecção com siRNA para mostrar que o *knockdown* do fator de transcrição COUP-TFII resultou na indução da expressão dos genes γ durante a eritropoiese adulta. Além disso, COUP-TFII pode ligar-se ao fator de transcrição BCL11A, por meio dos motivos RID1 e RID2, e formar um complexo repressor que é capaz de ligar-se a sítios reguladores importantes dos genes da Hb F (CHAN et al., 2013). GATA-1 é essencial para a sobrevivência e maturação terminal dos precursores eritróides (IKONOMI et al., 2000). Em relação à regulação dos genes das globinas, GATA-1 está envolvido no silenciamento dos genes γ devido sua participação na formação de um complexo proteico repressor da Hb F, que inclui a associação com BCL11A, SOX6, FOG1 e NuRD (XU et al., 2010) e a associação com NF-Y, COUP-TFII e BCL11A (ZHU et al., 2012). Além disso, a perda de sítios de ligação

²National Center of Biotechnology Information. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

para GATA-1 na região promotora dos genes da γ -globina pode prevenir o silenciamento dos genes *HBG1* e *HBG2* (CHEN et al., 2008).

YY1 (*YY1 transcription factor*) atua ativando e reprimindo um número variável de genes por meio de modificações das histonas (NCBI). Relatos da literatura mostraram que YY1 é um repressor transcricional dos genes ϵ -globina e γ -globina (RAICH et al., 1995; ROVERSI et al., 2010). Na presença da PHHF não deletional brasileira (γ^A - 195 C>G), YY1 tem sua interação com a região promotora do gene *HBG1* diminuída, o que reduz, consequentemente, a atividade repressora exercida por esse fator de transcrição na expressão da Hb F (ROVERSI et al., 2010).

RUNX-1 (*runt-related transcription factor 1*) regula a expressão de genes específicos envolvidos no controle da hematopoiese como, por exemplo, *M-CSFR* (*macrophage colony-stimulating factor receptor*), *IL-3* (*interleukin 3*) e *MPO* (*myeloperoxidase*) (KUROKAWA, HIRAI, 2003; ROUMIER et al., 2003). O fator de transcrição NF-E2 (*nuclear factor erythroid 2*) é um elemento importante que regula a expressão gênica das globinas e atua no controle da síntese do grupo heme e na formação dos componentes da molécula de hemoglobina (BLANK et al., 1997; ANDREWS, 1998).

NF-Y (*nuclear transcription factor Y*) está envolvido tanto na ativação como na repressão dos genes γ . De maneira geral, NF-Y recruta GATA-2 para formar um complexo proteico que ativa a transcrição dos genes da γ -globina, e recruta BCL11A, GATA-1 e COUPTFII, que atuam na repressão da expressão desses genes (ZHU et al., 2012). Assim, o fator de transcrição NF-Y pode atuar na ativação e no silenciamento dos genes da Hb F, dependendo dos elementos reguladores que são recrutados.

A Figura 12 mostra os possíveis mecanismos de interação exercidos pelos fatores de transcrição selecionados a partir das análises *in silico* nos processos hematopoiéticos, eritropoiéticos e na regulação da expressão dos genes das globinas.

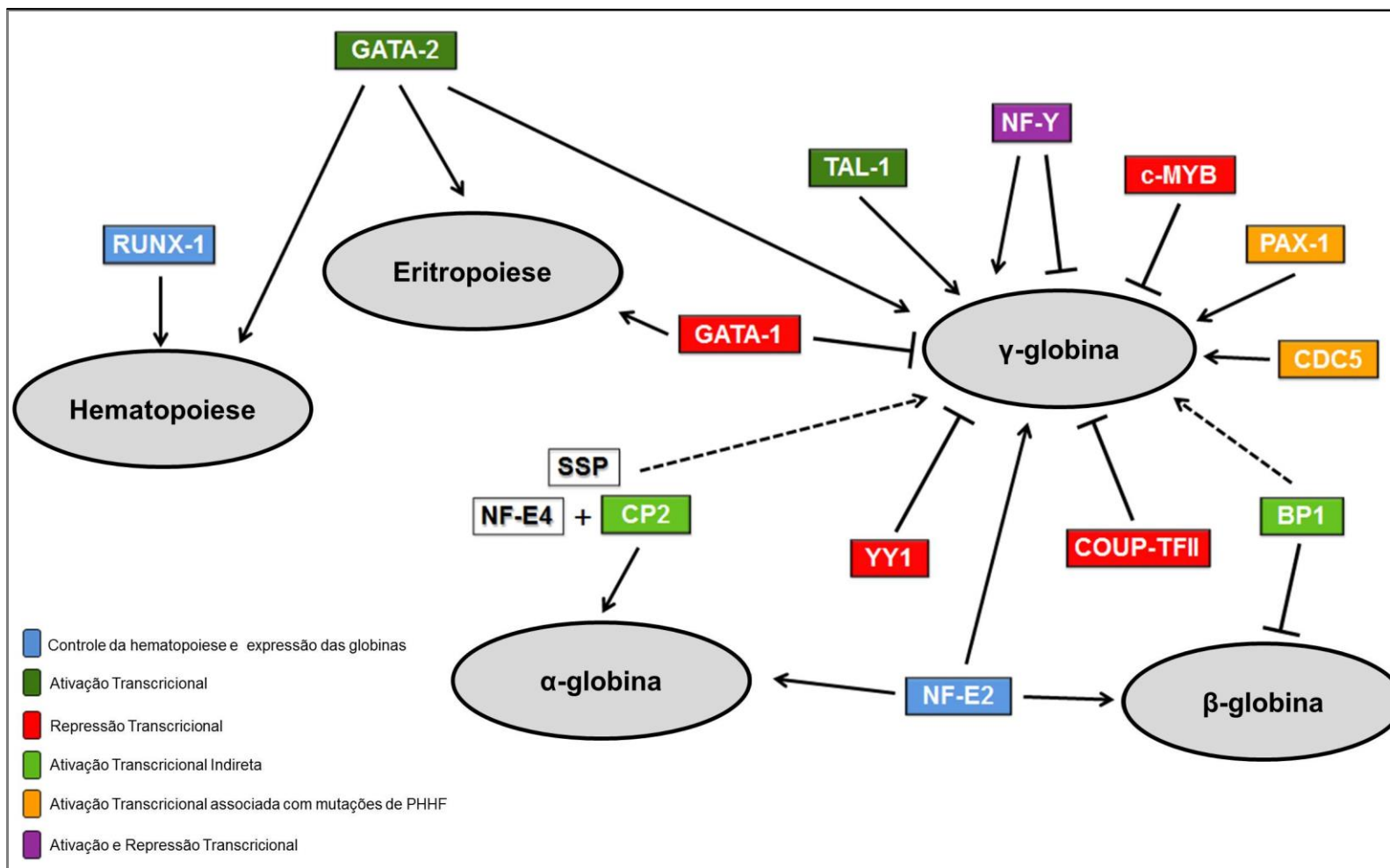


Figura 12: Representação da interação entre os fatores de transcrição e a regulação da hematopoiese, eritropoiese e expressão dos genes das globinas. Os 13 elementos selecionados nas análises *in silico* são mostrados. As setas contínuas indicam elementos que ativam a transcrição. As setas pontilhadas indicam ativadores indiretos. As barras mostram repressores transcricionais. As caixas brancas (NF-E4 e SSP) indicam fatores que formam complexos proteicos envolvidos na regulação. SSP = stage selector protein.

Além dos 13 fatores de transcrição indicados em nossas análises, outros elementos são conhecidos por regular a expressão dos genes da γ -globina dentre eles os membros da família Krüppel-like e NF-E4. KLF1 (*Krüppel-like factor 1*) é um repressor indireto da expressão dos genes γ . KLF1 ativa a expressão de BCL11A, um fator de transcrição muito conhecido como repressor chave da expressão da Hb F na vida adulta (TALLACK, PERKINS, 2010). KLF11 (*Krüppel-like factor 11*) é predominantemente expresso nas células da linhagem eritróide. Estudos mostraram que KLF11 pode atuar como ativador transcricional das globinas embrionária e fetal (ASANO et al., 1999). O fator de transcrição NF-E4, que faz parte do complex SSP juntamente com CP2, pode direcionar a LCR à região promotora dos genes da γ -globina e, assim, atuar na manutenção dos níveis de Hb F (ZHOU et al., 2000; ZHOU et al., 2004). Entretanto, esses fatores não foram conservados entre as espécies dos grupos Catarrhini e Platyrrhini. A comparação apenas entre os primatas do Novo Mundo e do Velho Mundo, sem o táxon Tarsidae, mostrou conservação desses fatores. Dessa forma, podemos inferir que esses elementos não exercem influência significativa na produção de Hb F em *T. syrichta*, uma vez que, nessa espécie, a hemoglobina fetal é expressa juntamente com a ϵ -globina, constituindo um cenário diferente do que ocorre nos outros primatas.

Nossos resultados corroboram com os relatos da literatura acerca da participação de inúmeros fatores genéticos na regulação dos genes da γ -globina. Muitos estudos já mostraram reguladores genéticos que podem fornecer informações promissoras para o desenvolvimento de estratégias eficientes na indução dos níveis elevados de Hb F (MENZEL et al., 2007; THEIN et al., 2007; LETTRE et al., 2008). Sankaran e Orkin (2013) realizaram uma revisão da literatura a respeito de elementos que atuam na troca de expressão das globinas Hb F para Hb A e mostraram que a maioria das moléculas envolvidas nesses processos são os fatores de transcrição. Nossos resultados mostraram que as regiões não codificantes do gene *HBG1* apresentam sítios de ligação para 13 fatores de transcrição conservados entre as espécies de primatas do Novo Mundo, do Velho Mundo e da família Tarsidae, um ramo basal da ordem Haplorrhini, enquanto o gene *HBG2* apresenta conservação para 10 elementos de regulação.

De maneira geral, o conhecimento dos elementos genéticos envolvidos na regulação dos genes da γ -globina fornecem embasamento para o estabelecimento de novas estratégias moleculares que podem ser utilizadas no tratamento de doenças em que os níveis aumentados de Hb F podem reduzir significativamente a gravidade das

manifestações clínicas e fornecer maior expectativa de vida para os indivíduos portadores dessas afecções.

Esses resultados foram compilados em um artigo científico intitulado “*Screening of Transcription Factors involved in Fetal Hemoglobin regulation using Phylogenetic Footprinting*”, aceito para publicação no periódico *Evolutionary Bioinformatics* (ISSN: 1176-9343; FI: 1,169). O artigo completo está disponível no Apêndice 1.

4.3 Análise *in silico* dos microRNAs envolvidos na regulação da Hb F

A partir das análises *in silico* e de informações da literatura sobre o envolvimento nos processos eritropoiéticos e na regulação das globinas, foram selecionados 20 microRNAs para análise da expressão. A Tabela 15 apresenta os elementos elencados para análise da expressão, bem como o número de identificação no banco de dados miRBase, a sequência madura e a localização cromossômica de cada microRNA.

Tabela 15: MicroRNAs preditos candidatos à regulação dos níveis de Hb F.

miR	ID- miRBase*	Sequência do miR maduro (5' > 3')	Cromossomo
hsa-miR-449a	MIMAT0001541	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU	5
hsa-miR-449b	MIMAT0003327	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC	5
hsa-miR-34a	MIMAT0000255	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	1
hsa-miR-34c-5p	MIMAT0000686	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	11
hsa-miR-137	MIMAT0000429	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	1
hsa-miR-214	MIMAT0000271	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	1
hsa-miR-501-5p	MIMAT0002872	AAUCCUUUGUCCCUGGGUGAGA	X
hsa-miR-760	MIMAT0004957	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA	1
hsa-miR-362-5p	MIMAT0004957	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAGU	X
hsa-miR-4795-3p	MIMAT0019969	AUAUUAUUAGCCACUUCUGGAU	3
hsa-miR-96	MIMAT0000095	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	7
hsa-miR-26b	MIMAT0000083	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	2
hsa-miR-151-3p	MIMAT0000757	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	8
hsa-miR-210	MIMAT0000267	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	11
hsa-miR-15a	MIMAT0000068	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	13
hsa-miR-16-1	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	13
hsa-miR-451	MIMAT0001631	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	17
hsa-miR-144	MIMAT0000436	UACAGUAUAGAUGAUGUACU	17
hsa-miR-221	MIMAT0000278	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	X
hsa-miR-222	MIMAT0000279	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	X

4.4 Relação entre os fatores de transcrição e os microRNAs rastreados *in silico*

Na tentativa de estabelecer uma possível relação entre os elementos de regulação selecionados nas análises *in silico*, utilizamos bancos de dados públicos (*TargetScan* e *microRNA.org*) na busca de informações a respeito da presença de sítios de ligação para os miRNAs na região 3'-UTR dos genes que codificam os fatores de transcrição indicados em nossa análise de *footprinting* filogenético.

A partir da busca em banco de dados de predição, verificamos que o fator de transcrição c-MYB apresenta sítios de ligação para os miR-34a, miR-34c-5p, miR-449a, miR-449b, miR-96, miR-15a, miR-16 e miR-137. YY1 apresenta sítios de ligação para quatro miRNAs (miR-34a, miR34c-5p, miR-449a e miR-449b) selecionados como candidatos à regulação da Hb F. Por sua atuação como repressor na expressão da γ -globina, a ação exercida por esses miRNAs na regulação de c-MYB e YY1 pode resultar, indiretamente, no aumento dos níveis de Hb F circulantes.

Os fatores de transcrição TAL-1, CP2 e PAX1 apresentam sítios de ligação para quatro miRNAs (miR-34a, miR34c-5p, miR-449a e miR-449b), dois miRNAs (miR-15a e miR-16) e um miRNA (miR-137), respectivamente. Esses fatores são conhecidos por seu papel na ativação transcricional, direta ou indireta, da γ -globina. Sendo assim, a ação repressora desses miRNAs nos três fatores de transcrição pode influenciar a participação dos moduladores genéticos que atuam positivamente na regulação da manutenção dos níveis de Hb F na vida adulta. Esses miRNAs também apresentam sítios de ligação no gene que codifica o fator de transcrição NF-Y. Por seu envolvimento na ativação e na repressão transcricional da γ -globina, a ação dos miRNAs exercida sob NF-Y pode modular os níveis de Hb F positiva ou negativamente.

As informações acerca da presença de sítios de ligação nos genes codificadores dos fatores de transcrição para os miRNAs selecionados como candidatos à regulação da Hb F pode indicar que a regulação da expressão da γ -globina também pode ocorrer por meio do silenciamento desses fatores, que deixam de participar de processos regulatórios acerca da ativação ou repressão transcricional da Hb F. A Figura 13 mostra a representação esquemática dos sítios de ligação para os miRs presentes nos genes que codificam os fatores de transcrição elencados em nossa análise *in silico*.

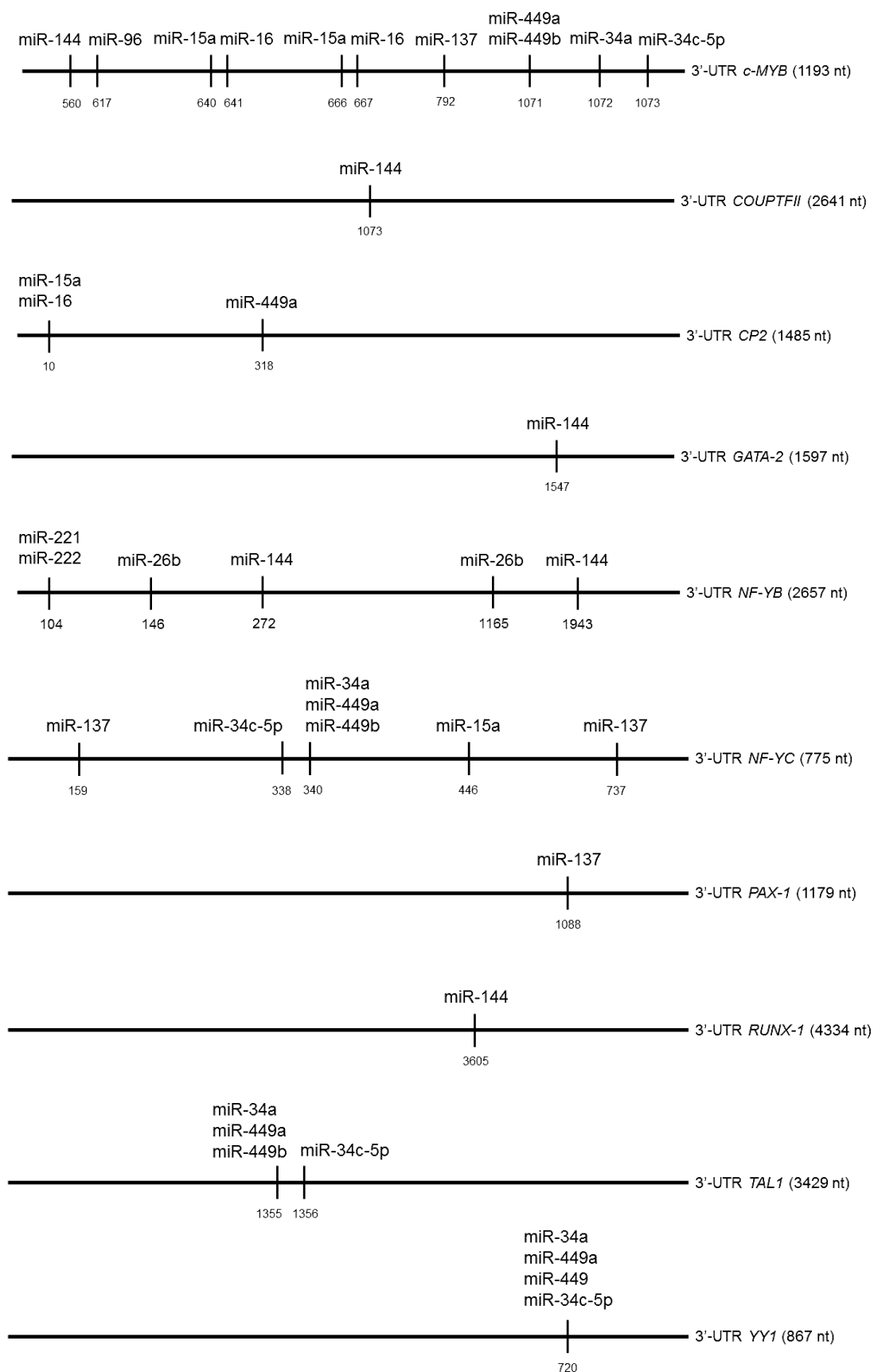


Figura 13: Representação esquemática dos sítios de ligação para miRNAs presentes nos genes que codificam os fatores de transcrição elencados nas análises de *footprinting* filogenético.

4.5 Análise da expressão dos microRNAs

Inicialmente, foram realizados experimentos piloto para definição de miRNAs endógenos utilizados na normalização dos dados de expressão dos miRNAs selecionados *in silico*. Foram testados oito miRNAs endógenos, dentre eles RNU24, RNU48, RNU44, RNU19, RNU6B, HY3, RPL21 e U47. De acordo com as análises, o miRNA endógeno mais expresso foi o HY3 e que apresentou os melhores resultados nas amostras testadas (dados não mostrados). A partir desses resultados, utilizamos o miR-HY3 para as etapas de normalização dos dados de expressão dos 20 miRNAs candidatos à regulação da Hb F.

Dentre os principais mecanismos celulares aos quais os elementos selecionados para a análise de expressão estão associados destacam-se o controle da proliferação e do ciclo celular, a eritropoiese, a hipóxia e o estresse oxidativo. Estes três últimos mecanismos estão intimamente relacionados à fisiopatologia das beta-hemoglobinopatias, uma vez que a eritropoiese é alterada nos indivíduos com talassemia beta e anemia falciforme, e a hipóxia e estresse oxidativo constituem fatores que interderem nos diferentes processos metabólicos envolvidos com essas afecções genéticas. A Tabela 16 resume os processos celulares aos quais os 20 miRNAs estão relacionados, bem como a relação com os fatores de transcrição elencados em nossas análises *in silico*, função e possíveis genes alvos desses reguladores genéticos.

As análises quantitativas mostraram que, dentre os 20 elementos avaliados, 14 miRNAs apresentaram expressão diferencial significativa entre os cinco grupos analisados: miR-144, miR-451, miR-221, miR-222, miR-210, miR-15a, miR-16-1, miR-26b, miR-151-3p, miR-362-5p, miR-760, miR-4795-3p, miR-449a e miR-449b. Para os miR-137, miR-214, miR-34a, miR-34c-5p, miR-96 e miR-501-5p não houve expressão diferencial entre os grupos avaliados (Anexo 3).

Tabela 16: Caracterização dos processos celulares, fatores de transcrição relacionados, função e genes alvos validados aos quais os 20 miRNAs analisados estão envolvidos.

Processo Celular	miRNA	Fator de Transcrição relacionado	Função	Genes Alvos Validados	Referência
Eritropoiese	miR-451	-	Maturação Eritróide	-	Rathjen et al., 2006. Dore et al., 2008. Fu et al., 2009.
	miR-144	c-MYB, COUPTF, GATA-2, NF-Y, RUNX-1			
	miR-221	NF-Y	Inibição da Maturação Eritróide	<i>Kit</i>	Felli et al., 2005
	miR-222				
	miR-15a	c-MYB, CP2, NF-Y	Inibição da produção de células eritróides	<i>c-Myb</i>	Zhao et al., 2009
	miR-16	c-MYB, CP2	Relação com marcadores de superfície de células eritróides	-	Choong et al., 2007
	miR-210	-	Maturação Eritróide	-	Kosaka et al., 2008
Hipóxia	miR-210	-	Expressão aumentada na hipóxia	-	Sarakul et al., 2013.
Estresse Oxidativo	miR-144	c-MYB, COUPTF, GATA-2, NF-Y, RUNX-1	Redução da capacidade antioxidante	<i>NR2F</i>	Sangkokoya et al., 2010.
Metabolismo do ferro	miR-210	-	Redução da Absorção do ferro	<i>TfR1</i>	Yoshioka et al., 2012.
	miR-26b	NF-Y	-	<i>Cox-2</i>	Yanhong et al., 2010.
Síntese de cadeias globínicas	miR-96	c-MYB	Inibição da Hb F	<i>HBG1</i> e <i>HBG2</i>	Azzouzi et al., 2011.
	miR-210	-	Indução da Hb F	-	Bianchi et al., 2009. Sarakul et al., 2013.
Proliferação e Ciclo Celular	miR-26b	NF-Y	Supressão tumoral	<i>Cdk8</i>	Li et al., 2014.
	miR-151-3p	-	Regulação do ciclo celular	<i>E2f6</i>	Roy-Chaudhuri et al., 2014.
	miR-760	-	Supressão tumoral	<i>HIST1H3D</i>	Iwaya et al., 2013.
	miR-4795	-	Supressão tumoral	-	Zhang e Li, 2012.
	miR-449a	c-MYB, CP2, NF-Y, TAL-1, YY1	Supressão tumoral	<i>HDAC1</i>	Noonan et al., 2009. Jeon et al., 2012.
	miR-449b	c-MYB, NF-Y, TAL-1, YY1			
	miR-34a	c-MYB, NF-Y, TAL-1, YY1	Supressão tumoral	<i>Myc</i>	Leucci et al., 2008.
	miR-34c-5p	c-MYB, NF-Y, TAL-1, YY1	Supressão tumoral	<i>Myc</i> e <i>Met</i>	Cannell e Bushell, 2010. Hagman et al., 2013.
	miR-137	c-MYB, NF-Y, PAX-1	Supressão tumoral	<i>Kit</i> e <i>Cox-2</i>	Cheng et al., 2014. Li et al., 2014.
	miR-214	-	Supressão tumoral	<i>FGFR1</i>	Chen et al., 2014.
	miR-362-5p	-	Oncogene	<i>CYLD</i>	Xia et al., 2014.
	miR-501-5p	-	Indução da replicação viral	<i>HBXIP</i>	Jin et al., 2013.

Em todas as análises realizadas, não observamos diferença na expressão dos miRNAs entre os grupos de anemia falciforme em uso de HU e sem uso de HU, mostrando que o uso dessa medicação específica não altera o perfil de expressão dos miRNAs avaliados nos pacientes com anemia falciforme. Embora a HU exerça efeitos benéficos em relação à melhora nos índices hematimétricos e aumento dos níveis de Hb F, o perfil de expressão de miRNAs preditos à regulação dos genes da γ -globina parece não ser alterado pelo uso de HU na anemia falciforme. No entanto, não podemos descartar a necessidade de informações a respeito da máxima dose tolerada (MDT) de HU utilizada pelos indivíduos com anemia falciforme. Uma vez que a dosagem empregada de HU pode variar de acordo com características físicas como, por exemplo, o peso corpóreo, é possível que a quantidade de HU utilizada pelos indivíduos possa ter influenciado os resultados obtidos na comparação entre os grupos com anemia falciforme avaliados nesse estudo.

Além disso, a grande maioria dos miRNAs analisados individualmente quanto à expressão, não mostrou diferença estatística entre o grupo controle e o grupo de talassemia beta β^0 . Esse resultado nos permite inferir que: 1) a ausência do gene da β -globina pode promover alteração no perfil de expressão dos miRNAs candidatos à regulação da Hb F, diferindo do perfil de expressão desses elementos em outros grupos com beta-hemoglobinopatias; e 2) a ocorrência de frequentes processos de transfusão sanguínea, que se faz necessária devido à gravidade da anemia na talassemia beta β^0 , pode mimetizar as características do grupo controle em relação à ausência de alteração nos genes das globinas, e resultar em perfis de expressão dos miRNAs semelhantes nesses grupos. Dessa forma, a ausência do gene β e a presença da Hb A proveniente da transfusão podem representar fatores reguladores de outros elementos de regulação de genes globínicos, alterando mecanismos existentes em condições em que a Hb adulta é produzida normalmente o gene da β -globina é funcional, mesmo na presença de mutações. Entre os demais grupos, as análises mostraram diferenças significantes na expressão dos 14 miRNAs citados anteriormente.

4.5.1 Expressão dos miRNAs envolvidos na eritropoiese

Dos 14 miRNAs diferentemente expressos entre os grupos avaliados, alguns apresentam relações bem estabelecidas com a eritropoiese, atuando em processos como, por exemplo, maturação e proliferação de células precursoras eritróides, expressão de genes globínicos e anucleação em células eritropóides maduras (BIANCHI et al., 2012). Os

miR-144, miR-451, miR-221, miR-222, miR-15a, miR-16 e miR-210 estão envolvidos nesses processos.

Os miR-144 e miR-451, codificados em uma mesma família de miRNA, são essenciais para a eritropoiese e constituem marcadores específicos das células eritróides (RATHJEN et al., 2006; DORE et al., 2008; FU et al., 2009). A expressão do *locus* miR-144/miR-451 é dependente do fator de transcrição GATA-1, importante para o desenvolvimento das células da linhagem eritróide e regulação de outros elementos fundamentais na diferenciação eritróide como, por exemplo, os fatores GATA-2 e KLF1 (KOLODZIEJ, 2008; FU et al., 2009).

Por seu importante envolvimento na formação de células eritróides maduras, níveis reduzidos dos miR-144 e miR-451 podem estar associados com diminuição da quantidade de eritrócitos e gerar, entre outras consequências, um quadro de anemia. Esse fato pode explicar os resultados encontrados em nossas análises, uma vez que os grupos controle e talassemia beta β^0 apresentaram maiores níveis de expressão desses miRNAs. Os indivíduos do grupo com talassemia beta β^0 estão em regime de hipertransfusão quinzenal, o que promove melhora das concentrações de eritrócitos e hemoglobina, resultando em redução do quadro anêmico, com presença de Hb A em níveis elevados e de Hb F próximo dos valores de normalidade (mediana de 2,35%). Dessa forma, os níveis de expressão dos miR-144 e miR-451 verificados nesse grupo não diferiram dos valores encontrados para o grupo controle.

Ao contrário, os níveis de expressão desses dois miRNAs foram significativamente menores nos grupos com anemia falciforme em uso ou não de HU. Nos indivíduos com talassemia beta β^+ apenas o miR-451 foi menos expresso em relação ao grupo controle e ao grupo de talassemia beta β^0 . Em conjunto, nossos achados nos permitem inferir que: 1) a menor expressão dos miR-144 e miR-451 nos grupos portadores de beta-hemoglobinopatias pode ter relação com o quadro anêmico, uma vez que indivíduos sem queixas de anemia ou redução da anemia, decorrente do frequente processo de transfusão sanguínea (talassemia beta β^0), apresentaram maiores níveis de expressão desses elementos de regulação; 2) a diferença nos níveis desses miRNAs entre os grupos de talassemia beta, β^0 e β^+ , sugerem a possível interferência da ausência de expressão do gene β no perfil de expressão de elementos candidatos à regulação de outros genes da família β -globina; e 3) a maior expressão desses miRNAs no grupo controle, com níveis de Hb F dentro dos valores de normalidade, e no grupo com talassemia beta β^0 , com níveis reduzidos de Hb F

circulantes devido à interferência do processo transfusional, em relação aos demais grupos, que expressam níveis aumentados de Hb F, pode indicar a participação desses elementos na regulação da expressão dos genes da γ -globina. A Figura 14 mostra a comparação dos níveis de expressão dos miR-144 e miR-451 nos grupos analisados.

Em camundongos, níveis reduzidos dos miR-144 e miR-451 culminaram em atraso no processo de maturação eritróide, esplenomegalia, anemia e hiperplasia medular (RASMUSSEN et al., 2010). Por outro lado, a superexpressão do miR-451 induz a diferenciação eritróide e maturação das células precursoras hematopoiéticas, sugerindo que a transfecção de vetores contendo esse miRNA em células precursoras pode representar uma estratégia na produção induzida de eritrócitos para o tratamento das beta-hemoglobinopatias (KOUHKAN et al., 2013).

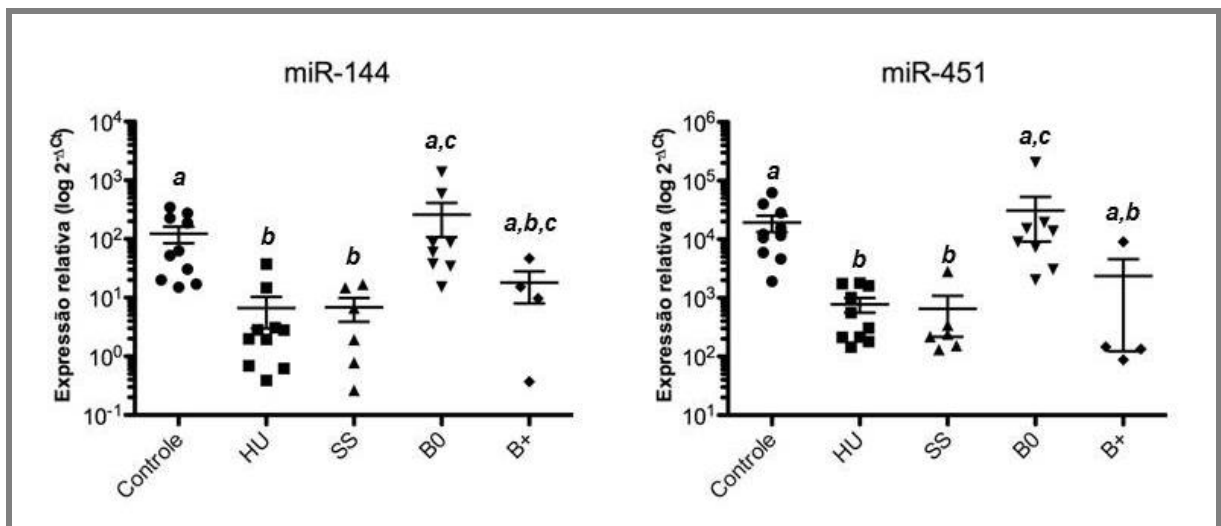


Figura 14: Expressão diferencial dos miR-144 e miR-451 entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey para o miR-144 ($p < 0,00001$), com diferença significativa entre GC x HU ($p = 0,000286$), GC x SS ($p = 0,002238$), B0 x HU ($p = 0,000202$) e B0 x SS ($p = 0,00117$). Teste estatístico Kruskal-Wallis complementado por Dunn para o miR-451 ($p < 0,00001$), com diferença significativa entre GC x HU ($p = 0,00332$), GC x SS ($p = 0,007714$), GC x B+ ($p = 0,018045$), B0 x HU ($p = 0,015765$), B0 x SS ($p = 0,026591$) e B0 x B+ ($p = 0,048373$).

Os miR-221 e miR-222 atuam indiretamente na inibição da eritropoiese via repressão da expressão do receptor Kit, um receptor tirosina-quinase expresso na superfície dos eritroblastos, que apresenta papel importante na auto-renovação e manutenção das células precursoras hematopoiéticas (KENT et al., 2008). Os níveis de expressão dos miR-

221 e miR-222 são elevados nas células progenitoras hematopoiéticas e são reduzidos durante a diferenciação e maturação das células eritropoiéticas. Baixos níveis desses miRNAs podem resultar em aumento da expressão do receptor Kit e, conseqüentemente, na proliferação das células eritróides. Estudos funcionais mostraram a participação dos miR-221 e miR-222 na inibição da eritropoiese normal, via manutenção de níveis reduzidos de expressão do receptor Kit (FELLI et al., 2005).

A regulação exercida pelos miR-221 e miR-222 nos níveis de expressão desse receptor também podem atuar na modulação dos níveis de Hb F. A indução da expressão de Kit em cultura de células eritróides revelou aumento nas concentrações de Hb F, indicando a existência de relação direta entre essas moléculas. Relatos da literatura revelaram que a superexpressão dos miR-221 e miR-222 em progenitores eritróides pode inibir o papel do receptor kit, atuando na manutenção de níveis diminuídos de Hb F (GABBIANELLI et al., 2010).

Nossas análises mostraram expressão diferencial do miR-221 entre o grupo controle e os demais grupos, com exceção do grupo com talassemia beta β^0 , e entre o grupo de talassemia beta β^0 com o grupo de anemia falciforme em uso de HU e talassemia beta β^+ . Esse resultado pode indicar a atuação desse miRNA na regulação dos níveis de Hb F, pois na presença de elevados níveis do miR-221 baixas concentrações de Hb F foram verificadas. Além disso, a maior expressão desse elemento de regulação na talassemia beta β^0 em relação à talassemia beta β^+ pode refletir o papel da ausência do gene β na alteração da expressão de fatores genéticos que atuam na regulação de genes presentes na família β -globina.

O miR-222 foi diferentemente expresso apenas entre os grupos controle e talassemia beta β^0 em relação ao grupo em uso de HU. A terapia com HU promove elevação dos níveis de Hb F, que estiveram relacionados à expressão reduzida dos miR-221 e miR-222. Juntos, esses achados sugerem a participação dos miR-221 e miR-222 na regulação dos genes da γ -globina, uma vez que a expressão desses elementos foi menor nos grupos que expressam maiores níveis de Hb F. No entanto, não podemos concluir, com base nesses resultados, se essa possível regulação ocorre diretamente ou de forma indireta nos genes da γ -globina, via ativadores da expressão da Hb F, como mostrado na literatura (GABBIANELLI et al., 2010). A Figura 15 evidencia a expressão diferencial dos miR-221 e miR-222 nos grupos amostrais analisados.

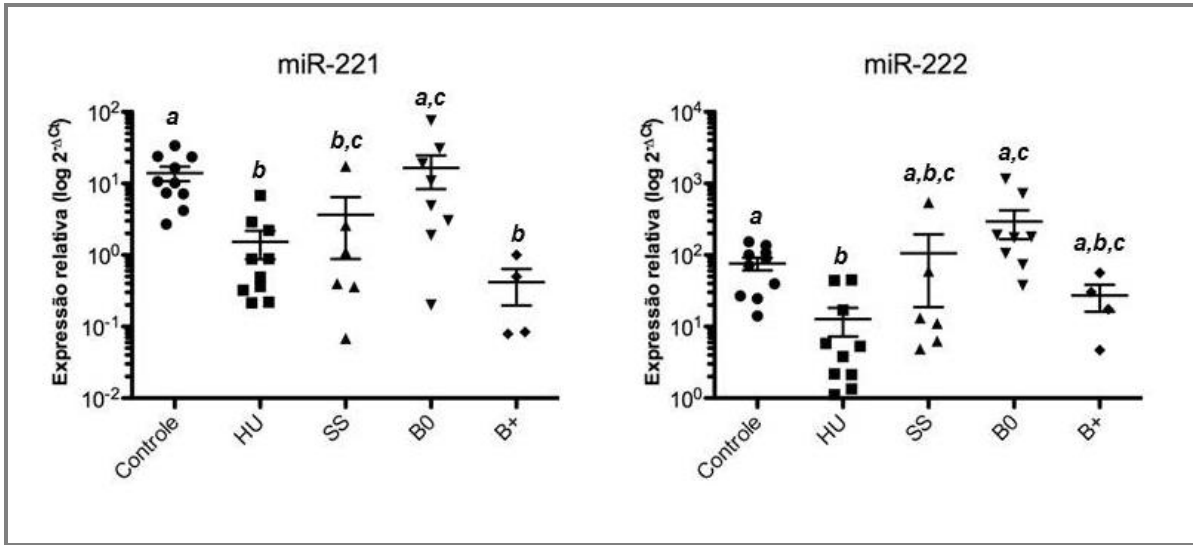


Figura 15: Expressão diferencial dos miR-221 e miR-222 entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey para o miR-221 ($p < 0,00001$), com diferença significativa entre GC x HU ($p = 0,001844$), GC x SS ($p = 0,012528$), GC x B+ ($p = 0,0000646$), B0 x HU ($p = 0,034237$) e B0 x B+ ($p = 0,005906$). Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey para o miR-222 ($p < 0,00001$), com diferença significativa entre GC x HU ($p = 0,001797$) e B0 x HU ($p = 0,000146$).

O miR-15a atua na hematopoiese por meio da regulação do gene *c-Myb*, importante no processo de desenvolvimento celular. A expressão do produto desse gene, c-MYB, é elevada nas células hematopoiéticas primitivas e reduzida nas células em estágio terminal de diferenciação (ROSSON; O'BRIEN, 1995). c-MYB também atua na progressão do ciclo celular das células hematopoiéticas. Estudos mostraram que células transfectadas com miR-15a tiveram bloqueio do ciclo celular na fase G1. Dessa forma, a expressão elevada do miR-15a pode regular o processo de ciclo celular nas células hematopoiéticas pelo efeito causado na expressão de c-MYB (ZHAO et al., 2009). A expressão aumentada do miR-15a promove inibição da formação de colônias de progenitores hematopoiéticos. Zhao e colaboradores (2009) mostraram que, após transfecção com *mimic-miR-15a*, uma biomolécula artificial que mimetiza a expressão desse elemento, houve redução da formação de colônias mielóides e eritróides, indicando a participação desse elemento de regulação na hematopoiese.

Relatos da literatura mostraram o envolvimento do miR-16 na regulação da progressão do ciclo celular. Níveis elevados desse miRNA bloquearam o ciclo celular na fase G0/G1 por meio da regulação negativa que esse elemento promoveu em genes alvos que atuam na transição das fases G0/G1 para a fase S (LINSLEY et al., 2007). Além disso,

esse miRNA foi relacionado positivamente à expressão de marcadores de superfície de células eritróides CD36, CD71 e CD235a e síntese de hemoglobina (CHOONG et al., 2007).

Os miR-15a e miR-16-1 também atuam indiretamente no aumento da expressão dos genes da γ -globina. Indivíduos que apresentam trissomia do cromossomo 13 mantêm níveis elevados de Hb F devido ao atraso na troca de expressão das cadeias γ -globina para β -globina. Sankaran e colaboradores (2011) verificaram que o aumento da expressão dos miR-15a e miR-16-1 e da Hb F na trissomia do cromossomo 13 são resultantes da regulação negativa que esses miRNAs exercem no gene *Myb*, cujo produto gênico, o fator de transcrição MYB, é conhecido por atuar negativamente no controle da expressão da γ -globina (JIANG et al., 2006).

Nossos resultados mostraram expressão diferencial desses elementos nos grupos analisados. O miR-15a foi mais expresso no grupo com talassemia beta β^0 em relação aos demais grupos com beta-hemoglobinopatias. No grupo com talassemia beta β^0 , o processo transfusional frequente exerce influência no aumento das concentrações de Hb A e, conseqüentemente, na baixa quantidade de Hb F circulante. Sendo assim, esse grupo apresenta redução dos níveis de Hb F em relação aos demais grupos portadores de beta-hemoglobinopatias. A expressão diferencial do miR-15a verificada nesses grupos pode refletir a mudança na expressão de reguladores genéticos de outros genes presentes na família β -globina mediada pela ausência do gene β . Além disso, os grupos que apresentaram maiores níveis de Hb F tiveram menores níveis de expressão desse miRNA, sugerindo o papel desse elemento na modulação da Hb F.

Os níveis de expressão do miR-16-1 foram diferentes entre o grupo controle e os demais grupos, exceto o grupo com talassemia beta β^0 , e entre o grupo com talassemia beta β^0 e os grupos com anemia falciforme, independente do uso de HU. De modo semelhante aos demais miRNAs, a expressão elevada do miR-16-1 nos grupos com menores níveis de Hb F circulantes em relação aos grupos com maiores níveis percentuais de Hb F sugere a participação desse elemento na modulação dos níveis dessa hemoglobina na vida adulta. De acordo com nossos resultados, não foi possível estabelecer se a via de atuação dos miR-15a e miR-16-1 está relacionada à regulação de outros fatores que influenciam, direta ou indiretamente, a expressão da Hb F. No entanto, podemos inferir que, na presença da anemia falciforme, independente do uso de HU, e na talassemia beta β^+ , esses elementos

têm níveis de expressão relativa reduzidos. A Figura 16 ilustra a comparação entre os níveis de expressão relativa dos miR-15a e miR-16-1, nos grupos avaliados.

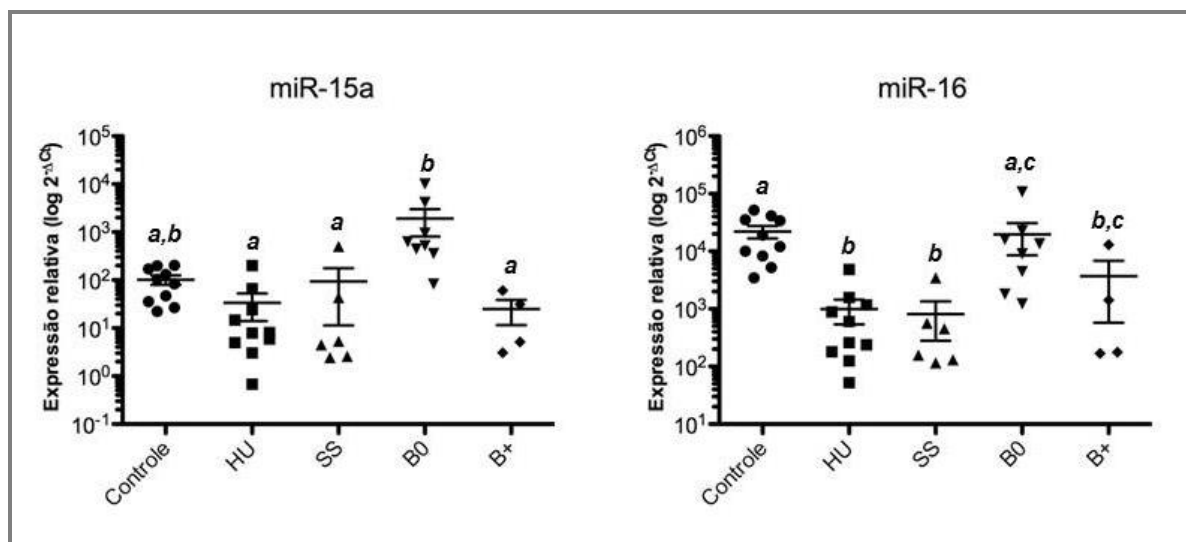


Figura 16: Expressão diferencial dos miR-15a e miR-16-1 entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey para o miR-15a ($p=0,000015$), com diferença significativa entre B0 x HU ($p=0,000147$), B0 x SS ($p=0,000482$) e B0 x B+ ($p=0,002498$). Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey para o miR-16-1 ($p<0,00001$), com diferença significativa entre GC x HU ($p=0,000138$), GC x SS ($p=0,000183$), GC x B+ ($p=0,008691$), B0 x HU ($p=0,000907$) e B0 x SS ($p=0,001721$).

O miR-210 tem papel importante na maturação eritróide. Níveis elevados desse miRNA foram verificados em células em estágio terminal da diferenciação celular, sugerindo a atuação do miR-210 na etapa de produção de eritrócitos. Em cultura de células *in vitro*, a estimulação por eritropoietina (EPO) resultou em aumento nos níveis de expressão desse elemento de regulação, indicando que a expressão do miR-210 pode estar envolvida em mecanismos celulares dependentes de EPO (KOSAKA et al., 2008). Nossos resultados mostraram aumento dos níveis desse miRNA em indivíduos sem queixas de anemia e em portadores de talassemia beta β^0 , que recebem transfusão sanguínea regularmente, mantendo níveis adequados de eritrócitos e hemoglobina. Dessa forma, podemos inferir que, por sua atuação na maturação das células eritróides, altos níveis do miR-210 possam estar relacionados à redução do quadro anêmico. Essa inferência é corroborada por nossos resultados, uma vez que indivíduos com anemia falciforme e talassemia beta β^+ , cujas concentrações de eritrócitos são reduzidas devido à própria

natureza da doença e nos quais os episódios de transfusão sanguínea são menos frequentes, apresentaram baixa expressão desse miRNA.

Na talassemia beta, a eritropoiese ineficaz, tem como consequência a diferenciação eritróide acelerada. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos que envolvem a diferenciação e maturação celular acelerada não estão totalmente estabelecidos (RIBEIL et al., 2013). Sendo assim, reforçamos, por meio dos nossos resultados, o papel do miR-210 nas etapas de produção de células maduras na talassemia beta, a fim de suprir a necessidade fisiológica relacionada ao número de células sanguíneas para transporte adequado de oxigênio.

O miR-210 tem envolvimento, também, na homeostase do ferro. Esse miRNA tem como alvo de regulação o gene que codifica o receptor de transferrina (*TfR*), responsável pela internalização do ferro nas células. Na presença de elevados níveis de miR-210, baixos níveis de TfR são expressos, reduzindo a absorção celular do ferro e, conseqüentemente, resultando em deficiência de ferro (YOSHIOKA et al., 2012). Os indivíduos avaliados em nosso estudo não apresentaram deficiência de ferro. Ao contrário, todos os indivíduos portadores de talassemia beta apresentaram sobrecarga de ferro hepática e, em alguns casos, cardíaca. No grupo com talassemia beta β^0 , caracterizado pela presença de indivíduos com sobrecarga em ambos os órgãos, houve aumento nos níveis de expressão do miR-210 (Figura 17). Esse resultado sugere a participação desse elemento na regulação da homeostase do ferro como um todo, não apenas na deficiência, mas também na sobrecarga de ferro tecidual por meio da regulação de genes envolvidos diretamente aos processos de sobrecarga de ferro. No entanto, é necessário investigar o envolvimento de genes específicos do metabolismo do ferro a fim de identificar possíveis alvos envolvidos nesse processo metabólico. A Figura 17 mostra o perfil de expressão do miR-210 nos cinco grupos avaliados.

Outros relatos mostraram que a participação do miR-210 na eritropoiese é medida pela hipóxia, uma vez que na presença de baixos níveis de oxigênio ocorre ativação da eritropoiese devido à liberação de EPO (HAASE, 2010; SARAKUL et al., 2013). Sendo assim, o miR-210 pode apresentar relação com outros processos metabólicos, além da maturação eritróide, que serão discutidos em seguida.

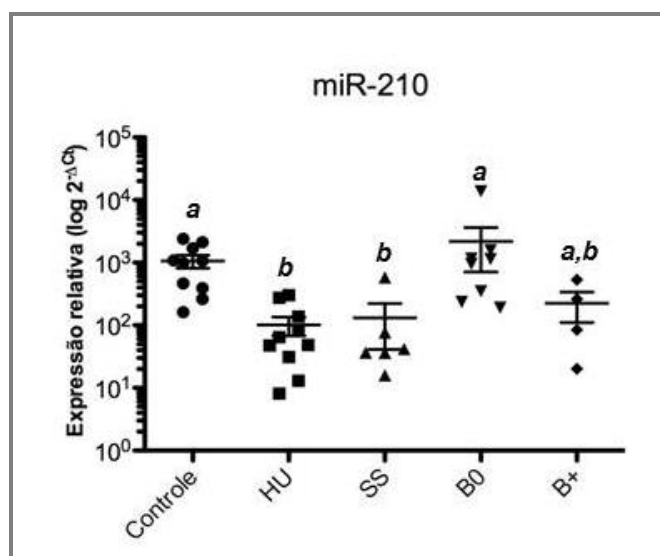


Figura 17: Expressão diferencial do miR-210 entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey ($p=0,000017$), com diferença significativa entre GC x HU ($p=0,000419$), GC x SS ($p=0,001925$), B0 x HU ($p=0,000634$) e B0 x SS ($p=0,002806$).

4.5.2 Expressão dos miRNAs envolvidos na hipóxia

Dentre os elementos diferentemente expressos entre os grupos avaliados, o miR-210 apresenta forte relação com o processo de hipóxia. O fator indutor de hipóxia (HIF) age no controle da resposta celular à hipóxia e, além disso, atua como o mediador central da ativação transcricional do miR-210. Sarakul e colaboradores (2013) mostraram que, em condições de hipóxia, houve aumento da expressão de α -globina e γ -globina, bem como de marcadores específicos de células da linhagem eritróide CD71 e CD235a. Na presença de *anti-miR-210*, uma biomolécula que inibe a ação do miR-210, houve redução significativa da expressão das cadeias globínicas formadoras da Hb F, sugerindo amplo papel desse miRNA em processos que envolvem a eritropoiese, hipóxia e síntese de cadeias globínicas.

As beta-hemoglobinopatias são alterações genéticas que são intimamente relacionadas à anemia hemolítica crônica e hipóxia. Na talassemia beta, as células progenitoras eritróides são produzidas em um microambiente com baixas concentrações de oxigênio, na medula óssea (SARAKUL et al., 2013). Sabendo que na presença de hipóxia níveis elevados do miR-210 são expressos e que, por sua vez, esse miRNA acentua a diferenciação eritróide em resposta à hipóxia, é possível que, na presença da talassemia beta, elevados níveis do miR-210 sejam expressos. Nossos resultados corroboram essa inferência em relação ao aumento de expressão do miR-210 em indivíduos portadores de

talassemia beta β^0 , que representa a forma mais grave da doença (Figura 17). Na anemia falciforme, a hipóxia pode apresentar uma relação tecido-específica. Os dois grupos com anemia falciforme analisados nesse trabalho, em uso e não uso de HU, apresentaram como principais características clínicas a ocorrência de úlceras de perna e episódios de AVE, respectivamente. Nesse sentido, nossos resultados evidenciam menores níveis de expressão do miR-210 na anemia falciforme, uma vez que não analisamos a expressão tecido-específica desse miRNA, mas sim a expressão em células da linhagem eritróide presentes na circulação periférica (Figura 17).

A síntese de cadeias globínicas também envolve a atuação do miR-210. Em análise do perfil de microRNAs expressos pelas células eritróides precursoras de indivíduos sem anemias e portadores de talassemia beta, associada ou não à presença de mutações de PHHF, Bianchi e colaboradores (2009) verificaram expressão aumentada do miR-210 na presença de PHHF, constituindo uma relação positiva entre o miRNA e a Hb F. Nossos resultados mostraram maiores níveis de expressão nos grupos controle e talassemia beta β^0 em relação aos grupos com anemia falciforme, independente do uso de medicação específica (Figura 17). De maneira geral, o grupo portador de anemia falciforme apresentou maiores concentrações de Hb F, o que nos leva a inferir que, na presença de níveis elevados do miR-210, menores níveis de Hb F são expressos. Assim, não podemos descartar o possível papel do miR-210 na modulação negativa da expressão do gene da γ -globina. No entanto, faz-se necessária a identificação, e posterior validação, de possíveis alvos do processo de regulação da Hb F para determinar a atuação direta ou indireta desse miRNA no gene γ .

4.5.3 Expressão do miRNAs envolvidos no estresse oxidativo

Relatos da literatura mostraram o envolvimento do miR-144 na modulação do estresse oxidativo na anemia falciforme via regulação do gene *NRF2* (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Esse gene codifica o fator de transcrição nuclear NRF2, um mediador da tolerância ao estresse oxidativo, que desempenha papel importante no desenvolvimento das células eritróides devido sua forte relação com o estresse oxidativo, que influencia o processo de maturação dessas células. Em condições de estresse oxidativo, NRF2 se liga a elementos específicos presentes em promotores de genes envolvidos na resposta a esse processo metabólico e essa ligação induz a expressão de enzimas antioxidantes (ISHII et al., 2000; SANGOKOYA et al., 2010). O miR-144 é um regulador

direto da expressão de NRF2. Níveis elevados do miR-144 estão associados à redução na expressão de NRF2 em condições de estresse. A superexpressão desse miRNA e consequente redução de NRF2 promove diminuição nas concentrações de enzimas antioxidantes como glutathiona reduzida (GSH), superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT), indicando que a expressão do miR-144 pode estar relacionado à redução da capacidade antioxidante na anemia falciforme (SANGAKOYA et al., 2010).

Nossos resultados mostraram menor expressão do miR-144 nos indivíduos com anemia falciforme, independente do uso de HU, em relação ao grupo controle e indivíduos com talassemia beta β^0 (Figura 14). Embora a anemia falciforme apresente estresse oxidativo crônico, não verificamos aumento na expressão do miR-144 nesses indivíduos, o que sugere o envolvimento de outros fatores nas vias que caracterizam a relação desse elemento de regulação e o estresse oxidativo.

4.5.4 Expressão dos miRNAs envolvidos no controle da proliferação e ciclo celular

Dos 14 miRNAs selecionados como candidatos à regulação dos genes da γ -globina, alguns deles apresentam relação conhecida com os processos de proliferação celular e controle do ciclo celular. Dentre eles, os miR-26b e miR-151-3p já foram investigados em indivíduos com beta-hemoglobinopatias em relação ao possível envolvimento com a síntese de Hb F. Ao contrário, os miR-362-5p, miR-760, miR-4795, miR-449a e miR-449b não apresentam, até o momento, nenhuma relação estabelecida com os processos eritropoiéticos e síntese de globinas, de modo que nossos resultados podem representar os primeiros relatos do envolvimento desses elementos de regulação em processos vinculados às beta-hemoglobinopatias.

O miR-26b é abundantemente expresso em adipócitos e apresenta níveis de expressão elevados durante o processo de diferenciação dessas células. Fatores relacionados à obesidade podem afetar a expressão desse miRNA (SONG et al., 2014; XU et al., 2014). A superexpressão do miR-26b foi verificada, também, na doença de Alzheimer (ABSALON et al., 2013). Baixos níveis desse miRNA foram encontrados em células de câncer de mama, exercendo papel supressor tumoral por meio da regulação do gene *Cdk8* (*cyclin-dependent kinase 8*), importante na progressão do ciclo celular (LI et al., 2014).

Relatos da literatura mostraram que o miR-26b é conhecido por regular a expressão do gene ciclo-oxigenase 2 (*Cox-2*), envolvido no desenvolvimento e crescimento tumoral

(JI et al., 2010). A expressão de COX-2 é influenciada pela ação de fatores relacionados à hipóxia, HIF-1 α e NF- κ B (KAIDI et al., 2006). Em células epiteliais de carcinoma nasofaríngeo tratadas com desferroxamina, os níveis do miR-26b foram pouco expressos, resultando no aumento de expressão de COX-2. A desferroxamina, quelante de ferro, é capaz de mimetizar a ação da hipóxia e elevar os níveis de expressão de mediadores inflamatórios. Conseqüentemente, há aumento da expressão de COX-2 e redução dos níveis do miR-26b. Em nossas análises, houve expressão diferencial do miR-26b entre o grupo com talassemia beta β^0 e indivíduos com anemia falciforme em uso de HU (Figura 18). No grupo com talassemia beta, todos os indivíduos estavam em uso regular de quelante de ferro, ao contrário do grupo com anemia falciforme. Entretanto, nossos resultados mostraram maior expressão do miR-26b em células provenientes de indivíduos em uso de quelante de ferro, o que nos permite inferir que a utilização desse componente pode alterar a expressão de miRNAs envolvidos em diferentes processos metabólicos como, por exemplo, o metabolismo do ferro.

Nesse sentido, buscamos informações a respeito do possível envolvimento do miR-26b na regulação de genes que atuam na homeostase do ferro. A partir da análise de predição em bancos públicos de genes alvos de miRNA³, verificamos que o gene *HFE*, importante regulador da absorção do ferro, apresenta sítios de ligação para o miR-26b sendo, portanto, um possível alvo de regulação desse miRNA. A relação predita entre o gene *HFE* e o miR-26b reforça a hipótese do envolvimento desse elemento de regulação no metabolismo do ferro.

O miR-151-3p exerce influência na expressão do gene *E2f6* (*E2F transcription factor 6*), envolvido no controle do ciclo celular (ROY-CHAUDHURI et al., 2014). Níveis elevados de expressão desse miRNA foram verificados em células epiteliais de colangiocarcinoma (McNALLY et al., 2013).

A relação dos miR-26b e miR-151-3p com a expressão da Hb F foi verificada por Walker e colaboradores (2011) em indivíduos com anemia falciforme. A avaliação do perfil de expressão desses miRNAs mostrou expressão aumentada dos miR-26b e miR-151-3p em pacientes com anemia falciforme. Os níveis de miR-26b foram inversamente proporcionais aos níveis expressos de Hb F antes do uso de HU e após administração da máxima dose tolerada da droga, indicando que o uso de HU não alterou a relação existente entre o miR-26b e a Hb F. Por outro lado, o miR-151-3p apresentou maiores níveis de expressão após o uso de HU, associado ao aumento da Hb F induzido pela droga.

³ Relação predita indicada pelo banco de dados DIANA LAB (DNA Intelligent Analysis), disponível em <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>.

De acordo com nossos resultados, a expressão do miR-26b foi maior no grupo com talassemia beta β^0 em relação ao grupo com anemia falciforme em uso de HU, que apresentou maiores concentrações de Hb F (Figura 18). Nossos dados diferem dos relatos de Walker e colaboradores (2011), indicando que o aumento da expressão da Hb F, mediado pelo uso de HU, pode alterar o perfil de expressão do miR-26b e sugerir seu envolvimento na modulação dos níveis de Hb F.

Em relação ao miR-151-3p, nossas análises mostraram expressão diferencial desse miRNA entre os grupos controle e talassemia beta β^0 com os grupos de anemia falciforme, independente do uso de HU (Figura 18). Nossos resultados mostraram que o uso de HU não influenciou a expressão do miR-151-3p nos indivíduos com anemia falciforme avaliados. A partir desses resultados, podemos sugerir que, na presença da anemia falciforme, a expressão do miR-151-3p é reduzida.

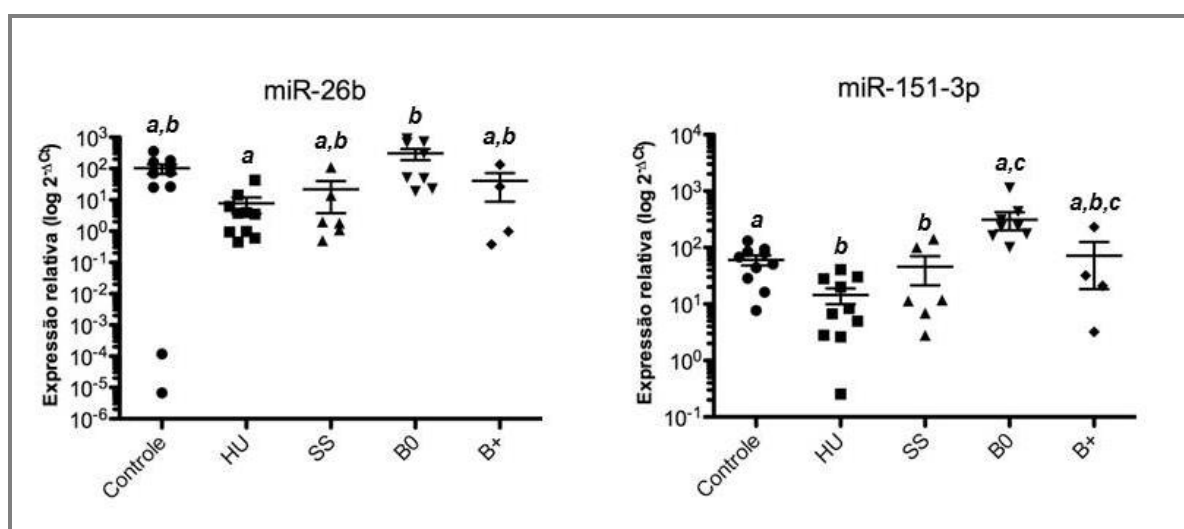


Figura 18: Expressão diferencial dos miR-26b e miR-151-3p entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico Kruskal-Wallis complementado por Dunn para o miR-26b ($p=0,0039$), com diferença significativa entre B0 x HU ($p=0,016231$). Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey para o miR-151-3p ($p=0,000083$), com diferença significativa entre GC x HU ($p=0,023592$) e B0 x HU ($p=0,000148$).

Embora a maioria dos miRNAs que apresentaram expressão diferencial em nossos grupos de estudo já tenham sido relacionados, direta ou indiretamente, com a maturação eritróide e expressão de Hb F, os miR-362-5p, miR-760, miR-4795, miR-449a e miR-449b não apresentam evidências experimentais para tais associações e, até o momento, esses elementos de regulação foram associados a diferentes tipos de câncer.

Níveis elevados de expressão do miR-362-5p foram verificados em câncer gástrico e em células de carcinoma hepatocelular. A superexpressão do miR-362-5p promoveu aumento da proliferação celular, resistência à apoptose e metástase. Em ambos os carcinomas, os níveis de expressão desse miRNA foram inversamente proporcionais à expressão do gene *CYLD*, que apresenta papel na supressão tumoral. A redução das concentrações de *CYLD* ativam a via de sinalização de NF- κ B, uma família de fatores de transcrição envolvidos em processos inflamatórios, resposta imune, proliferação e diferenciação celular (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009; XIA et al., 2014; NI et al., 2015).

Nossos dados mostraram expressão diferencial do miR-362-5p entre os indivíduos com talassemia beta β^0 e os demais grupos analisados, com exceção do grupo com talassemia beta β^+ , de forma que houve redução da expressão desse elemento em indivíduos sem anemias e portadores de anemia falciforme, independente do uso de medicação específica. O fato de que os grupos com talassemia beta não apresentaram diferença significativa na expressão desse elemento, nos permite inferir que características intrínsecas à doença como, por exemplo, a mutação que confere o fenótipo talassêmico e/ou fatores de regulação envolvidos na fisiopatologia da talassemia, possam alterar a expressão desse miRNA. No entanto, nossos resultados não nos possibilita afirmar essa hipótese.

Sabe-se que as mutações que caracterizam a talassemia beta tem relação com os haplótipos β -Tal e com outros polimorfismos no gene da β -globina, comumente encontrados nos indivíduos portadores dessa afecção genética. Estudos de Fonseca e colaboradores (1998), avaliando indivíduos com talassemia beta provenientes do estado de São Paulo, no Brasil, identificaram associação da mutação CD39 (C > T) com os haplótipos I e II, IVSI-110 (G > A) e haplótipo I, e IVSI-6 (T > C) com os haplótipos VI e VIII. Na Turquia, relatos da literatura mostraram associação da mutação IVSI-110 (G > A) com os haplótipos I, IV e V, e da mutação IVSI-6 (T > C) com os haplótipos III e VII (BILGEN et al., 2011). Além da combinação de haplótipos β -Tal, cinco polimorfismos no gene β são comumente identificados em indivíduos com talassemia beta: códon 2 (CAT > CAC), IVS-II-16 (G>C), IVS-II-74 (T>G), IVS-II-81 (C>T) e IVS-II-666 (C>T) (ORKIN et al., 1982). Esses polimorfismos foram encontrados nos indivíduos com talassemia beta avaliados nesse estudo. Assim, é possível que o conjunto polimórfico presente no gene β e na família β -globina exerçam influência em outros reguladores que modulam a expressão dos genes dessa família como, por exemplo, os miRNAs.

A Figura 19 ilustra o perfil de expressão do miR-362-5p nos grupos analisados.

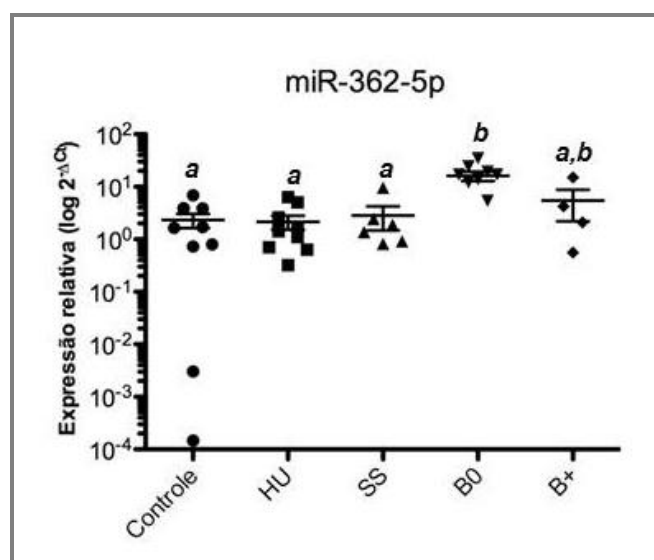


Figura 19: Expressão diferencial do miR-362-5p entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico Kruskal-Wallis complementado por Dunn ($p=0,0015$), com diferença significativa entre B0 x GC ($p=0,003017$), B0 x HU ($p=0,002418$) e B0 x SS ($p=0,040509$).

O miR-760 apresenta potencial papel na supressão tumoral, atuando na redução da proliferação celular. Em células de tumor gástrico, houve maior crescimento e capacidade de invasão tumoral na presença de baixos níveis de expressão do miR-760. Níveis elevados desse elemento reduziram a expressão do gene *HIST1H3D*, responsável pela codificação de histonas que, por sua vez, atuam na proliferação tumoral. Dessa forma, o miR-760 tem papel supressor na proliferação tumoral em câncer gástrico, via regulação do gene *HIST1H3D* (IWAYA et al., 2013). Nossos dados mostraram maior expressão do miR-760 no grupo com talassemia beta β^0 em relação ao grupo controle (Figura 20). Uma vez que a transfusão sanguínea nesses indivíduos tem como objetivo reduzir o quadro anêmico e proporcionar um microambiente celular semelhante ao encontrado no grupo controle em relação às concentrações de eritrócitos e hemoglobina, é possível que outros fatores genéticos sejam responsáveis pela diferença de expressão do miR-760 verificadas entre esses grupos. Novamente, os haplótipos β -Tal e os polimorfismos no gene da β -globina, comumente verificados em indivíduos com talassemia beta, podem representar mecanismos que influenciam a expressão de reguladores genéticos como, por exemplo, os

níveis expressos do miR-760. No entanto, nossos dados não nos permitem corroborar essa hipótese.

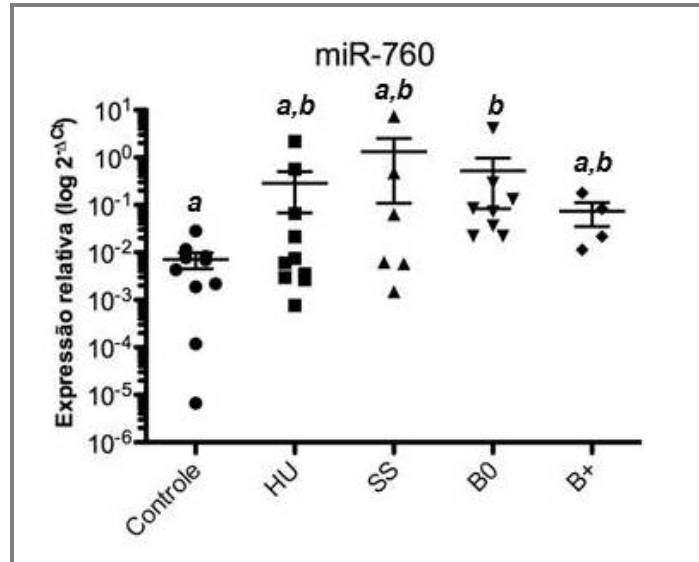


Figura 20: Expressão diferencial do miR-760 entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico Kruskal-Wallis complementado por Dunn ($p=0,0102$), com diferença significativa entre B0 x GC ($p=0,011313$).

Em células de carcinoma nasofaríngeo, os níveis do miR-4795 foram superexpressos na presença de 5-fluorouracil (5-FU), uma droga com ação inibidora da síntese de DNA que induz a morte de células do câncer, mostrando a influência do tratamento com quimioterápico no perfil de expressão de miRNA e o possível papel desse elemento na supressão tumoral (ZHANG; LI, 2012). Nossos resultados mostraram maiores níveis de expressão desse miRNA no grupo de indivíduos com talassemia beta β^0 em relação ao grupo com anemia falciforme em uso de HU. A partir desse dado, podemos inferir que os níveis de expressão do miR-4795 podem ser influenciados de acordo com a presença de um regulador físico, a ausência do gene da β -globina, e um regulador químico, o uso de HU. A HU é uma droga com efeito quimioterápico que bloqueia a síntese de DNA. De modo semelhante ao 5-FU, o uso de HU pode alterar a expressão do miR-4795. No entanto, são necessárias análises complementares que possam nos auxiliar a esclarecer a relação da HU com os níveis de expressão do miR-4795. A Figura 21 ilustra a expressão diferencial do miR-4795 verificada nos grupos avaliados.

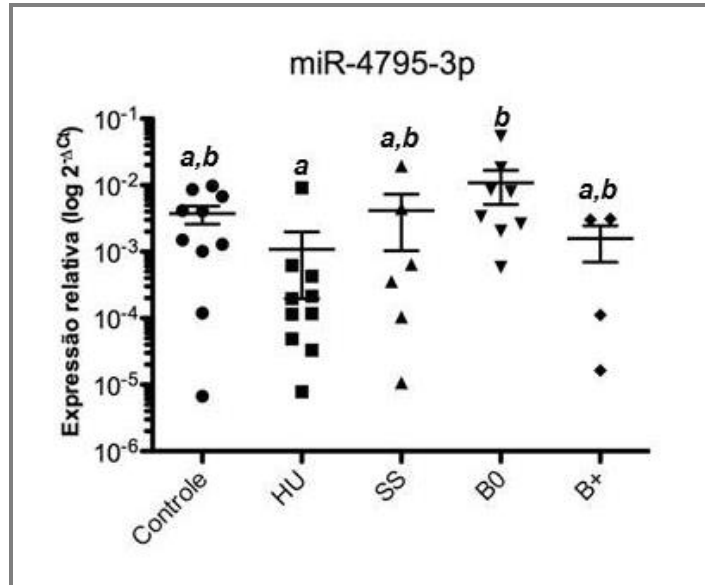


Figura 21: Expressão diferencial do miR-4795-3p entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico Kruskal-Wallis complementado por Dunn ($p=0,0222$), com diferença significativa entre B0 x HU ($p=0,049177$).

A família de miR-449 apresenta possível ação supressora tumoral. Esses miRNAs apresentam efeito inibidor na progressão tumoral do retinoblastoma, aumentando as taxas de apoptose celular (MARTIN et al., 2013). Por seu papel na redução da proliferação celular do tumor, os miR-449a e miR-449b podem se apresentar como potenciais supressores tumorais.

Recentemente, a família de miR-449 foi associada à regulação de processos importantes no desenvolvimento cerebral e esterilidade em camundongos. O silenciamento desses miRNAs resultou em redução das áreas cerebrais em machos. Em relação à esterilidade, machos nulos para essa família de miRNAs apresentaram quantidades reduzidas de espermatozoides, com deformidades e baixa mobilidade, caracterizando o fenótipo estéril. Nas fêmeas, o silenciamento dos miRNAs causou diminuição das células ciliadas no epitélio do oviduto, promovendo a esterilidade (WU et al., 2014). Esses achados mostraram a atuação dos miR-449a e miR-449b em outros processos celulares, além do papel bem elucidado que estes exercem no câncer.

Os miR-449a e miR-449b são reguladores diretos do gene *HDAC1* (histona deacetilase), que atua no ciclo celular, diferenciação celular e reparo ao dano no DNA (NOONAN et al., 2009; JEON et al., 2012). Em câncer de pulmão, a ação combinada da superexpressão dos miR-449a e miR-449b com inibidores de histona deacetilases

mostraram redução nas taxas de proliferação celular do tumor (JEON et al., 2012). HDAC1 tem papel na repressão dos genes γ -globina (BRADNER et al., 2010). Sabendo que os elementos da família miR-449 regulam os níveis de HDAC1 e essa, por sua vez, regula negativamente a expressão de cadeias γ -globina, a superexpressão desses miRNAs poderia elevar a concentração de Hb F. Ao contrário, nossos resultados mostraram que os maiores níveis de expressão dos miR-449a e miR-449b foram verificados no grupo controle, em indivíduos com níveis de expressão da Hb F dentro dos valores de normalidades na vida adulta, em relação aos demais grupos portadores de beta-hemoglobinopatias. Dessa forma, não podemos descartar a possibilidade da atuação desses elementos na regulação dos genes da γ -globina por meio de outras vias independentes de HDAC1 e sugerimos que os miR-449a e miR-449b representam fortes candidatos à modulação da Hb F.

A Figura 22 apresenta o perfil da expressão dos miR-449a e miR-449b nos grupos analisados.

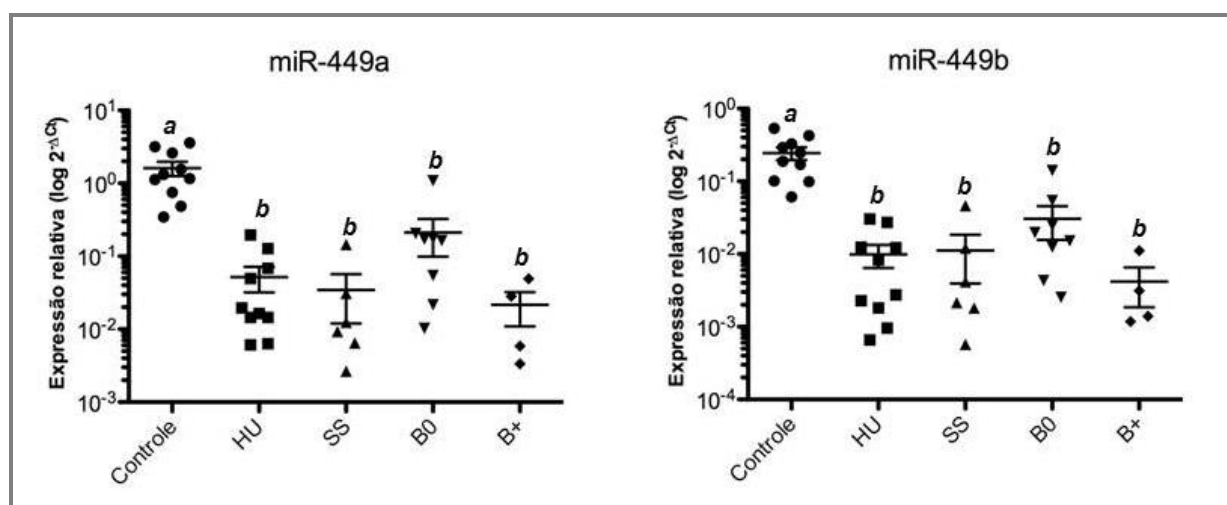


Figura 22: Expressão diferencial dos miR-449a e miR-449b entre os grupos analisados. Letras diferentes indicam diferença estatística. Controle: grupo controle. HU: anemia falciforme em uso de hidroxiureia. SS: anemia falciforme sem uso de hidroxiureia. B0: talassemia beta β^0 . B+: talassemia beta β^+ . Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey para o miR-449a ($p < 0,0000001$), com diferença significativa entre GC x HU ($p = 0,000128$), GC x SS ($p = 0,000128$), GC x B0 ($p = 0,000395$) e GC x B+ ($p = 0,000129$). Teste estatístico ANOVA *one-way* complementado por Tukey para o miR-449b ($p < 0,0000001$), com diferença significativa entre GC x HU ($p = 0,000129$), GC x SS ($p = 0,000138$), GC x B0 ($p = 0,000479$) e GC x B+ ($p = 0,000148$).

4.5.5 Correlação entre miRNA e Hb F nos grupos avaliados

Com a finalidade de identificar correlações entre todos os miRNAs avaliados nesse estudo, que pudessem ser característicos e/ou específicos dos grupos com beta-hemoglobinopatias, foram realizadas análises de correlação de Spearman entre os 14 miRNAs com expressão diferencial dentro de cada grupo analisado.

No grupo controle, todos os miRNAs analisados apresentaram correlação positiva entre si, com exceção do miR-221. Esse miR apresentou correlação negativa com os níveis expressos de Hb F ($\rho = -0,719702$; $p = 0,018$), reforçando a possível participação desse elemento na regulação da modulação dos níveis de Hb F na vida adulta (Figura 23).

O grupo com anemia falciforme em uso de HU apresentou menor número de correlação entre os miRNAs avaliados em relação ao grupo controle, indicando algumas relações peculiares. O miR-760 não apresentou correlação com nenhum dos outros elementos investigados. Os miR-144 e miR-451 apresentaram relação apenas entre si, que pode ser devido ao fato de que esses dois elementos estão no mesmo *locus* gênico. Os miR-449a e miR-449b apresentaram relação entre si e com o miR-16. Houve correlação negativa entre os níveis de Hb F e a expressão do miR-15a ($\rho = -0,709091$; $p = 0,027$) (Figura 24). Essa evidência reflete a influência exercida pelo miR-15a na modulação da Hb F de modo que quanto maior a expressão desse miRNA, menores são os níveis de Hb F.

No grupo com anemia falciforme sem uso de HU não houve correlação entre a Hb F e a expressão dos miRNAs analisados. O número de correlações observadas foi maior em relação ao grupo em uso de HU e todos os miRNAs apresentaram correlação entre si, de modo que não foram encontradas as mesmas características verificadas no grupo em uso da droga. É importante reforçar que ambos os grupos de indivíduos com anemia falciforme apresentam o mesmo genótipo para a doença (homozigose para a mutação β^S) e mesmo haplótipo (β^S Bantu), diferindo em relação ao uso de medicação específica (HU). Dessa forma, as diferentes correlações verificadas entre os miRNAs podem ser atribuídas à presença da HU, indicando que o uso dessa droga pode alterar a relação existente entre os elementos de regulação candidatos à modulação dos níveis de Hb F na anemia falciforme. A ausência de correlação entre a expressão relativa dos miRNAs e os níveis de Hb F no grupo que não faz uso da droga, e a presença dessa correlação nos indivíduos em uso da droga reforçam a hipótese de que a HU altera a relação de elementos reguladores da γ -globina.

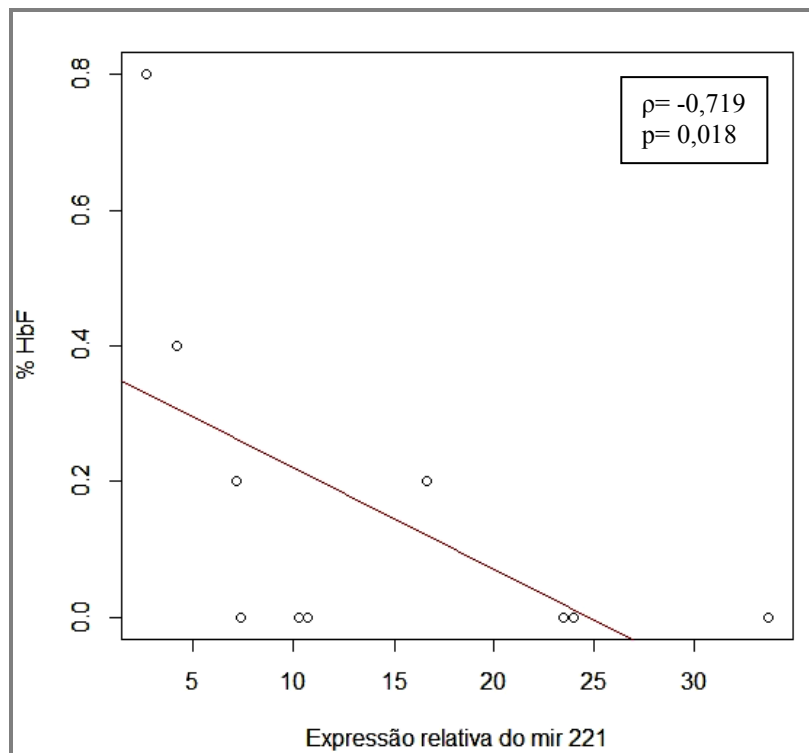


Figura 23: Correlação negativa entre a expressão relativa do miR-221 e da concentração de Hb F em indivíduos sem queixas de anemia.

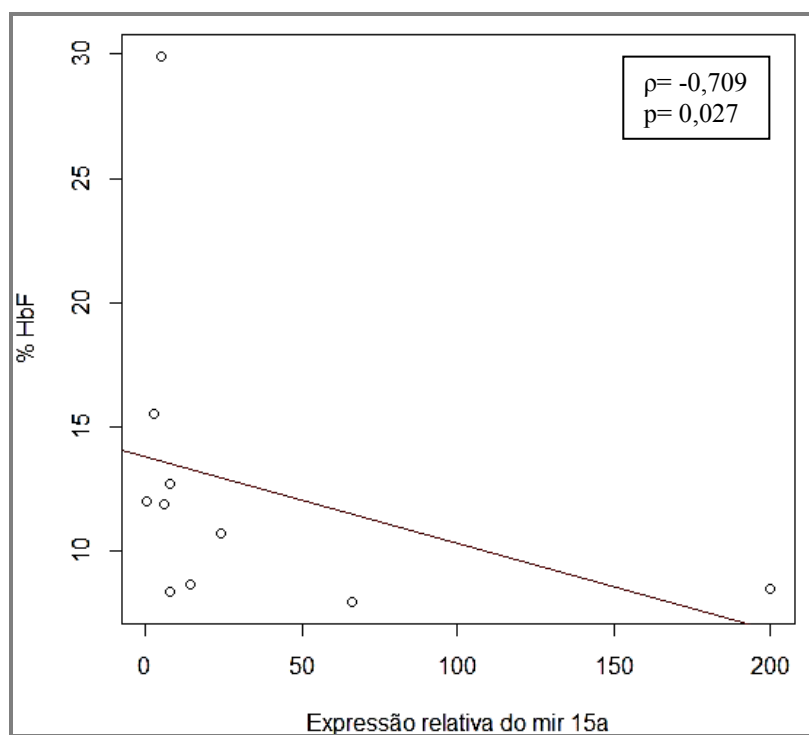


Figura 24: Correlação negativa entre a expressão relativa do miR-15a e da concentração de Hb F em indivíduos com anemia falciforme em uso de HU.

Os grupos formados por indivíduos com talassemia beta também mostraram perfis diferentes de correlação entre os elementos avaliados. No grupo com talassemia beta β^0 , o número de correlações observado foi semelhante ao verificado no grupo controle indicando, novamente, que a presença da Hb A, via processo transfusional, pode simular as condições normais no que diz respeito à concentração de hemoglobina e quantidade de células vermelhas. Todos os miRNAs apresentaram relação entre si, com exceção do miR-144, e não houve correlação desses elementos de regulação com os níveis de Hb F.

No grupo com talassemia beta β^+ , não foi verificada correlação entre os níveis de expressão dos miRNAs com a concentração de Hb F. Da mesma forma, não foi encontrada relação dos miRNAs entre si. Ressaltamos que os grupos apresentam a mesma afecção genética, associada a fatores genéticos (haplótipos β -Tal) e polimorfismos no gene da β -globina semelhantes, diferindo em relação às concentrações circulantes de Hb A. Na talassemia beta β^0 , a necessidade do processo transfusional, devido à gravidade da doença, contribui com níveis elevados de Hb A nesses indivíduos. Na talassemia beta β^+ , o processo transfusional é periódico, de modo que as concentrações de Hb A são menores e os níveis de Hb F são elevados nesses indivíduos. A partir dos resultados obtidos nas análises de correlação, identificamos cenários muito distintos entre os grupos com talassemia beta β^0 e β^+ , sugerindo que a presença da Hb A pode influenciar a expressão de fatores genéticos moduladores da expressão dos demais genes da família β -globina.

De maneira geral, nossos resultados mostraram que os miRNAs são elementos de regulação envolvidos em diferentes etapas e processos que influenciam a formação de células eritróides. Fatores como a transfusão sanguínea, e conseqüentemente o aumento nos níveis da Hb adulta, e o uso de medicação específica, podem alterar o perfil de expressão desses elementos na presença de beta-hemoglobinopatias. Além disso, são elementos reguladores candidatos à regulação dos níveis da Hb F, hemoglobina com características que, em concentrações aumentadas, promove efeito terapêutico em indivíduos que apresentam talassemia beta e anemia falciforme. Portanto, o conhecimento dos miRNAs que regulam a modulação da expressão da Hb F constituem uma alternativa ao desenvolvimento de mecanismos que atuam na elevação dessa proteína e, conseqüentemente, melhoram as condições de tratamento e vida dos portadores.

Conclusões

5 Conclusões

- Foram identificadas 11 mutações que caracterizam talassemia beta. Dentre elas, as mutações -88 (HBB:c.-138C>T) e CD24 (HBB:c.75T>A) não apresentam relatos na população talassêmica do Brasil e podem caracterizar a primeira evidência da presença dessas alterações genéticas, de origem afro-americana, na população brasileira.

- O rastreamento *in silico* indicou 13 fatores de transcrição que apresentam sítios de ligação conservados nas regiões não-codificantes dos genes *HBG1* e *HBG2* e que atuam na ativação ou na repressão transcricional da γ -globina, evidenciando a participação das regiões não-codificantes na regulação gênica. Em relação aos microRNAs, as análises *in silico* mostraram 20 miRNAs preditos, candidatos à regulação dos níveis de Hb F.

- Dos 20 elementos preditos, 14 miRNAs apresentaram expressão diferencial entre indivíduos sem anemias e portadores de beta-hemoglobinopatias. Níveis elevados de expressão desses miRNAs foram encontrados na presença de baixas concentrações de Hb F, sugerindo o papel desses elementos como reguladores da expressão da Hb F. Esses elementos de regulação também estão envolvidos com a eritropoiese, hipóxia, estresse oxidativo e controle da proliferação e ciclo celular, com papel importante na fisiopatologia das beta-hemoglobinopatias.

- O perfil de expressão dos miRNAs diferiu, na maioria dos casos, entre os grupo controle e/ou talassemia beta β^0 e os demais grupos portadores de beta-hemoglobinopatias, indicando que a transfusão sanguínea simula o microambiente encontrado nos indivíduos sem anemias, destacando seu papel na expressão de miRNAs. Os portadores de anemia falciforme, independente do uso de HU, não mostraram diferença na expressão dos miRNAs avaliados, evidenciando que, a HU não influencia a ação dos miRNAs avaliados na regulação da Hb F na anemia falciforme. As diferenças de expressão nos grupos com talassemia beta reforçam a importância da presença da Hb A na manutenção de reguladores genéticos que exerçam influência nos genes da família β -globina.

- Os miR-362-5p, miR-760, miR-4795-3p, miR-449a e miR-449b não apresentam nenhum relato na literatura a respeito do envolvimento com a regulação de processos vinculados à fisiopatologia das beta-hemoglobinopatias, bem como com a modulação de

globinas, e podem representar o primeiro relato da participação desses elementos na regulação dos níveis expressos de Hb F.

- Há correlação negativa entre o miR-221 e a Hb F no grupo controle, e entre o miR-15a e a Hb F no grupo com anemia falciforme em uso de HU. Nos pacientes com anemia falciforme sem uso de HU, não há correlação entre os elementos analisados e a Hb F. O perfil de correlação dos miRNAs nos grupos com anemia falciforme avaliados indica que a presença da HU pode modificar as relações entre os miRNAs. Na talassemia beta β^0 e β^+ não há correlação entre os miRNAs e os níveis de Hb F. Entretanto, há correlação dos miRNAs entre si na talassemia beta β^0 , mas não na talassemia beta β^+ , sugerindo que a presença de níveis elevados de Hb A, que simulam as concentrações normais de hemoglobinas na vida adulta, alteram as relações entre os elementos de regulação avaliados.

Com base nos resultados, concluímos que, indivíduos que estão sob processo transfusional frequente e que mantêm níveis elevados de Hb A, próximos aos valores de normalidade, mostram perfil de expressão de miRNAs candidatos à regulação da γ -globina semelhante aos verificados em indivíduos sem alterações nas beta-globinas, sugerindo o importante papel da Hb A na expressão de fatores que atuam na regulação dos genes beta-globínicos. Assim, os miRNAs avaliados são candidatos ao estudo de novas estratégias terapêuticas na modulação dos níveis de Hb F para o tratamento das beta-hemoglobinopatias.

Referências

6 Referências

- ABSALON S, KOCHANNEK DM, RAGHAVAN V, et al. MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons. **J Neurosci**, v. 33, n. 37, p. 14645-14659, 2013.
- AKINSHEYE I, ALSULTAN A, SOLOVIEFF N, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 19-27, 2011.
- AKINSHEYE I, KLINGS ES. Sickle cell anemia and Vascular Dysfunction: The Nitric Oxide Connection. **J Cell Physiol**, v. 224, p. 620-625, 2010.
- ANDREWS NC. Molecules in focus: The NF-E2 transcription factor. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 30, p. 429-432, 1998.
- ANGUITA E, SHARPE JA, SLOANE-STANLEY JA, et al. Deletion of the mouse α -globin regulatory element (HS-26) has an unexpectedly mild phenotype. **Blood**, v.100, p.3450-3456, 2002.
- ARAÚJO AS, SILVA WA, LEAO AS, et al. A different molecular patterns of beta-thalassemia mutation in northeast Brazil. **Hemoglobin**, v. 27, p. 211-217, 2003.
- ASANO H, LI XS, STAMATOUYANNOPOULOS G. FKLf, a Novel Krüppel-Like Factor That Activates Human Embryonic and Fetal β -Like Globin Genes. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 5, p. 3571–3579, 1999.
- AZZOUZI I, MOEST H, WINKLER J, et al. MicroRNA-96 Directly Inhibits γ -Globin Expression in Human Erythropoiesis. **Plos One**, v. 6, e22838, 2011.
- BARTEL DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, p. 281–297, 2004.
- BAUER DE, KAMRAN SC, ORKIN SH. Reawakening fetal hemoglobin: Prospects for new therapies for the β -globin disorders. **Blood**, v. 120, n. 15, 2945-2953, 2012.
- BERTHOLO LC. **Amplificação gênica alelo específica e multiplex no diagnóstico laboratorial de hemoglobinas anormais**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2005.
- BIANCHI N, ZUCCATO C, FINOTTI A, et al. Involvement of miRNA in erythroid differentiation. **Epigenomics**, v. 4, n. 1, p. 51-65, 2012.
- BIANCHI N, ZUCCATO C, LAMPRONTI I, et al. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of γ -globin gene expression. **BMB Reports**, v. 42, n. 8, p. 493-499, 2009.
- BILGEN T, ARIKAN Y, CANATAN D, et al. The association between intragenic SNP haplotypes and mutations of the beta globin gene in a Turkish population. **Blood Cells Dis**, v. 46, p. 226-229, 2011.

- BLANK V, KIM MJ, ANDREWS NC. Human MafG Is a Functional Partner for p45 NF-E2 in Activating Globin Gene Expression. **Blood**, v. 89, p. 3925-3935, 1997.
- BOFELLI D, NOBREGA MA, RUBIN EM. Comparative genomics at the vertebrate extremes. **Nature Reviews**, v.4, p.456-465, 2004.
- BONINI-DOMINGOS CR. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**. São José do Rio Preto, SP: HN Editora, 2006.
- BORGNA-PIGNATTI C, RUGOLOTTO S, DE STEFANO P, et al. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. **Haematologica**, v. 89, n. 10, p. 1187-93, 2004.
- BOSÈ F, FUGAZZA C, CASALGRANDI M, et al. Functional Interaction of CP2 with GATA-1 in the Regulation of Erythroid Promoters. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 10, p. 3942-3954, 2006.
- BRADNER JE, MAK R, TANGUTURI SK, et al. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n. 28, p. 12617-12622, 2010.
- BRITTENHAM GM, SCHECHTER AN, NOGUCHI CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood**, v. 65, p. 183-189, 1985.
- BUNN HF, FORGET BG. Molecular Genetics and Biosynthesis of Hemoglobin. In: BUNN HF, FORGET BG. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. 1st edition. Philadelphia, P.A, USA, Saunders Company. 1986, p. 169-222.
- BUNN HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 337, p. 762-769, 1997.
- CAMPOS VF, URTIAGA G, GONÇALVES B, et al. MicroRNAs e seu papel no desenvolvimento embrionário. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 85-93, 2011.
- CANÇADO RD, LOBO C, ÂNGULO IL, et al. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, p. 361-366, 2009.
- CAO A, GALANELLO R. Beta-thalassemia. **Genet Med**, v. 12, n. 2, p. 61-76, 2010.
- CAO A, SABA L, GALANELLO R, et al. Molecular diagnosis and carrier screening for β -thalassemia. **JAMA**. v. 278, p. 1273-1277, 1997.
- CARROCINI GC, ONDEI LS, ZAMARO PJ, et al. Evaluation of HPFH and $\delta\beta$ -thalassemia mutations in a Brazilian group with high Hb F levels. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 4, p. 3213-3219, 2011.

- CHAN CM, FULTON J, MONTIEL-DUARTE C, et al. A signature motif mediating selective interactions of BCL11A with the NR2E/F subfamily of orphan nuclear receptors. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. 21, p. 9663-9679, 2013.
- CHARACHE S, DOVER GH, MOORE RD, et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, n. 10, 2555-2565, 1992.
- CHEN Z, LUO HY, STEINBERG MH, et al. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. **Blood Cells Mol Dis**, v. 42, p. 144-149, 2009.
- CHEN Z, LUO HY, BASRAN RK, et al. A T-to-G transversion at nucleotide -567 upstream of HBG2 in a GATA-1 binding motif is associated with elevated hemoglobin F. **Mol Cell Biol**, v. 28, p. 4386-4393, 2008.
- CHIU C, SCHNEIDER H, SCHNEIDER MPC, et al. Reduction of two functional γ -globin genes to one: An evolutionary trend in New World monkeys (infraorder Platyrrhini). **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 6510-6515, 1996.
- CHOONG ML, YANG HH, McNIECE I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. **Exp Hematol**, v. 35, n. 4, p. 551-564, 2007.
- COOPER GM, BRUDNO M, STONE EA, et al. Characterization of evolutionary rates and constraints in three mammalian genomes. **Genome Res**, v.14, n. 4, p.539-548, 2004.
- COSTA, F.F.; TAVELA, M.H.; ZAGO, M.A. Molecular basis of β -thalassemia in Brazil. **Blood**, v. 76, n. 10 (suppl 1), p. 58, 1990.
- COVAS DT, ÂNGULO, IL, PALMA PVB, et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, p. 273-280, 2004.
- CRAIG JE, BARNETSON RA, PRIOR J, et al. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. **Blood**, v. 83, n. 6, p. 1673-1682, 1994.
- CRAIG JE, ROCHETTE J, FISHER CA, et al. Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. **Nat Genet**, v. 12, p. 58-64, 1996.
- DANJOU F, ANNI F, GALANELLO R. Beta-thalassemia: from genotype to phenotype. **Haematologica**, v. 96, n. 11, p. 1573-1575, 2011.
- DAVIES SC, GILMORE A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood Rev**, v. 17, p. 99-109, 2003.
- DORE LC, AMIGO JD, DOS SANTOS CO, et al. A GATA-1 regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 9, p. 3333-3338, 2008.

- DOVER GJ, SMITH KD, CHANG YC, et al. Fetal Hemoglobin Levels in Sickle Cell Disease and Normal Individuals Are Partially Controlled by an X-Linked Gene Located at Xp22.2. **Blood**, v. 80, p. 816-824, 1992.
- DRISS A, Asare KO, Hibbert JM, et al. Sickle cell disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights**, v. 30, n. 2, p. 23-48, 2009.
- FELLI N, FONTANA L, PELOSI E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 50, p. 18081-18086, 2005.
- FERNANDES AC, SHIMMOTO MMA, FURUZAWA GK, et al. Molecular analysis of β -thalassemia patients: first identification of mutations HBB:c.93-2A>G and HBB:c.114G>A in Brazil. **Hemoglobin**, v. 35, n. 4, p. 358–366, 2011.
- FILIPOWICZ W, JASKIEWICZ L, KOLB FA, et al. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. **Curr Opin Struct Biol**, v. 15, p. 331-341, 2005.
- FONSECA SF, KERBAUY J, ESCRIVAO C, et al. Genetic analysis of beta-thalassemia major and beta-thalassemia intermedia in Brazil. **Hemoglobin**, v. 22, n. 3, p. 197-207, 1998.
- FORGET BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Ann N Y Acad Sci**, v. 850, p. 38-44, 1998.
- FRAZER KA, ELNISTKI L, CHURCH DM, et al. Cross-Species Sequence Comparisons: a review of methods and available resources. **Genome Res**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2003.
- FRAZER KA, PACTER L, POLIAKOV A, et al. VISTA: computational tools for comparative genomics. **Nucleic Acids Res**, v. 32, p. 273-279, 2004.
- FRENETTE PS, ATWEH GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v. 117, n. 4, p. 850-859, 2007.
- FU YF, DU TT, DONG M, et al. Mir-144 selectively regulates embryonic alpha-hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. **Blood**, v. 113, p. 1340–1349, 2009.
- GABBIANELLI M, TESTA U, MORSILLI O, et al. Mechanism of human Hb switching: a possible role of the kit receptor/miR 221-222 complex. **Haematologica**, v. 85, n. 8, p. 1253-1260, 2010.
- GALANELLO R, ORIGA R. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases** v. 5, p. 11, 2010.
- GARNER C, MITCHELL J, HATZIS T, et al. Haplotype Mapping of a Major Quantitative-Trait Locus for Fetal Hemoglobin Production, on Chromosome 6q23. **Am J Hum Genet**, v. 62, p. 1468–1474, 1998.

- GARNER CP, TATU T, BEST S, et al. Evidence of Genetic Interaction between the β -Globin Complex and Chromosome 8q in the Expression of Fetal Hemoglobin. **Am J Hum Genet**, v. 70, p. 793–799, 2002.
- GARZON R, CROCE CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. **Curr Opin Hematol**, v. 15, p. 352-358, 2008.
- GONZALEZ-REDONDO JM, STOMING TA, LANCLOS KD, et al. Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous beta-thalassemia from the southeastern United States. **Blood**, v. 72, n. 3, p. 1007-1014, 1988.
- HAASE VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 299, p. F1–F13, 2010.
- HE L, HANNON GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet**, v. 5, p. 522-531, 2004.
- HIGGS DR, ENGEL JD, STAMATOYANNOPOULOS G. Thalassaemia. **Lancet**, v. 379, p. 373-383, 2012.
- HONIG GR, ADAMS III JG. **Human Hemoglobin Genetics**. New York:Springer-Verlag Wien, 1986. 236 p.
- HURST LD. Preliminary assessment of the impact of micro-RNA-mediated regulation on coding sequence evolution in mammals. **J Mol Evol**, v.63, n.2, p.174-182, 2006.
- IKONOMI P, NOGUCHI CT, MILLER W, et al. Levels of GATA1/GATA2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins. **Gene**, v. 261, p. 277-287, 2000.
- ISHII T, ITOH K, TAKAHASHI S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. **J Biol Chem**, v. 275, n. 21, p. 16023-16029, 2000.
- IWAYA T, FUKAGAWA T, SUZUKI Y, et al. Contrasting expression patterns of histone mRNA and microRNA 760 in patients with gastric cancer. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 23, p. 6438-6449, 2013.
- JEON HS, LEE SY, LEE EJ, et al. Combining microRNA-449a/b with a HDAC inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer. **Lung Cancer**, v. 76, n. 2, p. 171-176, 2012.
- JI Y, HE Y, LIU L, et al. MiRNA-26b regulates the expression of cyclooxygenase-2 in desferrioxamine-treated CNE cells. **FEBS Lett**, v. 584, n. 5, p. 961-967, 2010.
- JIANG J, BEST S, MENZEL S, et al. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. **Blood**, v. 108, p. 1077–1083, 2006.
- JOHNSON RM, BUCK S, CHIU C, et al. Fetal Globin Expression in New World Monkeys. **J Biol Chem**, v. 271, n. 25, p. 14684-14691, 1996.

- JOHNSON RM, GUMUCIO D, GOODMAN M. Globin gene switching in primates. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 133, n. 3, p. 877-883, 2002.
- KENT D, COPLEY M, BENZ C, et al. Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. **Clin Cancer Res**, v. 1, n. 14, p. 1926-1930, 2008.
- KIM VN, HAN J, SIOMI MC. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 126-139, 2009.
- KOŁODZIEJ KE. **Characterization of Transcription Factor Complexes involved in Globin Gene Regulation**. PhD Thesis. Erasmus University Medical Center Rotterdam, Department of Cell Biology; 2008.
- KOSAKA N, SUGIURA K, YAMAMOTO Y, et al. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. **Br J Haematol**, v. 142, n. 2, p. 293-300, 2008.
- KOUHKAN F, SOLEIMANI M, DALIRI M, et al. miR-451 Up-regulation, Induce Erythroid Differentiation of CD133+cells Independent of Cytokine Cocktails. **Iran J Basic Med Sci**, v. 16, n. 6, p. 756-763, 2013.
- KOVACIC P. Hydroxiurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Medical Hypothesis**, v. 76, n. 1, p. 24-31, 2010.
- KUROKAWA M, HIRAI H. Role of RUNX1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. **Cancer Sci**, v. 94, p. 841-846, 2003.
- LETTRE G, SANKARAN VG, BEZERRA MA, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and γ -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 33, p. 11869-11874, 2008.
- LI J, LI X, KONG X, et al. MiRNA-26b inhibits cellular proliferation by targeting CDK8 in breast cancer. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 3, p. 558-565, 2014.
- LINSLEY PS, SCHELTER J, BURCHARD J, et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 6, p. 2240-2252, 2007.
- LODISH H, BERK A, MATSUDAIRA P, et al. **Biologia Celular e Molecular**. 5ed. Porto Alegre. Artmed, 2005. 1054p.
- LYTLE JR, YARIO TA, STEITZ JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding in the 5'-UTR as in the 3'-UTR. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 9667-9672, 2007.
- MARENGO-ROWE AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **J Clin Pathol**, v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.

- MARTIN A, JONES A, BRYAR PJ, et al. MicroRNAs-449a and -449b exhibit tumor suppressive effects in retinoblastoma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 440, n. 4, p. 599-603, 2013.
- MARTINS CS, RAMALHO AS, SONATI MF, et al. Molecular characterisation of beta thalassaemia heterozygotes in Brazil. **J Med Genet**, v. 30, p. 797-798, 1993.
- McNALLY ME, COLLINS A, WOJCIK SE, et al. Concomitant dysregulation of microRNAs miR-151-3p and miR-126 correlates with improved survival in resected cholangiocarcinoma. **HPB (Oxford)**, v. 15, n. 4, p. 260-264, 2013.
- MEIRELES CMM, SCHNEIDER MPC, SAMPAIO MIC, et al. Fate of a redundant γ -globin gene in the atelid clade of New World monkeys: Implications concerning fetal globin gene expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 2607-2611, 1995.
- MENZEL S, GARNER C, GUT I, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nat Genet**, v. 39, n. 10, p. 1197-1199, 2007.
- MIYOSHI K, KANETO Y, KAWAI H, et al. X-linked dominant control of F-cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominantly by gene(s) on X chromosome. **Blood**, v. 72, p. 1854-1860, 1988.
- MPOLLO MS, BEAUDOIN M, BERG PE, et al. BP1 is a negative modulator of definitive erythropoiesis. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 18, p. 5232-5237, 2006.
- NAGEL RL, FABRY ME, STEINBERG MH. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Rev**, v. 17, p. 167-178, 2003.
- NEMATI H, RAHIMI Z, BAHRAMI G. The *XmnI* polymorphic site 5' to the $G\gamma$ gene and its correlation to the $G\gamma:A\gamma$ ratio, age at the first blood transfusion and clinical features in β -Thalassemia patients from Western Iran. **Mol Biol Rep**, v. 37, n. 1, p. 159-164, 2009.
- NGUYEN TKT, JOLY P, BARDEL C, et al. The *XmnI* $G\gamma$ polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 β -thalassemia intermedia patients. **Blood Cells Mol Dis**, v. 45, n. 2, p. 124-127, 2010.
- NI F, ZHAO H, CUI H et al. MicroRNA-362-5p promotes tumor growth and metastasis by targeting CYLD in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett**, v. 356, p. 809-818, 2015.
- NOBREGA MA, PENACCHIO LA. Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. **J Physiol**, v.554, n.1, p.31-39, 2003.
- NOH SJ, MILLER SH, LEE T, et al. Let-7 microRNAs are developmentally regulated in circulating human erythroid cells. **J Transl Med**, v. 7, p. 98, 2009.
- NOONAN EJ, PLACE RF, POOKOT D, et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. **Oncogene**, v. 28, n. 14, p. 1714-1724, 2009.

- NUSSBAUM RL, McINNES RR, WILLARD HF. **THOMPSON & THOMPSON**, Genética Médica, 7a ed., Editora Guanabara, cap. 11, p. 243-264, 2008.
- O'CARROLL D, MECKLENBRAUKER I, DAS PP, et al. A slicer independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. **Genes Dev**, v. 21, p. 1999-2004, 2007.
- OECKINGHAUS A, GHOSH S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 4, a000034, 2009.
- OLAVE IA, DONEANU C, FANG X, et al. Purification and Identification of Proteins That Bind to the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin -198 Mutation in the γ -Globin Gene Promoter. **J Biol Chem**, v. 282, n. 2, p. 853-862, 2007.
- ORKIN SH, KAZAZIAN HH, ANTONARAKIS SE, et al. Linkage of β -thalassemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. **Nature**, v. 296, p. 627-631, 1982.
- PARENT, S.A. et al. Molecular characterization of the murine SIGNR1 gene encoding a C-type lectin homologous to human DC-SIGN and DC-SIGNR, **Gene**, v.293, p.33-46, 2002.
- RAICH N, CLEGG CH, GROFTI J, et al. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human ϵ -globin gene. **EMBO J**, v. 14, n. 4, p. 801-809, 1995.
- RASMUSSEN KD, SIMMINI S, ABREU-GOODGER C, et al. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. **J Exp Med**, v. 207, n. 7, p. 1351-1358, 2010.
- RATHJEN T, NICOL C, McCONKEY G, et al. Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host. **FEBS Letters**, v. 580, p. 5185-5188, 2006.
- REES DC, WILLIAMS TN, GLADWIN MT. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, p. 2018-2031, 2010.
- REICHERT VCD, CASTRO SM, WAGNER SC, et al. Identification of β thalassemia mutations in South Brazilians. **Ann Hematol**, v. 87, p. 381-384, 2008.
- RIBEIL JA, ARLET JB, DUSSIOT M, et al. Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, 394295, 2013.
- ROCHA LBS, MARTINS MF, GONÇALVES RP. Distribuição das mutações da β -talassemia em Fortaleza, Ceará. **J Braz Patol Med Lab**, v. 46, n. 6, p. 437-441, 2010.
- ROPERO P, GONZÁLEZ FA, CELA E, et al. Association in cis of the mutations +20 (C>T) in the 5' untranslated region and IVS-II-745 (C>G) on the β -globin gene. **Hemoglobin**, v. 37, n. 2, p. 112-118, 2013.
- ROSSON D, O'BRIEN T. Constitutive c-myb expression in K562 cells inhibits induced erythroid differentiation but not tetradecanoyl phorbol acetate-induced megakaryocytic differentiation. **Mol Cell Biol**, v. 15, p. 772-779, 1995.

ROUMIER C, FENAUX P, LAFAGE M, et al. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. **Leukemia**, v. 17, n. 1, p. 9-16, 2003.

ROVERSI FM, CUNHA AF, LANARO C, et al. The -195C>G substitution in Brazilian hereditary persistence of fetal hemoglobin decreases NF-E1/YY1 binding and increases PAXI binding to the A γ globin promoter region. Proceedings of the 52nd Annual American Society of Hematology Meeting, Orlando, FL, USA, December 4-7, 2010. **Blood**, v. 11, n. 6, p. 857, 2010.

ROY-CHAUDHURI B, VALDMANIS PN, ZHANG Y, et al. Regulation of microRNA-mediated gene silencing by microRNA precursors. **Nat Struct Mol Biol**, v. 21, n. 9, p. 825-832, 2014.

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAMPIETRO M, THEIN SL, CONTRERAS M, et al. Variation of Hb F and F-cell number with the γ *XmnI* (C-T) polymorphism in normal individuals. **Blood**, v. 79, n. 3, p. 832-833, 1992.

SANGOKOYA C, TELEN MJ, CHI J. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. **Blood**, v. 116, p. 4338-4348, 2010.

SANKARAN VG, MENNE TE, XU, J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science**, v. 322, p. 1839-1842, 2008.

SANKARAN VG, MENNE TF, ŠĆEPANOVIĆ D, et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, n. 4, p. 1519-1524, 2011.

SANKARAN VG, ORKIN SH. The Switch from fetal to Adult Hemoglobin. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 1, p. a011643, 2013.

SANKARAN VG. Targeted Therapeutic Strategies for Fetal Hemoglobin Induction. **ASH**, p. 459-465, 2011.

SARAKUL O, VATTANAVIBOON P, TANAKA Y, et al. Enhanced erythroid cell differentiation in hypoxic condition is in part contributed by miR-210. **Blood Cells Mol Dis**, v. 51, n. 2, p. 98-103, 2013.

SCHECHTER AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, p. 3927-3938, 2008.

SERJEANT GR, SERJEANT BE. **Sickle cell disease**. Oxford, UK. Oxford University Press, 2001.

SHEN SS, SLIGHTOM JR, SMITHIES O. A history of the human fetal globin gene duplication. **Cell**, v. 26, p. 191-203, 1981.

SILVEIRA ZML, BARBOSA MV, FERNANDES TAAM, et al. Characterization of beta-thalassemia mutations in patients from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genet Mol Biol**, v. 34, n. 3, p. 425-428, 2011.

SILVESTRONI E, BIANCO I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am J Hum Genet**, v. 7, n. 2, p. 198-212, 1975.

SONG G, XU G, JI C, et al. The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. **Gene**, v. 533, n. 2, p. 481-487, 2014.

SOZA-RIED C, HESS I, NETUSCHIL N, et al. Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n. 40, p.17304-17308, 2010.

STAMATOYANNOPOULOS G, GROSVELD F. Hemoglobin switching. In: Stamatoyannopoulos G; Majerus PW; Perlmutter RM; Varmus H, eds. **The molecular basis of blood disease**. Philadelphia:Saunders, v. 3. Oxford University Press, New York, 2001.

STAMATOYANNOPOULOS G, NIENHUIS A, MAJERUS X, et al. **The molecular Basis of Blood diseases**. 2nd ed. Philadelphia:WB Saunders Company, 1994.

STAMATOYANNOPOULOS G, NIENHUIS AW. Hemoglobin Switching. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW (eds): **The Molecular Basis of Blood Diseases**. Philadelphia, PA, Saunders, 67p, 1987.

STEINBERG MH, CHUI DHK, DOVER GJ, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? **Blood**, v. 123, n. 4, p. 481-485, 2014.

STEINBERG MH, FORGET BG, HIGGS D, et al (eds). **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management**. Cambridge University Press, Cambridge, pp 356-388, 2001.

STEINBERG MH. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 340, p. 1021-1030, 1999.

STEINBERG MH. Pathophysiology of sickle cell disease. **Clinical Haematology**, v. 11, p. 163-184, 1998.

STEINBERG MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: Overview of molecular etiology, pathophysiology and therapeutic approaches. **Scientific World Journal**, v. 8, p. 1295-1324, 2008.

SUTTON M, BOUHASSIRA EE, NAGEL RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene *cluster* haplotypes. **Am J Hematol**, v. 32, p. 66-69, 1989.

- SVASTI S, MASAKI S, PENGLONG T, et al. Expression of micro-RNA-451 in normal and thalassemia erythropoiesis. **Ann Hematol**, v.89, n.10, p. 953-958, 2010.
- TALLACK MR, PERKINS AC. KLF1 Directly Coordinates Almost All Aspects of Terminal Erythroid Differentiation. **Life**, v. 62, n. 12, p. 886-890, 2010.
- THEIN SL, MENZEL S, LATHROP M, et al. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Hum Mol Genet**, v. 18, p. 216-223, 2009.
- THEIN SL, MENZEL S, PENG X, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 27, p. 11346-11351, 2007.
- THEIN SL. Genetic insights into the clinical diversity of β -thalassaemia. **Br J Haematol**, v. 124, n. 3, p. 264-274, 2004.
- THEIN SL. Genetic Modifiers of β -Thalassemia. **Haematologica**, v. 90, p. 649-660, 2005.
- TOUCHMAN JW, DEHEJIA A, CHIBA-FALEK O et al. Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. **Genome Res**, v.11, p.78-76, 2001.
- TRINITY BIOTECH. **Ultra² with ResolutionTM Software Analytical System for Hemoglobinopathies: Operator's Manual**. Volume 10, 2011.
- UDA M, GALANELLO R, SANNA S, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 1620–1625, 2008.
- VELLA F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. **Am J Clin Pathol**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.
- WAHLBERG K, JIANG J, ROOKS H, et al. The *HBSIL-MYB* intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. **Blood**, v. 114, p. 1254-1262, 2009.
- WALKER AL, STEWARD S, HOWARD TA, et al. Epigenetic and molecular profiles of erythroid cells after hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 20, p. 5664-5670, 2011.
- WARE RE, DESPOTOVIC JM, MORTIER NA, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 18, p. 4985-4991, 2011.
- WEATHERALL DJ, CLEGG J. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull World Health Organ**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WEATHERALL DJ, CLEGG J. **The Thalassemia Syndromes**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1981.

WU J, BAO J, KIM M, et al. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 111, n. 28, p. e2851-7, 2014.

WU L, BELASCO JG. Micro-RNA regulation of the mammalian α -28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. **Mol Cell Biol**, v.25, n.21, p.9198-9208, 2005.

XU G, SHI C, JI C, et al. Expression of microRNA-26b, an obesity-related microRNA, is regulated by free fatty acids, glucose, dexamethasone and growth hormone in human adipocytes. **Mol Med Rep**, v. 10, n. 1, p. 223-228, 2014.

XU J, SANKARAN VG, NI M, et al. Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. **Genes Dev**, v. 24, p. 783-798, 2010.

XU X, HONG X, WANG G. Induction of endogenous γ -globin gene expression with decoy oligonucleotide targeting Oct-1 transcription factor consensus sequence. **J Hematol Oncol**, v. 2, n. 15, p. 1-11, 2009.

YAVARIAN M, HARTEVELD CL, BATELAAN D, et al. Molecular spectrum of beta-thalassemia in the Iranian Province of Hormozgan. **Hemoglobin**, v. 25, n. 1, p. 35-43, 2001.

YOSHIOKA Y, KOSAKA N, OCHIYA T, et al. Hypoxia-Inducible Micro-RNA-210 Suppresses Iron Homeostasis-Related Proteins. **J Biol Chem**, v. 287, n. 41, p. 34110-34119, 2012.

YUN WJ, KIM YW, KANG Y, et al. The hematopoietic regulator TAL1 is required for chromatin looping between the β -globin LCR and human γ -globin genes to activate transcription. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. 7, p. 4283-4293, 2014.

ZAGO MA, COSTA FF. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 79, n. 3, p. 385-388, 1985.

ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. Edição Revista e Atualizada. Editora Ateneu. cap. 29, p. 279-287, 2004.

ZAGO MA, PINTO ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZHANG X, LI W: 5-Fluorouracil in combination with cisplatin alters the microRNA expression profile in the CNE nasopharyngeal carcinoma cell line. **Mol Med Rep**, v. 6, n. 2, p. 303-308, 2012.

ZHAO H, KALOTA A, JIN S, et al. The c-myb proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells. **Blood**, v. 113, n. 3, p. 505-516, 2009.

ZHOU W, CLOUSTON DR, WANG X, et al. Induction of human fetal globin gene expression by a novel erythroid factor, NF-E4. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 20, p. 7662-7672, 2000.

ZHOU W, ZHAO Q, SUTTON R, et al. The role of p22 NF-E4 in human globin gene switching. **J Biol Chem**, v. 79, n. 25, p. 26227-26239, 2004.

ZHU X, WANG Y, PI W, et al. NF-Y recruits both Transcription Activator and Repressor to Modulate Tissue- and Developmental Stage-Specific Expression of Human γ -Globin Gene. **Plos One**, v. 7, n. 10, p. e47175, 2012.

Apêndice

7 Apêndice

Artigo científico aceito na revista *Evolutionary Bioinformatics* (ISSN: 1176-9343; FI 1,169) resultante da compilação dos dados provenientes das análises de *footprinting* filogenético a respeito dos fatores de transcrição, envolvidos na regulação da Hb F, que apresentam sítios de ligação nas regiões não codificantes dos genes *HBG1* e *HBG2*.

Screening of Transcription Factors involved in Fetal Hemoglobin regulation using Phylogenetic Footprinting

Gisele Cristine de Souza Carrocini¹, Larissa Paola Rodrigues Venancio¹, Claudia Regina Bonini-Domingos¹

¹ Laboratory of Hemoglobin and Genetics of Hematologic Diseases, Department of Biology, São Paulo State University –UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Corresponding author: Claudia Regina Bonini-Domingos
Laboratory of Hemoglobin and Genetics of Hematologic Diseases
Sao Paulo State University
+55 17 3221-2392 (telephone)
+55 17 3221-2390 (fax)
claudiabonini@sjrp.unesp.br

Abstract

Fetal Hemoglobin (Hb F) is an important genetic modulator of the beta-hemoglobinopathies. The regulation of Hb F levels is influenced by transcription factors. We used phylogenetic footprinting to screen transcription factors that have binding sites in *HBG1* and *HBG2* genes' noncoding regions in order to know the genetic determinants of the Hb F expression. Our analysis showed 354 conserved motifs in noncoding regions of *HBG1* gene and 231 motifs in the *HBG2* gene between the analyzed species. Of these, 13 showed relation to Hb F regulation: CDC5, c-MYB, CP2, GATA-1, GATA-2, NF-E2, NF-Y, RUNX-1, TAL-1, YY1, BP1, COUP-TFII and PAX-1, which the last three elements conserved only in the *HBG1* gene noncoding regions. The understanding of genetic elements involved in the maintenance of high Hb F levels may provide new efficient therapeutic strategies in the beta-hemoglobinopathies treatment, promoting reduction of clinical complications of these genetic disorders.

Keywords: Hb F, beta-hemoglobinopathies, transcription factors, phylogenetic footprinting.

Introduction:

Fetal hemoglobin (Hb F), which consists of two alpha-globin chains and two gamma-globin chains ($\alpha_2\gamma_2$), is predominantly expressed in the fetal period. Its levels decrease to less than 1% of total hemoglobin in adult life, the period in which adult hemoglobin (Hb A) ($\alpha_2\beta_2$) represents most of the composition. Through their high affinity for binding to oxygen molecules, the increased Hb F concentrations act as a modulator of the phenotype of beta-hemoglobinopathies, hemolytic anemias that result from beta-globin gene mutations.^{1,2} In sickle cell disease, high Hb F levels may dilute the amount of Hb S (HBB:c.20A>T), thus inhibiting or retarding the polymerization process. This change reduces the severity of the disease.³ In the thalassemia beta major, the increased production of γ -globin chains reduces the imbalance of the α chain/non- α chain and increases the total hemoglobin synthesis. Thus, the increase in γ -globin gene expression is clinically relevant in the treatment of diseases in which altered beta globin is involved.^{2,4,5}

The evolutionary process of the γ -globin genes differed during the divergence of mammals. Prosimian primates (Suborder Strepsirhini) have a single γ -globin gene, the expression of which occurs in embryonic stage, along with ϵ -globin gene expression. Simian primates (Suborder Haplorhini) have two γ -globin genes, the expression of which occurs during the fetal period, a change which differed from that seen in prosimians.^{6,7} Molecular evidence suggests that γ -globin gene expression during the fetal period may have occurred after the divergence between prosimians and apes, approximately 55 million years ago.⁸ The evolutionary history of these genes indicates the occurrence of a tandem duplication of 5.5-kilobase (kb) DNA fragment, before the divergence between Platyrrhini and Catarrhini occurred (approximately 35 million years ago). Based on this information, it is believed that fetal γ -globin gene recruitment and gene duplication occurred during the same period of evolutionary history.^{8,9}

After gene duplication, the coding regions of the γ^G -globin (*HBG2*) and γ^A -globin (*HBG1*) genes differed by only one amino acid at position 136 of the polypeptide chain, while the noncoding (introns) and transcribed and untranslated (5' and 3'-UTR) regions differ by 3% and 14%, respectively.¹⁰ Although apes present two γ -globin genes, the activation and expression periods of these genes differ. In Platyrrhini, only one of the γ -globin genes are functional; in Catarrhini, both genes are expressed.^{6,8}

Hb F regulation is influenced by transcription factors. These genetic elements act in the globin gene regulation and in the switch from Hb F to Hb A expression. This process

involves factors that are well established in the literature, including BCL11A and SOX6.¹¹⁻¹³

Because the beta-hemoglobinopathies are considered the most common monogenic diseases in the world, and because high Hb F concentrations in these conditions may result in clinical improvement of patients,^{14,15} knowledge of transcription factors that act in Hb F regulation can reveal an important area in which therapeutic strategies and pharmacological agents are needed in order to increase the life expectancy of patients.

The aim of this study was to use phylogenetic footprinting to screen transcription factors that have binding sites in the γ -globin genes' noncoding regions in order to understand the genetic determinants that act in the modulation of Hb F levels.

Methods:

We used the VISTA bioinformatics tool (<http://www-gsd.lbl.gov/vista/>), which identifies conservation patterns on a genome-wide scale.^{16,17} Phylogenetic footprinting analysis was used to identify regulatory elements conserved between different species. The decision to use this method was based on the assumption that sequences of biological importance and noncoding regions in particular, are conserved among related species as a result of functional pressure. Thus, the identification of conserved elements in the noncoding regions of the γ -globin genes may indicate that these elements play a functional role in gene regulation and, consequently, in the maintenance of Hb F levels.

Because they present differences in noncoding regions, both γ -globin genes (*HBG1* and *HBG2*) were included in the phylogenetic footprinting analysis. The sequences of the New World monkeys, popularly known as the common marmoset (*Callitrix jacchus*) and tufted capuchin (*Cebus apella*), those of Old World monkeys known as the Sumatran orangutan (*Pongo abelli*), the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) the chimpanzee (*Pan troglodytes*), and the tarsier monkey (*Tarsius syrichta*), one basal primate in the Haplorrhini suborder, were all compared to human (*Homo sapiens*) γ -globin gene sequences in order to search for transcription factors involved in the regulation of these genes. The gene sequences for each species were obtained from the National Center for Biotechnology Information database (NCBI) under the following gene IDs: *Homo sapiens* (GenBank: NG_000007.3), *Pan troglodytes* (GenBank: NW_001249430.1), *Macaca mulatta* (GenBank: NC_007871.1), *Pongo abelli* (GenBank: NC_012602.1), *Callitrix jacchus* (GenBank: NC_013906.1), *Cebus apella* (GenBank: U57043.1) and *Tarsius syrichta* (GenBank: M3397.1).

The computational scheme for alignment and conservation analysis was based on the local alignment program known as BLAT (BLAST-Like Alignment Tool) in order to identify homology. The data was then processed and globally aligned using the mLAGAN (multiple alignment) program. Alignments were visualized in the VISTA Browser by defining the colors and patterns of "peaks and valleys". Next, the conservation of the region was evaluated. For the conservation evaluation, we used the program's default parameters (70% identity over 100 bp). To identify transcription factors rVISTA was used. It associates the TRANSFAC database (913 motifs) with the comparative sequences analysis.¹⁸

Results and Discussion:

The comparison of the gene sequences in noncoding regions of the human γ -globin genes to those of *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Pongo abelli*, *Callitrix jacchus*, *Cebus apella* and *Tarsius syrichta* revealed conservation levels above 70% over 100 bp of the γ -globin gene, according to the criteria established using the VISTA tools. The similarity pattern observed in the coding regions was expected from the comparison of the selected species, since these sequences are responsible for specific protein coding during the development of the organism. The high degree of similarity observed in the noncoding regions suggests the existence of functionality conserved between compared species. Noncoding regions that have high rates of conservation may indicate potential binding sites for specific transcription factors.¹⁸⁻²⁰

The results showed that the conservation degree observed when both γ -globin gene sequences were compared differed between the species analyzed, and that the *HBG1* gene was found to have higher levels of conservation (Figure 1).

The phylogenetic footprinting analysis and the screening of the transcription factors based on the TRANSFAC database revealed 354 conserved motifs in noncoding regions of the *HBG1* gene and 231 motifs of the *HBG2* gene among the species analyzed. After analyzing the information in the literature regarding the role and involvement of each of these transcription factors in Hb F modulation, we identified 13 elements involved in γ^A -globin gene regulation and 10 elements associated with γ^G -globin gene regulation.

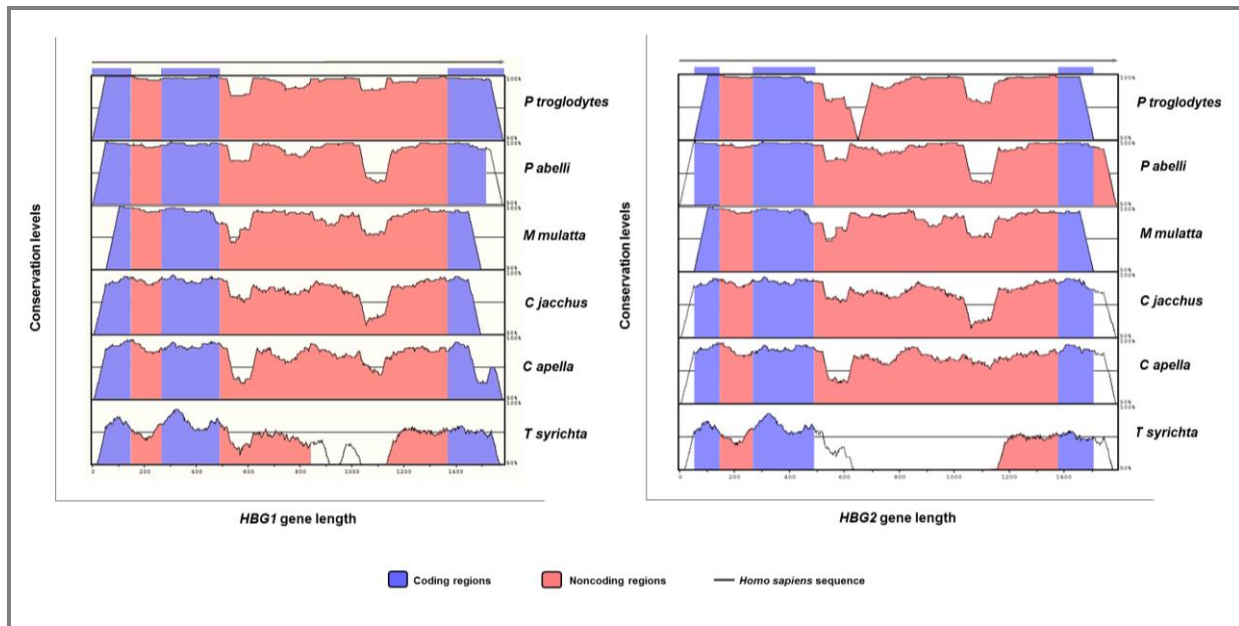


Figure 1: VISTA plots obtained from the genomic sequences comparison analysis of the noncoding regions from the γ -globin genes. Plots contained genomic sequences of γ^A -globin and γ^G -globin genes from *Homo sapiens* (gray arrow), *Pan troglodytes* (line 1), *Pongo abelli* (line 2), *Macaca mulatta* (line 3), *Callithrix jacchus* (line 4), *Cebus apella* (line 5) and *Tarsius syrichta* (line 6), showing the “peaks and valleys” patterns. In blue are represented γ -globin coding regions (exons) and in red are represented noncoding regions (introns). The results indicate similarity conservation of coding and noncoding sequences greater than 70%, suggesting functionality for noncoding regions.

The 10 transcription factor candidates for the regulation of both γ -globin genes are CDC5, c-MYB, CP2, GATA-1, GATA-2, NF-E2, NF-Y, RUNX-1, TAL-1, and YY1. Three other transcription factors (BP1, COUP-TFII and PAX-1) are involved in γ^A -globin gene regulation, but not in γ^G -globin gene regulation. Among the transcription factors highlighted in our analysis, some behave as transcriptional activators of the γ -globin genes and thus act as positive regulators of Hb F expression. Meanwhile, some regulatory elements are transcriptional repressors and other factors form protein complexes that act in the regulation of the globin genes. There also transcription factors that act indirectly in γ -globin gene regulation.

GATA-2 and TAL-1 are transcriptional activators of the γ -globin genes. GATA-2 (GATA binding protein 2) is expressed during the initial stages of the precursor hematopoietic lineage and appears to be involved in self-renewal, proliferation and cell survival. Some reports have shown that the β -globin gene cluster has 16 binding sites preserved for the GATA transcription factor, and most of these sites are located in the LCR. Furthermore, only the ϵ -globin gene and the γ -globin genes have GATA binding sites, which are absent from the δ -globin gene and the β -globin gene.²¹ TAL-1 (T-cell

acute lymphocytic leukemia 1) participates in the chromatin looping formation between the LCR and the γ -globin gene, and it acts by recruiting required proteins in looping formation (Ldb1 and LMO2, for example).²² By promoting interaction between the gene and the regulatory region, TAL-1 acts as an activator of Hb F expression.

Some activators of the γ -globin genes are involved in HPFH mutations. When combined with DNMT1, RAP74, and SNEV, CDC5 (cell division cycle-5) can bind to the single point mutation -198 (T > C) (British nondeletional HPFH) in the γ^A -globin gene promoter, the Hb F levels of which range from 1.8% to 13%.^{23,24} In Brazilian non-deletional HPFH (γ^A -195 C>G), PAX-1 (paired box 1) is able to bind to the TTCCGC sequence in the *HBG1* gene promoter only in the presence of this mutation, a finding which indicates that this transcription factor may play a role in the activation of Hb F expression.²⁵ The binding of these transcription factors in point mutations that generate increased Hb F levels may indicate that these genetic elements play a role as regulators of Hb F concentrations.

BP1 (beta protein 1) and CP2 (transcription factor CP2) are indirect transcriptional activators of the γ -globin genes. BP1 reduces β -globin gene expression in cells of the erythroid lineage, both in the early stages of cell maturation and in fully mature cells. It acts as a negative regulator of adult Hb levels (Hb AA)²⁶ and may act as an upregulation factor of Hb F. CP2 is involved in the transcriptional activation of the α -globin genes and plays an important role in globin gene switch expression through the formation of a protein complex with GATA-1.^{27,28} Along with NF-E4 (nuclear factor erythroid 4), CP2 forms the heterodimeric protein complex SSP (stage selector protein), which is involved in the preferential expression of the γ -globin genes.²⁹

In contrast, c-MYB (myeloblastosis viral oncogene homolog), COUP-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II) and GATA-1 (GATA binding protein 1) act as negative regulators of Hb F levels. c-MYB regulates erythroid progenitor differentiation.³⁰ Literature reports have shown that elevated c-MYB levels inhibit γ -globin expression in the K562 cell line,³¹ and they feature this transcription factor as a negative regulator of Hb F levels. Aerbajinai and colleagues³² used siRNA transfection to show that the knockdown of COUP-TFII resulted in the induction of γ -globin gene expression during adult erythropoiesis. Furthermore, COUP-TFII joins to the BCL11A transcription factor through RID1 and RID2 motifs, thus forming a repressor complex that is able to bind to key regulation regions in Hb F genes.³³ GATA-1 is essential for survival and terminal maturation of erythroid precursors.²¹ In the case of globin gene regulation, GATA-1 has

been identified as a transcription factor involved in silencing the γ -globin genes due to its participation in the formation of the Hb F repressor protein complex, examples of which include the association with BCL11A, SOX6, FOG1 and NuRD¹³ and the association with NF-Y, COUP-TFII and BCL11A.³⁴ Moreover, the loss of GATA-1 binding sites in γ -globin gene promoters influences the prevention of *HBG1* and *HBG2* gene silencing.³⁵

YY1 (YY1 transcription factor) acts by activating and repressing a variable number of genes through histone modifications.²⁷ The literature reported that YY1 consists of a transcriptional repressor of ϵ -globin and γ -globin genes.^{36,25} In Brazilian nondelecional HPFH (- 195 C>G), authors reported decreased interaction between YY1 and the *HBG1* gene promoter region, which thus reduced the repressional activity exerted by this transcription factor.²⁵

RUNX-1 (runt-related transcription factor 1) regulates the expression of specific genes involved in the control of hematopoiesis.^{37,38} The NF-E2 transcription factor (nuclear factor erythroid 2) is an important element that regulates the globin gene expression and acts in the formation of the components of the hemoglobin molecule.^{39,40}

NF-Y (nuclear transcription factor Y) is involved in both γ -globin gene activation and the repression processes. In general, NF-Y recruits GATA-2 and thus forms an activating complex of γ -globin gene transcription, and BCL11A, GATA-1, and COUPTFII. In doing so, a complex that acts as a transcriptional repressor is formed.³⁴ Thus, the NF-Y transcription factor can act as either an activator or a repressor of γ -globin gene expression, depending on the regulator elements recruited.

Figure 2 shows the possible mechanisms of interaction exerted by the transcription factors selected from the *in silico* analysis in hematopoietic processes, erythropoietic processes, and the regulation of globin gene expression.

In addition to the 13 transcription factors in our analysis, other elements are known for regulating γ -globin gene expression. They include Krüppel-like factor family members and NF-E4. KLF1 (Krüppel-like factor 1) is an indirect repressor of γ -globin gene expression. KLF1 activates the expression of BCL11A, a transcription factor known as a key repressor of Hb F expression.⁴¹ KLF11 (Krüppel-like factor 11) is predominantly expressed in the erythroid lineage cells. Gene expression studies have revealed that KLF11 can act as a transcriptional activator of embryonic and fetal globin.⁴² The transcription factor known as NF-E4, which is part of the SSP complex along with CP2, can direct the locus control region (LCR) to the promoter regions of the γ -globin genes and thus maintain high Hb F levels.^{29,43} However, these factors are not conserved among species of the

suborders Catarrhini and Platyrrhini. When we compared only the primates of the Old World and the New World to each other, these transcription factors were found to be conserved. Thus, we can infer that these elements do not exert significant influence on Hb F production in *T. syrichta*. In this species, hemoglobin is encoded with ϵ -globin in the embryonic period; like happens on globin ontogeny of other analyzed primates.

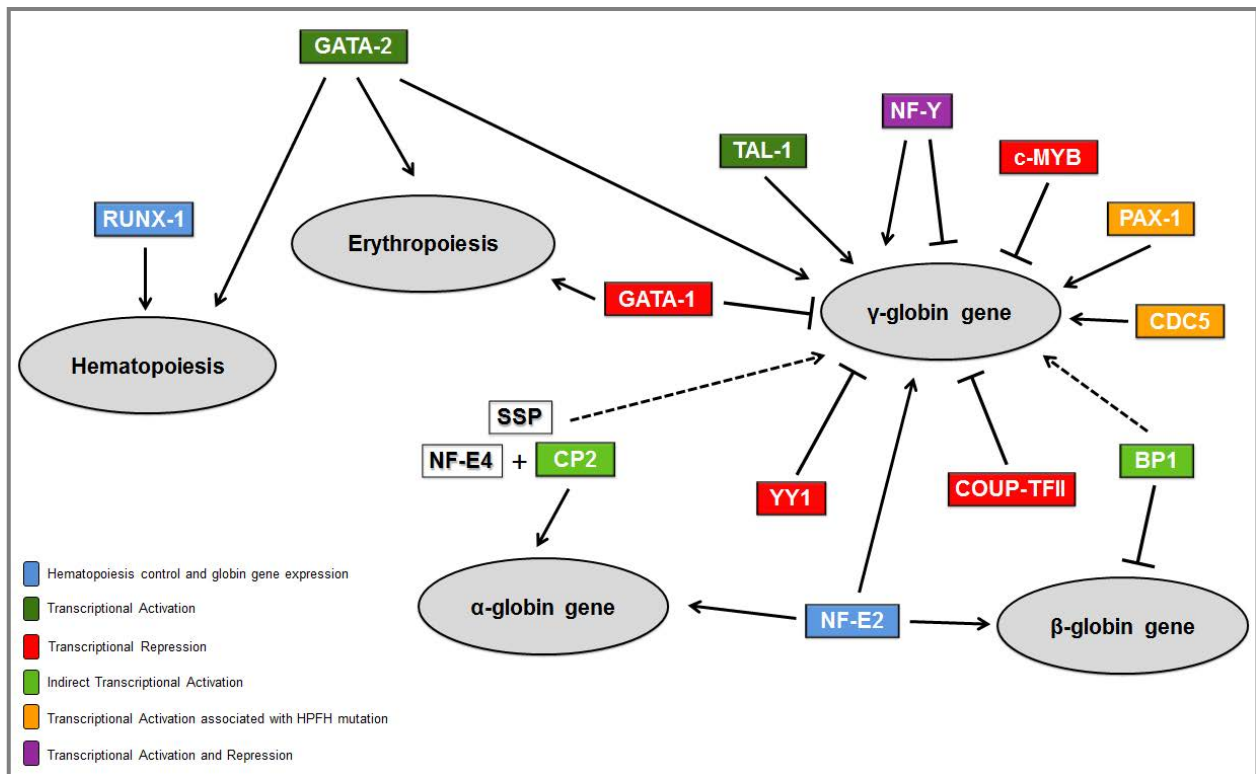


Figure 2: Representation of the interaction between transcription factors and regulation of hematopoiesis, erythropoiesis and the globin genes. The 13 transcription factors selected from in silico analysis are shown. The continuous arrows indicate elements that act as transcriptional activators. The dashed arrows indicate indirect activators. The bars show transcriptional repressors. Boxes without staining (NF-E4 and SSP) indicate factors that comprising protein complexes involved in globin regulation. The different colors of transcription factors represent different forms of action, among them direct transcriptional activation (dark green), transcriptional activation mediated by the presence of specific mutations (orange), indirect transcriptional activation (light green), transcriptional repression (red) and control of hematopoiesis, erythropoiesis and synthesis of globin chains (blue). We used the Microsoft Power Point to elaborate this figure.

Our results corroborate the reports in the literature on the participation of numerous genetic factors in γ -globin gene regulation. Many studies have revealed genetic regulators that can provide promising information for the development of effective strategies for the induction of Hb F levels.^{1,11,44,45} Sankaran and Orkin¹⁵ performed a literature review regarding the elements that act in the switch from Hb F to Hb A expression, and they showed that most of the molecules identified as regulators in this process are transcription

factors. These findings reinforce the importance of screening such regulatory elements in order to provide more accurate information on these factors' mechanisms of action in the increase of Hb F levels. Ideally, this information will result in the clinical improvement of patients with beta-hemoglobinopathies.

Conclusion:

Based on the results provided via phylogenetic footprinting analysis and a subsequent overview of the literature, the noncoding regions of γ^A -globin gene have been found to have binding sites for 13 conserved transcription factor motifs involved in Hb F regulation between Old World monkeys, New world monkeys, and Tarsidae, while the noncoding regions of γ^G -globin gene have 10 elements. Knowledge of the genetic elements involved in γ -globin gene regulation forms the basis of new molecular strategies that can be used in the treatment of diseases in which elevated Hb F levels can reduce clinical manifestations and provide longer life expectancies for individuals with these disorders.

Funding sources

We would like to thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant #2011/15570-1, for financial support.

Authors' Contributions

GCSC participated in the *in silico* analysis, the search for transcription factors literature information, interpretation of data and paper writing. LPRV participated *in silico* analysis and interpretation of data. CRBD participated in the interpretation of results. All authors read and approved the paper.

Disclosures and Ethics

The authors of this paper declare no conflict of interest and that this article is unique and is not under consideration or published in any other publication.

References

1. Menzel S, Garner C, Gut I, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet.* 2007;39(10):1197-1199.
2. Xu XS, Hong X, Wang G. Induction of endogenous γ -globin gene expression with decoy oligonucleotide targeting Oct-1 transcription factor consensus sequence. *J Hematol Oncol.* 2009;2(15):1-11.
3. Steinberg MH. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. *ScientificWorldJournal.* 2009;9:46-67.
4. Galanello R, Cao A. Relationship between Genotype and Phenotype. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;850:325-333.
5. Thein SL. Genetic Modifiers of β -Thalassemia. *Haematologica.* 2005;90:649-660.
6. Chiu CH, Schneider H, Schneider MP, et al. Reduction of two functional γ -globin genes to one: An evolutionary trend in New World monkeys (infraorder Platyrrhini). *PNAS.* 1996;93:6510-6515.
7. Johnson RM, Buck S, Chiu C, et al. Fetal Globin Expression in New World Monkeys. *J Biol Chem.* 1996;271(25):14684-14691.
8. Meireles CM, Schneider MP, Sampaio MI, et al. Fate of a redundant γ -globin gene in the atelid clade of New World monkeys: Implications concerning fetal globin gene expression. *PNAS.* 1995;92:2607-2611.
9. Johnson RM, Gumucio D, Goodman M. Globin gene switching in primates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002;133:877-883.
10. Manca L, Masala B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. *IUBMB Life.* 2008;60(2):94-111.
11. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 2008;322:1839-1842.
12. Chen Z, Luo HY, Steinberg MH, et al. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;42:144-149.
13. Xu J, Sankaran VG, Ni M, et al. Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev.* 2010;24:783-798.
14. Weatherall D, Akinyanju O, Fucharoen S, et al. Inherited disorders of hemoglobin. In: *Disease control priorities in developing countries.* 2nd edition. Oxford University Press, New York; 2006.

15. Sankaran VG, Orkin SH. The Switch from fetal to Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):a011643.
16. Cooper GM, Brudno M, Stone EA, et al. Characterization of evolutionary rates and constraints in three mammalian genomes. *Genome Res*. 2004;14(4):539-548.
17. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004;428(6982):493-521.
18. Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, et al. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:273-279.
19. Touchman JW, Dehejia A, Chiba-Falek O, et al. Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. *Genome Res*. 2001;11(1):78-76.
20. Bofelli D, Nobrega MA, Rubin EM. Comparative genomics at the vertebrate extremes. *Nat Rev Genet*. 2004;5(6):456-465.
21. Ikonomi P, Noguchi CT, Miller W, et al. Levels of GATA1/GATA2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins. *Gene*. 2000;261(2):277-287.
22. Yun WJ, Kim YW, Kang Y, et al. The hematopoietic regulator TAL1 is required for chromatin looping between the β -globin LCR and human γ -globin genes to activate transcription. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(7):4283-4293.
23. Olave IA, Doneanu C, Fang X, et al. Purification and Identification of Proteins That Bind to the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin -198 Mutation in the γ -Globin Gene Promoter. *J Biol Chem*. 2007;282(2):853-862.
24. Huisman HJ, et al. A database of human hemoglobin variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 1996. [Internet]. [cited 2013 Nov 20]. Available from: <http://globin.cse.psu.edu/>>
25. Roversi FM, Cunha AF, Lanaro C, et al. The -195C>G substitution in Brazilian hereditary persistence of fetal hemoglobin decreases NF-E1/YY1 binding and increases PAXI binding to the $A\gamma$ globin promoter region. Proceedings of the 52nd Annual American Society of Hematology Meeting, Orlando, FL, USA, December 4-7, 2010. *Blood*. 2010;116(21):857.
26. Mpollo MS, Beaudoin M, Berg PE, et al. BP1 is a negative modulator of definitive erythropoiesis. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(18):5232-5237.

27. National Center for Biotechnology Information. (cited 2013 Set 25]. Available from: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
28. Bosè F, Fugazza C, Casalgrandi M, et al. Functional Interaction of CP2 with GATA-1 in the Regulation of Erythroid Promoters. *Mol Cell Biol.* 2006;26(10):3942–3954.
29. Zhou W, Zhao Q, Sutton R, et al. The role of p22 NF-E4 in human globin gene switching. *J Biol Chem.* 2004;79(25):26227-26239.
30. Soza-Ried C, Hess I, Netuschil N, et al. Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved. *PNAS.* 2010;107(40):17304-17308.
31. Bauer DE, Kamran SC, Orkin SH. Reawakening fetal hemoglobin: Prospects for new therapies for the β -globin disorders. *Blood.* 2012;120(15):2945-2953.
32. Aerbajinai W, Zhu J, Kumkhaek C, et al. SCF induces γ -globin gene expression by regulating downstream transcription factor COUP-TFII. *Blood.* 2009;114(1):187-194.
33. Chan CM, Fulton J, Montiel-Duarte C, et al. A signature motif mediating selective interactions of BCL11A with the NR2E/F subfamily of orphan nuclear receptors. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(21):9663-9679.
34. Zhu X, Wang Y, Pi W, et al. NF-Y recruits both Transcription Activator and Repressor to Modulate Tissue- and Developmental Stage-Specific Expression of Human γ -Globin Gene. *Plos One.* 2012;7(10):e47175.
35. Chen ZHY, Luo RK, Basran TH, et al. A T-to-G transversion at nucleotide -567 upstream of HBG2 in a GATA-1 binding motif is associated with elevated hemoglobin F. *Mol Cell Biol.* 2008;28:4386-4393.
36. Raich N, Clegg CH, Grofti J, et al. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human ϵ -globin gene. *EMBO J.* 1995;14(4):801-809.
37. Roumier C, Fenaux P, Lafage M, et al. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia.* 2003;17(1):9-16.
38. Kurokawa M, Hirai H. Role of RUNX1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer Sci.* 2003;94:841-846.
39. Blank V, Kim MJ, Andrews NC. Human MafG Is a Functional Partner for p45 NF-E2 in Activating Globin Gene Expression. *Blood.* 1997;89:3925-3935.
40. Andrews NC. Molecules in focus: The NF-E2 transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30:429-432.
41. Tallack MR, Perkins AC. KLF1 Directly Coordinates Almost All Aspects of Terminal Erythroid Differentiation. *Life.* 2010;62(12):886-890.

-
42. Asano H, Li XS, Stamatouyannopoulos G. FKLf, a Novel Krüppel-Like Factor That Activates Human Embryonic and Fetal β -Like Globin Genes. *Mol Cell Biol.* 1999;19(5):3571–3579.
 43. Zhou W, Clouston DR, Wang X, et al. Induction of human fetal globin gene expression by a novel erythroid factor, NF-E4. *Mol Cell Biol.* 2000;20(20):7662-7672.
 44. Thein SL, Menzel S, Peng X, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *PNAS.* 2007;104(27):11346-11351.
 45. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB and β -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *PNAS.* 2008;105(33):11869-11874.

Anexos

8 Anexos

8.1 Anexo 1: Caracterização dos indivíduos com anemia falciforme analisados nesse estudo.

Caracterização dos indivíduos com anemia falciforme em uso de hidroxiureia (HU).

Local de Acompanhamento	ID	Idade (anos)	Sexo	Genótipo	Haplótipo β^S	Hb F (%)	Uso de HU (Início e Dose)	Quelante de ferro	Complicações Clínicas
Hemocentro SJRP	HU01	25	F	Hb SS	Bantu/Bantu	10,7	2012 (500mg/dia)	Não	Hepatite C
Hemocentro SJRP	HU02	30	M	Hb SS	Bantu/Bantu	29,9	2012 (500mg/dia)	Não	Úlcera de perna cicatrizada (3 anos)
Hemorio	HU03	51	F	Hb SS	Bantu/Bantu	11,9	2008 (500mg/dia)	Não	Úlcera de perna aberta (8 meses)
Hemorio	HU04	54	F	Hb SS	Bantu/Bantu	8,5	2013 (500mg/dia)	Não	Necrose avascular da cabeça do fêmur
Hemorio	HU05	49	F	Hb SS	Bantu/Bantu	8,4	2013 (500mg/dia)	Não	AVE, úlcera de perna fechada (3 anos)
Hemorio	HU06	12	M	Hb SS	Bantu/Bantu	8,7	2011 (500mg/dia)	Não	Necrose avascular da cabeça do fêmur
Hemorio	HU07	11	F	Hb SS	Bantu/Bantu	12	2006 (500mg/dia)	Não	Sem relato
Hemorio	HU08	11	M	Hb SS	Bantu/Bantu	15,5	2009 (500mg/dia)	Não	Esplenectomia
Hemorio	HU09	27	M	Hb SS	Bantu/Bantu	12,7	2005 (500mg/dia)	Não	AVE, hipotireoidismo, deficiência hormonal
Hemorio	HU10	31	F	Hb SS	Bantu/Bantu	8,0	2006 (500mg/dia)	Não	Úlcera de perna aberta, hepatite C

Legenda: SJRP = São José do Rio Preto – SP. AVE = acidente vascular encefálico.

Caracterização dos indivíduos com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia (HU).

Local de Acompanhamento	ID	Idade (anos)	Sexo	Genótipo	Haplótipo β^S	Hb F (%)	Regime Transfusional	Quelante de ferro	Complicações Clínicas
Hemorio	SS01	38	F	Hb SS	Bantu/Bantu	2,7	Transfusão de troca (30 dias)	Exjade	AVE, STA, osteonecrose
Hemorio	SS02	19	F	Hb SS	Bantu/Bantu	3,7	Transfusão de troca (30 dias)	Exjade	AVE
Hemorio	SS03	18	M	Hb SS	Bantu/Bantu	0,9	Transfusão de troca (30 dias)	Exjade	AVE com sequela motora (3 episódios)
Hemorio	SS04	17	F	Hb SS	Bantu/Bantu	1,2	Transfusão de troca (30 dias)	Exjade	AVE
Hemorio	SS05	16	M	Hb SS	Bantu/Bantu	3,0	Transfusão de troca (30 dias)	Exjade	AVE, sobrecarga de ferro hepática
Hemorio	SS06	56	F	Hb SS	Bantu/Bantu	4,5	Não	Não	Úlcera de perna (13 anos)

8.2 Anexo 2: Caracterização dos indivíduos com talassemia beta analisados nesse estudo.

Caracterização dos indivíduos portadores de talassemia beta β^0 .

Local de Acompanhamento	ID	Idade (anos)	Sexo	Genótipo	Fenótipo	Classificação Clínica	Hb F (%)
Hemorio	BZ01	15	F	IVSI-1 (G>A) / IVSI-6 (T>C)	β^0/β^+	Talassemia Maior	2,3
Hemorio	BZ02	35	F	IVSI-1 (G>A) / IVSI-6 (T>C)	β^0/β^+	Talassemia Maior	2,4
Hemorio	BZ03	7	M	IVSI-1 (G>A) / IVSI-1 (G>A)	β^0/β^0	Talassemia Maior	1,8
Hemorio	BZ04	15	M	CD39 (CAG>TAG) / IVSI-110 (G>A)	β^0/β^+	Talassemia Maior	6,1
Hemorio	BZ05	14	M	CD39 (CAG>TAG) / IVSII-745 (C>G) (associada 5' UTR Cap+20 (C>T))	β^0/β^+	Talassemia Maior	0,8
Hemorio	BZ06	28	F	CD15 (TGG>TGA) / SEQ	$\beta^0/$	Talassemia Maior	2,5
Hemorio	BZ07	41	M	CD39 (CAG>TAG) / IVSI-110 (G>A)	β^0/β^+	Talassemia Maior	2,7
Hemorio	BZ08	20	M	CD39 (CAG>TAG) / SEQ	$\beta^0/$	Talassemia Maior	2,5

Polimorfismo XmnI (C>T)	Haplótipo β -Tal (Haploview)	Polimorfismos no gene da β -globina
CC	V e [+ + - - + +] (33,7%) ou I e [+ + - - + -] (66,3%)	Não avaliado
CC	I e [+ + - - + +]	IVSII-16 (G>C)
CC	V e V	CD 2 (CAT>CAC), IVSII-16 (G>C), IVSII-666 (C>T)
CC	I e III	CD 2 (CAT>CAC)
CC	[+ + - - + -] e [+ - - + + +]	CD 2 (CAT>CAC), IVSII-16 (G>C), IVSII-74 (T>G), IVSII-81 (C>T)
CC	[+ + - - + -] e [+ + - - + + -]	Ausência de mutações
CC	[+ + - - + +] e [- - - + + -] (29%) ou I e [+ + - - + + -] (71%)	IVSII-16 (G>C), IVSII-74 (T>G)
CT	[+ + - - + +] e [+ + - - + +]	Não avaliado

Regime Transfusional	Sobregarga de Ferro	Quelante de Ferro	Deformidade Óssea	Esplenomegalia / Esplenectomia	Osteoporose	Úlcera de Perna
15 dias	Fígado	Ferriprox	Não	Sim	Não	Não
15 dias	Fígado	Exjade	Sim	Não	Não avaliado	Não
15 dias	Fígado e Coração	Ferriprox	Não	Sim	Não	Não
15 dias	Fígado e Coração	Exjade	Sim	Sim	Não	Não
15 dias	Fígado	Exjade	Não	Não	Sim	Não
15 dias	Fígado e Coração	Exjade	Sim	Sim	Sim	Não
15 dias	Ausente	Exjade	Não	Não	Não	Não
15 dias	Fígado	Exjade	Sim	Não	Não avaliado	Não

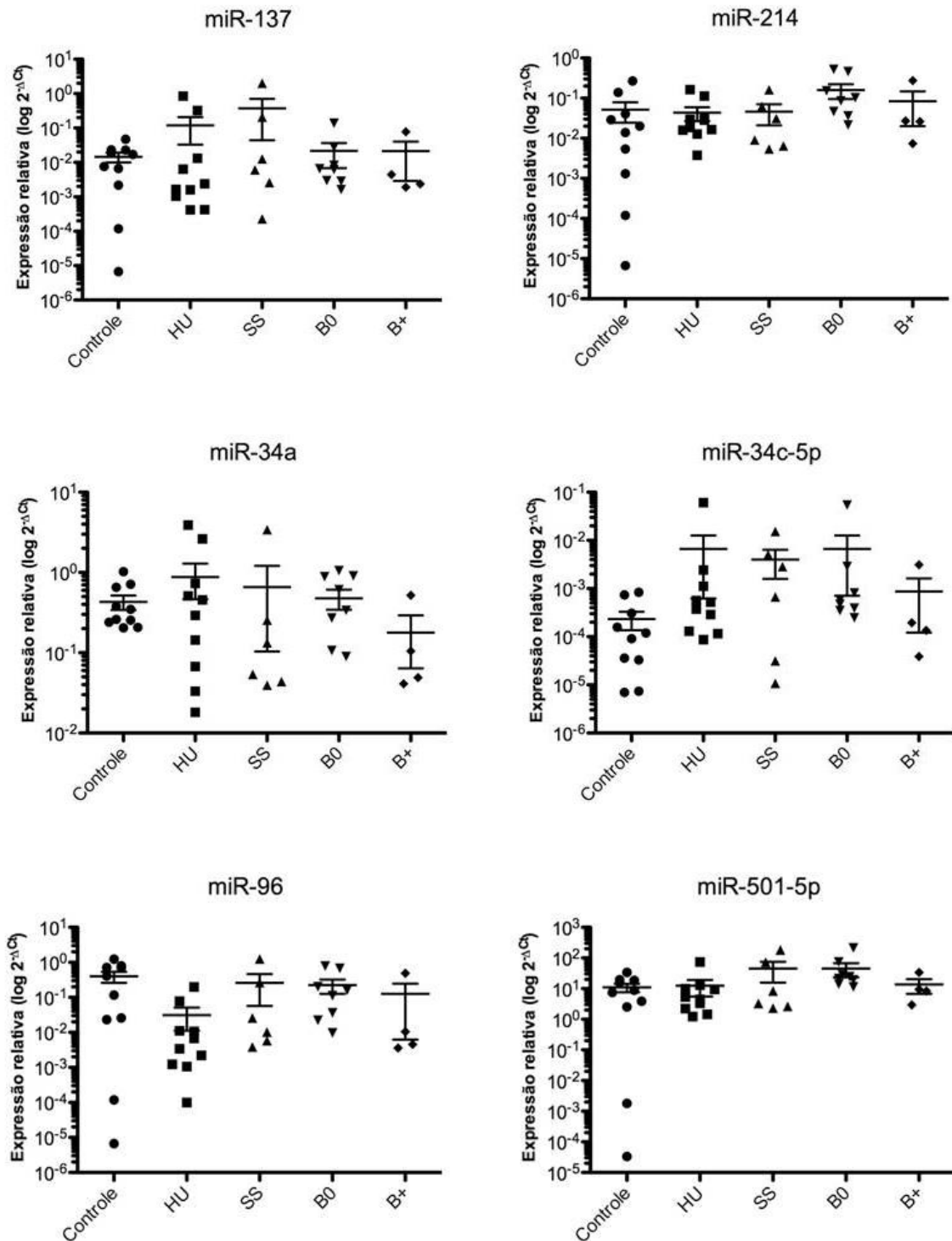
Caracterização dos indivíduos portadores de talassemia beta β^+ .

Local de Acompanhamento	ID	Idade (anos)	Sexo	Genótipo	Fenótipo	Classificação Clínica	Hb F (%)
Hemorio	BM01	58	M	IVSI-5 (G>A) / - 29 (A>G)	β^+/β^+	Talassemia intermediária	11,9
Hemorio	BM02	26	F	IVSI-6 (T>C) / - 88 (C>T)	β^+/β^+	Talassemia intermediária	13,4
Hemorio	BM03	59	M	CD24 (GGT>GGA) / SEQ	β^+/β^+	Talassemia intermediária	52,6
Hemorio	BM04	17	M	IVSI-6 (T>C) / IVSII-745 (C>G) (associada 5' UTR Cap+20 (C>T))	β^+/β^+	Talassemia Maior	1,7

Polimorfismo XmnI (C>T)	Haplótipo β -Tal (Haploview)	Polimorfismos no gene da β -globina
CT	I e III	CD 2 (CAT>CAC), IVSII-16 (G>C), IVSII-74 (T>G)
CT	[++--++] e [----+-] (29%) ou I e [++-+-] (71%)	IVSII-81 (C>T)
CC	III e [+- - - + +]	CD 2 (CAT>CAC), IVSII-16 (G>C), IVSII-74 (T>G)
CC	V e [++--++] (33,7%) ou I e [++-+-] (66,3%)	IVSII-81 (C>T)

Regime Transfusional	Sobregarga de Ferro	Quelante de Ferro	Deformidade Óssea	Esplenomegalia / Esplenectomia	Osteoporose	Úlcera de Perna
20 dias	Fígado	Exjade	Sim	Sim	Sim	Sim
Sem Transfusão	Fígado	Exjade	Não	Sim	Não	Não
Sem Transfusão	Fígado	Exjade	Não	Sim	Não	Sim
15 dias	Fígado	Exjade	Não	Sim	Não	Não

8.3 Anexo 3: Ausência de expressão diferencial dos miR-137, miR-214, miR-34a, miR-34c-5p, miR-96 e miR-501-5p nos grupos estudados.



Teste estatístico Kruskal-Wallis complementado por Dunn para os miR-137 ($p=0,5578$), miR-214 ($p=0,1778$), miR-34c-5p ($p=0,1046$), miR-96 ($p=0,0845$) e miR-501-5p ($p=0,0957$). Teste estatístico ANOVA *one-way* para o miR-34a ($p=0,5028$).

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura