

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

JOÃO PEDRO MAIA DE OLIVEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE PTEN EM PACIENTES
TALASSÊMICOS DEPENDENTES E NÃO DEPENDENTES DE
TRANSFUSÃO**

**SÃO CARLOS
2024**

JOÃO PEDRO MAIA DE OLIVEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE PTEN EM PACIENTES
TALASSÊMICOS DEPENDENTES E NÃO DEPENDENTES DE
TRANSFUSÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

**SÃO CARLOS
2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre guiando meu caminho, por me abençoar com mais essa oportunidade, além de me dar força em muitos momentos durante essa fase.

Aos meus familiares, por todo carinho, por todo apoio mesmo que de longe e por sempre torcerem por mim. Principalmente agradeço a minha esposa Vivian, que esteve comigo durante todo o processo, me apoiando nos momentos ruins e acreditando em mim quando eu mesmo já não acreditava mais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, que durante todo esse tempo, mesmo durante os momentos mais tensos, não deixou de se manter otimista e me encorajar. Muito mais do que a orientação e ensinamentos, agradeço pela amizade e parceria.

Mesmo que não estejam mais no laboratório, agradeço a Karen, Karina e Carla, que me receberam aqui quando cheguei anos atrás e que me auxiliaram com os primeiros experimentos. Eu não estaria aqui hoje sem os ensinamentos delas.

Aos demais colegas, presentes e passados do LBGA: Cleiton, Olinda, Jessica, Graziela, Fernanda, Mateus, Jeferson. Muito obrigado por todos os bons momentos que passamos juntos e por termos dividido essa louca aventura que é a vida no laboratório. Agradeço também aos amigos dos outros laboratórios, Evandro, Sérgio, Mirella, pelo café e pelas risadas e desabafos.

Agradeço ao professor Dr. Iran Malavazi pela parceria e ensinamentos.

Aos nossos colaboradores da Fundação HEMOPE e da UFPE, especialmente ao Prof. Dr. Marcos André, e seus alunos Igor, Diego e Gabriela, e ao Dr. Aderson.

Agradeço aos professores do departamento de genética, principalmente aos professores Dr. Felipe Roberti Teixeira, Dr. Marcos Roberto Chiaratti e Dr. Flávio Henrique Silva, e seus alunos, que abriram as portas de seus laboratórios para realização dos experimentos. Agradeço também as professoras Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius e Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes, pois, ainda que os experimentos não tenham dado certo, elas sempre estiveram dispostas a compartilhar seus ensinamentos.

Agradeço aos pacientes e voluntários por aceitarem participar desse trabalho;

A todos os funcionários do Departamento de Genética e Evolução que sempre foram muito atenciosos;

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução. A CAPES e a FAPESP pelo amparo financeiro como bolsa e manutenção do projeto

*“Tudo o que temos que decidir é o que fazer
com o tempo que nos é dado”*

(J.R.R. Tolkien)

RESUMO

A produção exacerbada de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) na beta talassemia causa significativos danos aos eritrócitos e está intimamente associada à fisiopatologia da doença. Neste contexto, a atuação do sistema de defesa antioxidante é de vital importância para a manutenção e sobrevivência dos eritrócitos. Um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa apontou importantes diferenças na produção das proteínas antioxidantes enzimáticas PRDX1 e PRDX2 entre indivíduos saudáveis, beta talassêmicos não dependentes de transfusão (BTNDT) e dependentes de transfusão (BTDT). Contudo, estudos complementares que busquem elucidar vias metabólicas e mecanismos moleculares envolvidos na regulação dessas enzimas são necessários. Neste sentido, PTEN se destaca como um interessante alvo, uma vez que dados da literatura mostram que esta é capaz de responder ao estresse oxidativo associando-se com a proteína PRDX1. Além disso, PTEN, em tumores, foi associada com a expressão de outras proteínas antioxidantes como PRDX1 e 2 e SOD1, no entanto, essa relação ainda não foi investigada na beta talassemia. Nossas análises de *PTEN* em pacientes BTNDT demonstrou um aumento de sua expressão gênica em relação ao grupo controle, já com relação ao grupo de pacientes BTDT observamos uma possível correlação de sua expressão com os índices de HbA/HbF dos pacientes. Observamos também um aumento da expressão de *PI3K* em pacientes BTNDT e também no grupo de pacientes BTDT associado aos maiores níveis de HbF. Com relação aos níveis proteicos, observamos uma redução significativa de PTEN nos pacientes BTDT comparados aos indivíduos saudáveis e pacientes BTNDT. Nossos resultados precisam de estudos mais aprofundados, porém, os resultados encontrados sugerem um papel importante desse gene na modulação da doença.

Palavras-chave: Beta talassemia, PTEN, Antioxidantes, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The exacerbated production of Reactive Oxygen Species (ROS) in beta-thalassemia causes significant damage to erythrocytes and is closely associated with the pathophysiology of the disease. In this context, the action of the antioxidant defense system is vital for the maintenance and survival of erythrocytes. A work carried out by our research group pointed out important differences in the production of the enzymatic antioxidant proteins PRDX1 and PRDX2 between healthy individuals, and patients with beta-thalassemia no transfusion dependent (BTNTD) and transfusion dependent (BTDD). However, complementary studies that seek to elucidate metabolic pathways and molecular mechanisms involved in regulating these enzymes are necessary. In this sense, the PTEN enzyme stands out as an interesting target, since literature data shows that it can respond to oxidative stress by associating with the PRDX1 protein. Furthermore, PTEN, in tumors, was associated with the expression of other antioxidant proteins such as PRDX1 and 2 and SOD1, however, this relationship has not yet been investigated in beta-thalassemia. Our analyses of *PTEN* in BTNTD patients demonstrated an increase in its gene expression in relation to the control group, while in relation to BTDD patients we observed a possible correlation of its expression with the patients' HbA/HbF levels. We also observed an increase in *PI3K* expression in BTNTD patients and also in the BTDD group associated with higher HbF levels. Regarding protein levels, we observed a significant reduction of PTEN in BTDD patients compared to healthy individuals and BTNTD patients. Our results require further study, however, the results found suggest an important role for this gene in modulating the disease.

Keywords: Beta-thalassemia, PTEN, Antioxidants, Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de eritropoese.....	14
Figura 2. Locais de hematopoese durante o desenvolvimento humano.....	15
Figura 3. Representação esquemática de uma molécula de hemoglobina.....	16
Figura 4. Grupamento dos genes de α e β globina e a produção de diferentes hemoglobinas durante o desenvolvimento humano.....	17
Figura 5. Fisiopatologia da beta talassemia.....	24
Figura 6. Fontes de ERO nos eritrócitos.....	27
Figura 7. Representação esquemática da estrutura de PTEN.....	31
Figura 8. Representação esquemática da via envolvendo PTEN e PI3K/AKT.....	32
Figura 9. Análise da expressão gênica de <i>PTEN</i> em reticulócitos pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão e dependentes de transfusão e indivíduos saudios.....	47
Figura 10. Análise da expressão gênica de <i>PTEN</i> em reticulócitos pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão e dependentes de transfusão e indivíduos saudios.....	49
Figura 11. Análise do conteúdo proteico de PTEN no lisado celular de eritrócitos de indivíduos saudios e pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão e dependente de transfusão.....	52
Figura 12. Análise da expressão genica de <i>PI3K</i> e <i>AKT</i> em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão e dependentes de transfusão e indivíduos saudios.....	55
Figura 13. Análise da expressão genica de <i>PI3K</i> e <i>AKT</i> em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão e dependentes de transfusão e indivíduos saudios.....	57
Figura 14. Análise da fosforilação de PTEN no lisado celular de eritrócitos de indivíduos saudios e em pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão e dependente de transfusão.....	59
Figura 15. Análise da expressão genica de <i>SHP2</i> em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão e dependentes de transfusão e indivíduos saudios.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de mutações que causam beta talassemia e sua distribuição.....	22
Tabela 2. Dados hematológicos dos pacientes.....	39
Tabela 3. Sequencias dos primers utilizados.....	43
Tabela 4. Matriz para Padronização da Concentração Ótima de Primers Forward e Reverse (nM)	44
Tabela 5. Parâmetros de importância para os <i>primers</i> caracterizados.....	45
Tabela 6. Parâmetros hematológicos dos pacientes beta talassêmicos dependentes de transfusões separados por níveis de HbA/HbF.....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A -	Adenina
ABRASTA -	Associação Brasileira de Talassemia
AKT -	serine/threonine kinase 1
BAC -	Gene constitutivo beta actina
C -	Citosina
CAT -	Catalase
cDNA -	DNA complementar
CEP -	Comitê de ética em pesquisa
Cys	Cisteína
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético
EPO -	Eritropoetina
ERO -	Espécies reativas de oxigênio
g -	Força G
G -	Guanina
GAPDH -	Gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GPX -	Glutathiona peroxidase
Hb -	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbF -	Hemoglobina fetal
IgG -	Imunoglobulina G
kDa -	Kilodáltons
LCR -	Região controladora do locus
NADPH -	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K-	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP2 -	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3 -	fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PRDX -	Peroxirredoxina
PTEN -	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
qRT-PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA -	Ácido Ribonucleico
RNA _m -	RNA mensageiro
SOD1 -	Superóxido Desmutase
T -	Timina
Trx -	Tiorredoxina
VCM-	Volume corpuscular médio

LISTA DE SÍMBOLOS

α -	Alfa
β -	Beta
δ -	Delta
ε -	Épsilon
γ -	Gama
ζ -	Zeta
θ -	Teta
α^1 -	Alfa 1
α^2 -	Alfa 2
γ^A -	Gama Adenina
γ^G -	Gama Glicina
O_2 -	Oxigênio
$-CH=$ -	Radicais Metanílicos
Fe^{++} -	Ferro Divalente
μg -	Micrograma
μL -	Microlitro
μM -	Micromolar
$O_2^{\cdot-}$	Radical ânion superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\cdot OH$	Radical hidroxila

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1 Eritropoese.....	14
1.2 As globinas.....	16
1.3 Anemias Hemolíticas.....	18
1.3.1 Hemoglobinopatias.....	19
1.4 Talassemias.....	20
1.4.1 Beta Talassemia.....	20
1.4.1.1 Alterações Moleculares.....	21
1.4.1.2 Fisiopatologia.....	23
1.4.2 Formas Clínicas da Beta Talassemia.....	25
1.4.2.1 Traço talassêmico (BTMe).....	25
1.4.2.2 Beta Talassemia Dependente de Transfusão (BTDT).....	25
1.4.2.3 Beta Talassemia Não Dependente de transfusão (BTNDT).....	26
1.5 Anemias hemolíticas e Estresse oxidativo.....	26
1.6 Defesas celulares contra o Estresse Oxidativo.....	28
1.7 PTEN (Phosphatase and tensin homolog).....	30
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	38
4.2 Pacientes e controles.....	38
4.3 Separação de reticulócitos.....	39
4.4 Extração de RNA.....	40
4.5 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	41
4.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	42
4.7 Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real.....	43
4.7.1 Concentração de <i>primers</i>	43
4.7.2 Eficiência de reação.....	44
4.8 Western Blotting.....	45
4.9 Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47

5.1 Níveis de RNAm de <i>PTEN</i> é alterado em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão.....	47
5.2 Avaliação do conteúdo proteico de PTEN revela importante redução na presença da proteína em pacientes beta talassêmicos dependentes de transfusões.....	51
5.3 A expressão de <i>PI3K</i> é aumentada em pacientes talassêmicos.....	54
5.4 Avaliação do estado de fosforilação de PTEN sugere uma queda em pacientes BTDT.....	58
5.5 Avaliação de <i>SHP2</i> não revela diferenças significativas entre os grupos de pacientes estudados.....	60
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Eritropoese

A célula eritroide, também denominada hemácia ou glóbulo vermelho, representa cerca de 40 a 45% do volume sanguíneo total, compondo mais de 90% dos elementos figurados. A produção dessas células em humanos deriva do processo chamado eritropoese, que acontece na medula óssea, envolvendo uma gama de células em estágios diferentes. A eritropoese é regulada principalmente pela eritropoetina (EPO), hormônio este produzido principalmente nos rins que estimula a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas. A primeira célula morfológicamente identificável como da linhagem eritroide é o proeritroblasto, que passa por várias modificações que levarão a célula a diferenciar-se em eritroblasto basofílico, eritroblasto policromático e eritroblasto ortocromático, sucessivamente. Nesta etapa, o núcleo torna-se picnótico, sendo expulso da célula, formando o reticulócito, que ainda contém resquícios de RNA mensageiro e a capacidade de sintetizar hemoglobina. Os reticulócitos são liberados na circulação e se desenvolvem em eritrócitos maduros em aproximadamente dois dias, os quais irão permanecer por 120 dias na circulação (figura 1). (Da Cunha et al., 2012; Hoffbrand e Moss, 2018)

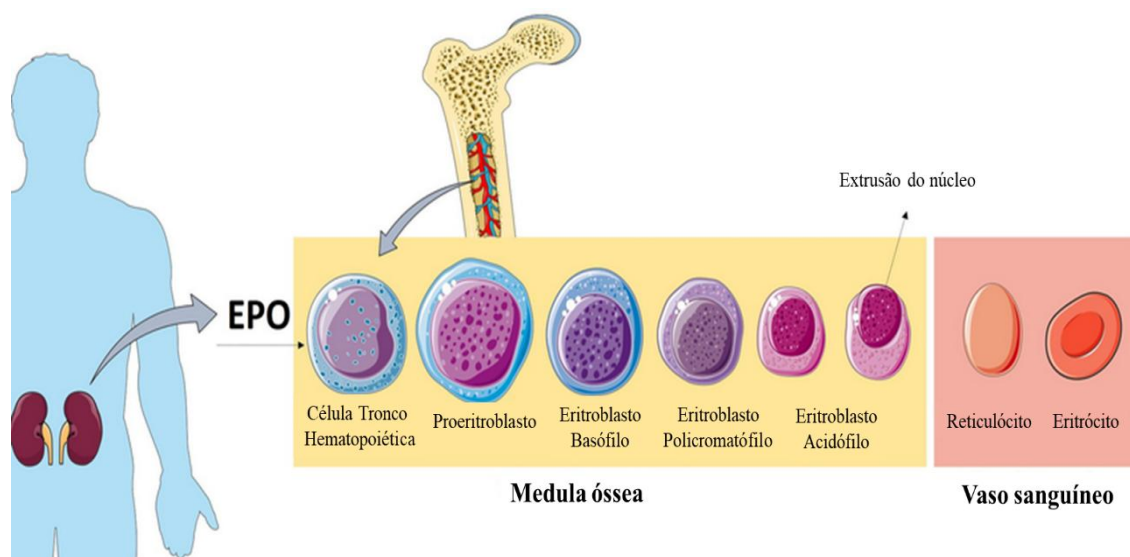


Figura 1. Representação esquemática do processo de eritropoese. A eritropoetina (EPO) estimula a diferenciação de células-tronco hematopoéticas em proeritroblastos, os quais sofrerão várias modificações que resultarão na formação dos eritroblastos basófilo, eritroblastos policromatófilos e eritroblastos acidófilos, sucessivamente. Em seguida, o núcleo é extrudido da célula, dando origem aos reticulócitos, lançados na circulação, finalizando seu processo de maturação, tornando-se eritrócitos maduros, os quais permanecem na circulação por aproximadamente 120 dias. (Figura adaptada de De Paula et al., 2023).

Nos seres humanos adultos, a eritropoese ocorre principalmente na medula óssea, porém, o processo primitivo se inicia no saco vitelino e, após o primeiro mês de gestação, o fígado passa a ser o principal local de eritropoese no período fetal. Durante todo o desenvolvimento intrauterino até o nascimento, a eritropoese envolve também a participação do baço, até que eventualmente se torne restrita à medula, e ao final do desenvolvimento apenas a medula do esqueleto axial (figura 2) (Da Cunha et al., 2012).

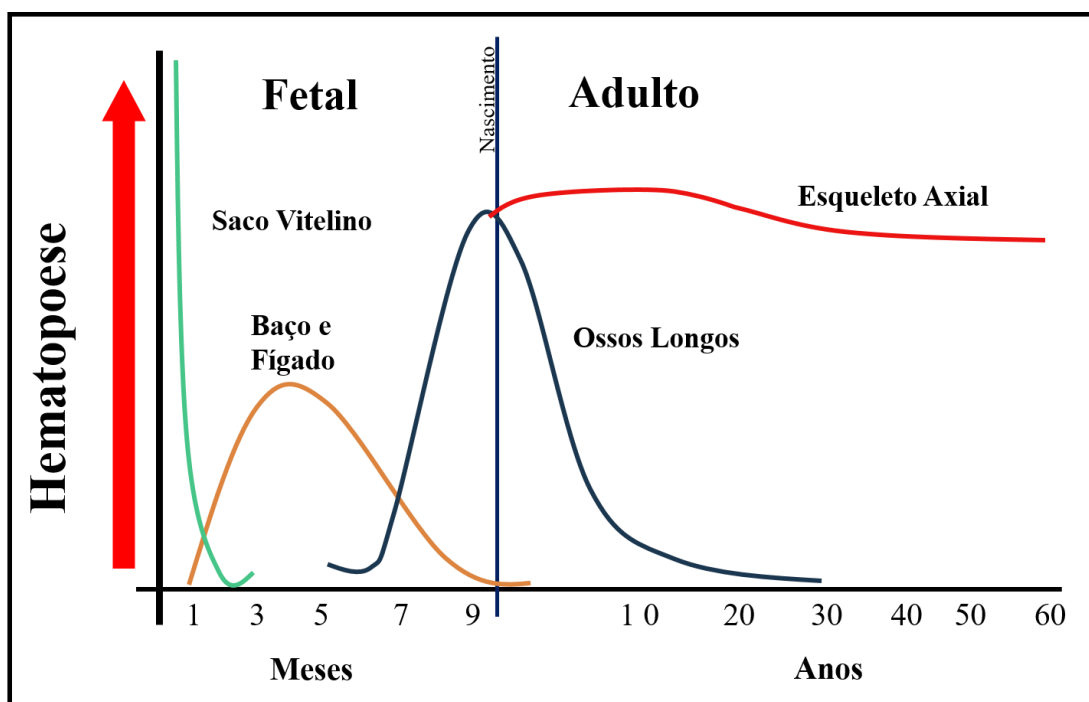


Figura 2. Locais de hematopoese durante o desenvolvimento humano. O processo se inicia no saco vitelino, passando eventualmente para o fígado e baço durante o período embrionário, até que próximo ao nascimento ele passe a se restringir a medula óssea, até eventualmente estar praticamente restrito ao esqueleto axial. (Figura adaptada de Da Cunha et al., 2012).

1.2 As globinas

O eritrócito tem como sua principal função transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos, função realizada pela hemoglobina (Hb), uma proteína tetramérica que representa 95% das proteínas totais do eritrócito. Uma molécula normal de hemoglobina possui estrutura globular e quaternária formada por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas, sendo duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β), cada uma delas associada a um grupo prostético heme, formado por quatro núcleos pirrólicos, unidos entre si por radicais metanílicos ($-\text{CH}=\text{}$), contendo um átomo de ferro divalente (Fe^{++}) capaz de se ligar de modo reversível à molécula de oxigênio (O_2) (figura 3) (Gell, 2018).

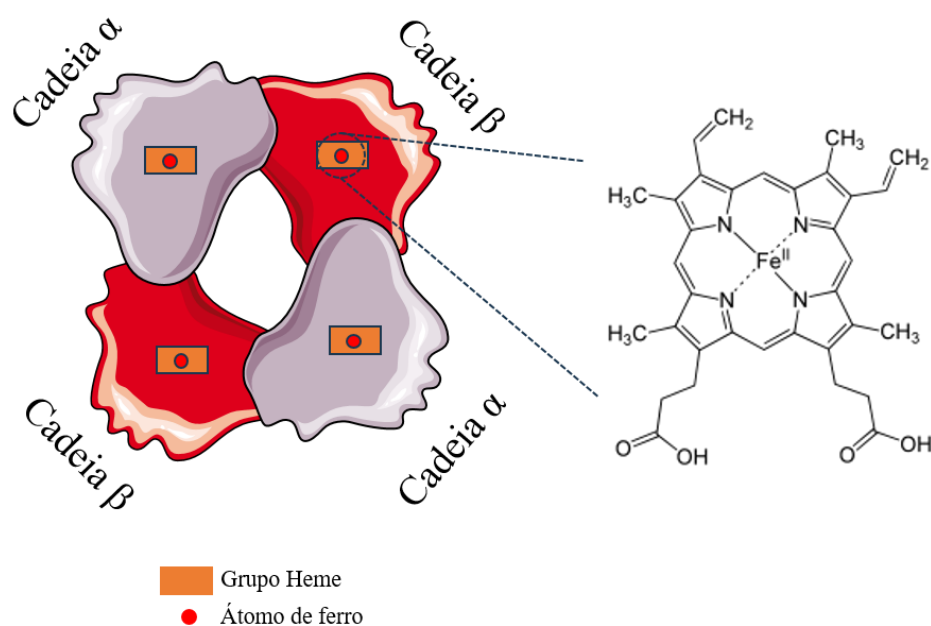


Figura 3. Representação esquemática de uma molécula de hemoglobina. A figura representa uma hemoglobina normal de um adulto, contendo duas cadeias alfa e duas cadeias beta, nas quais se ligam o grupo heme dentro do qual se encontra o íon de Fe responsável pela ligação ao oxigênio para transporte. (Imagem criada pelo autor adaptando imagens de Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License (<http://smart.servier.com>))

As cadeias globínicas são sintetizadas por diferentes genes que se localizam em aglomerados cromossômicos distintos, o grupamento alfa (α) e o grupamento beta (β). O

grupamento α situa-se no cromossomo 16 e possui um gene zeta (ζ) e dois genes alfa (α_1 e α_2 , que geram proteínas similares). Já o grupamento β localiza-se no cromossomo 11 sendo formado pelos genes, épsilon (ϵ), gama (γ) (presente em dois tipos de cadeia, a gama-alanina (γ^A) e gama-glicina (γ^G), cuja diferença se encontra na presença de glicina ou alanina na posição 136 da sequência de polipeptídios), delta (δ) e beta (β) ativados no final do período fetal e se expressam completamente após pós-nascimento, estes genes também estão dispostos no cromossomo na mesma ordem em que são expressos (figura 4).

Cromossomo 16

Grupamento Alfa



Cromossomo 11

Grupamento Beta

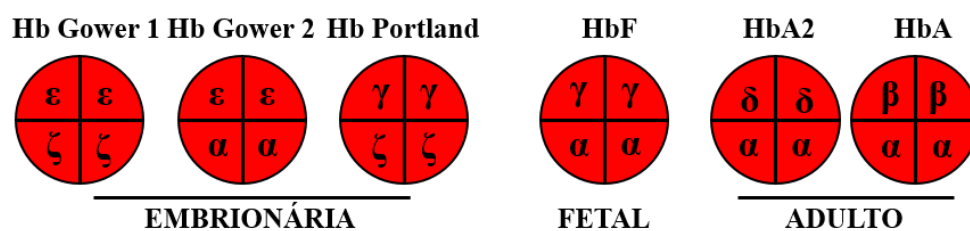
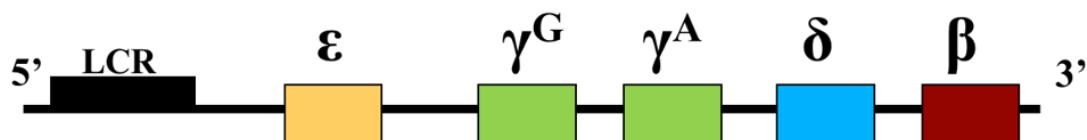


Figura 4. Grupamento dos genes de α e β globina e a produção de diferentes hemoglobinas durante o desenvolvimento humano. Os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas estão organizados em dois grupamentos gênicos localizados em cromossomos diferentes. O grupamento α localiza-se no braço curto do cromossomo 16, é constituído pelos genes ζ , α_1 e α_2 . O grupamento β está situado no braço curto do cromossomo 11, e possui os genes ϵ , γ^G e γ^A e (que variam na posição 136 em apenas uma guanina ou

alanina), δ e β . Durante o desenvolvimento ontogenético, ocorrem mudanças na expressão desses genes, formando os diferentes tipos de hemoglobinas humanas. Os mecanismos envolvidos na troca das cadeias globínicas incluem sítios hipersensíveis à DNase I (HS-40) no grupamento α e a região controladora do locus (LCR) no grupo de genes β (figura adaptada de Da Cunha et al., 2012).

Ao longo do desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem mudanças na expressão desses genes, formando os diferentes tipos de hemoglobinas humanas que existem. A principal hemoglobina do adulto, a hemoglobina A1 ($\alpha_2\beta_2$), aumenta progressivamente até que, no sexto mês de vida pós-natal, corresponde a aproximadamente 97% do conteúdo de hemoglobina total de um indivíduo sadio. (Da Cunha et al., 2012; Hoffbrand e Moss, 2018; De Paula et al., 2023). Às alterações que levam a perda dessas funções, damos o nome de anemias hemolíticas.

1.3 Anemias Hemolíticas

Anemias hemolíticas são caracterizadas como um grupo de doenças no qual o tempo de vida das hemácias na circulação é bastante reduzido. Esta redução, acompanhada da incapacidade da medula óssea desses pacientes de repor as células destruídas por hemólise, levam a um quadro clínico de anemia. Dentre esse grupo heterogêneo de doenças, destacamos as hemoglobinopatias.

As anemias hemolíticas são um grupo de doenças caracterizadas pela destruição prematura das hemácias na circulação sanguínea, fenômeno conhecido como hemólise. Normalmente, as hemácias têm uma vida útil de cerca de 120 dias, mas em condições hemolíticas, essa vida útil é significativamente reduzida. Essa redução na vida das hemácias, combinada com a incapacidade da medula óssea de compensar a perda acelerada das células, resulta em anemia (Costa; Fertrin; Conron, 2013).

A hemólise pode ocorrer devido a diversos mecanismos, que podem ser extrínsecos ou intrínsecos às hemácias:

Nos mecanismos extrínsecos temos (i) os fatores imunológicos no qual anticorpos dirigidos contra antígenos na superfície das hemácias podem levar à sua destruição, como na anemia hemolítica autoimune; (ii) os fatores mecânicos nos quais a hemólise pode ser causada por danos físicos às hemácias e (iii) hemólise causada por determinadas infecções. Já os mecanismos intrínsecos são divididos em:

Defeitos de Membrana: Anormalidades na estrutura da membrana das hemácias, como na esferocitose hereditária, tornam as células mais suscetíveis à destruição.

Defeitos Enzimáticos: Deficiências em enzimas essenciais para a integridade das hemácias, como a deficiência de G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase), podem levar à hemólise.

Hemoglobinopatias: Foco principal deste trabalho e relacionados a alterações na estrutura ou produção da hemoglobina, como na anemia falciforme e talassemia, podem resultar em destruição prematura das hemácias (Costa; Fertrin; Conron, 2013).

1.3.1 Hemoglobinopatias

Hemoglobinopatias são as doenças monogênicas mais frequentes em todo o mundo (acredita-se que afetem cerca de 7% da população) e representam as formas mais comuns de anemia hemolítica hereditária. Ocorrem devido a alterações nos genes responsáveis pela expressão das globinas ou próximas a elas (De Paula et al., 2023). Essas variantes de DNA podem resultar em:

Variantes estruturais: são geralmente causadas por mutações pontuais, pequenas inserções ou deleções de bases na região codificadora do gene resultando na substituição de aminoácidos na proteína, gerando assim uma hemoglobina anômala (Chaichompo; Svasti; Smith, 2022).

Alterações de síntese (talassemias): resultam da redução ou ausência na síntese de um, ou mais tipos de cadeias de globina. São classificadas conforme a cadeia cuja síntese está afeta e as mais frequentes e de maior relevância clínica são a α talassemia e a β talassemia (Harteveld et al., 2022).

1.4 Talassemias

Talassemias correspondem a um conjunto de alterações genéticas caracterizadas por alterações que afetam de maneira quantitativa a síntese de uma ou mais subunidades das cadeias de globina, afetando conseqüentemente de maneira direta a produção de hemoglobina. Essa produção ineficiente de globinas estão intrinsecamente ligadas as manifestações clínicas da doença, acarretando uma eritropoese ineficiente e a conseqüente anemia hemolítica. Os pacientes afetados podem apresentar uma gama de sintomas que variam desde a ausência de sintomas até a presença de anemias hipocrômicas e microcíticas, também a presença de alterações incompatíveis com a vida (Thein, 1998).

Conforme a cadeia globinica cuja síntese está prejudicada, a talassemia recebe então a sua classificação, sendo que devido a sua presença no indivíduo adulto, as mais frequentes são as do tipo alfa e beta. Da mesma forma, essa classificação também é utilizada para classificar os pacientes segundo o nível de produção das cadeias, que como já mencionado podem estar reduzidas (por exemplo, talassemia α^+ ou β^+) ou completamente ausente (por exemplo, talassemia α^0 ou β^0) (Hoffman et al., 2022).

1.4.1 Beta Talassemia

A beta talassemia é a forma mais importante das talassemias em virtude de sua elevada taxa de morbidade e mortalidade (Rocha; Martins; Gonçalves et al., 2010). Existem diferentes tipos e graus de gravidade de talassemia, dos quais os mais comuns são a talassemia alfa e a talassemia beta. Dentro dessas categorias, a talassemia

dependente de transfusão (ou anemia de Cooley) e a talassemia não dependente de transfusão são duas formas distintas em termos de gravidade e manejo clínico. Estima-se que aproximadamente 1,5% da população mundial apresente algum dos fenótipos relacionados a essa anemia hemolítica (Galanello e Origa, 2010). No Brasil, segundo dados da ABRASTA (Associação Brasileira de Talassemia) em 2023, haviam 505 pacientes acima dos 18 anos cadastradas, sendo estes divididos entre 283 pacientes beta talassêmicos dependente de transfusões e 222 talassêmicos não dependente de transfusão. O estado de São Paulo lidera o número de casos de talassêmicos dependente de transfusões, já o estado de Pernambuco possui o maior número de pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão (Abrasta, 2023).

1.4.1.1 Alterações Moleculares

A beta talassemia é caracterizada por uma alteração quantitativa na síntese de cadeias de beta globina, sendo classificada como talassemia beta zero (talassemia β^0) quando a síntese de globinas beta está ausente, e talassemia beta mais (talassemia β^+) quando ocorre a redução na taxa de síntese (Ali et al., 2021).

Esta doença é bastante heterogênea e já foram descritas mais de 350 mutações ligadas a beta talassemia, sendo a maioria delas causadas por substituições, deleções ou inserções de nucleotídeos nos exons, introns e regiões promotoras dos genes que codificam para a beta globina. Na tabela 1 são apresentados alguns exemplos das mutações mais frequentes que causam beta talassemia, de acordo com sua localização na molécula, o defeito funcional que causam e o resultado na síntese de beta globina, além de um breve exemplo de sua distribuição na população. (Tabela adaptada de Rao et al., 2024)

Tabela 1. Tipos de mutação que causam beta talassemia e sua distribuição.

S. No.	Mutação	Tipo	Distribuição	
1.	Mutações Transcricionais	Elementos regulatórios do promotor	$\beta^{++}, \beta^{+}, \beta^{++}$ (silenciosa)	Mediterrâneos, Portugueses, Alemães, Italianos, Afro-americanos
2.	Processamento de RNA	Junção de splicing	β^0	Ítalo-Canadenses, Mediterrâneos, Chineses, Turcos, Egípcios
		Sítios de splice consenso	$\beta^0, \beta^{+}, \beta^{++}$ (silenciosa)	Mediterrâneos, Norte Europeus, Algerios, Libaneses, Alemães
		Sítios de splice crípticos	$\beta^0, \beta^{+}, \beta^{++}$	Mediterrâneos, Chineses, Sudoeste da Ásia, Japoneses
		Clivagem do RNA – Sinal da Poli A	$\beta^{+}, \beta^{++}, \beta^{++}$ (silenciosa)	Afro-Americanos, Mediterrâneos, Franceses, Tunísios
3.	Tradução do RNA	Outros no 3' UTR	β^{++}, β^{++} (silenciosa)	Gregos, Turcos, Armênios
		Códons iniciadores	β^0	Japoneses, Iugoslavos, Polinesios, Maori
		Códons nonsense	β^0	Brasileiros, Ingleses, Portugueses, Japoneses
		Frameshift	β^0	Mediterrâneos, Japoneses, Gregos, Mexicanos

Essas mutações podem ser divididas em: **(1) Mutações que afetam a transcrição do RNAm:** ocorrem em regiões promotoras que antecedem aos genes e reduzem a eficiência de transcrição do RNAm, uma vez que diminuem a ligação de fatores de transcrição. Produzem talassemias do tipo β^{+} . **(2) Mutações que afetam o processamento do RNAm:** ocorrem em regiões de *splicing* ou próximas a elas e impedem ou dificultam a retirada dos introns, incluindo o sinal de poliadenilação, originando talassemia β^{+} ou β^0 . **(3) Mutações que afetam a tradução:** são alterações na fase de leitura que interferem na tradução do RNAm pela introdução de um códon de terminação prematura. Produzem talassemias β^0 (Jaing et al., 2021).

No Brasil, no sul e sudeste, predominam mutações de origem mediterrânea, principalmente HBB: c.118C>T [códon 39 (C>T); B39 (c5) (Gln-Stop], HBB: c.93-21G>A [IVS-I-110 (G>A); β nucleotídeo (nt) 252 (G>A)], HBB: c.92p1G>A [IVS-I-1 (G>A); β nt 143 (G>A)] e HBB: c.92p6T>C [IVS-I-6 (T>C); β nt 148 (T>C)]. Nas regiões norte e nordeste, ainda estão sendo realizados estudos para determinar quais mutações prevalecem, como, por exemplo, o estudo de Fonseca e colaboradores que verificou que as quatro mutações mais comuns mencionadas não estavam presentes no estado da Bahia, e identificou pela primeira vez a mutação HBB: c.135delC no Brasil. (Fonseca; Moura Neto; Gonçalves, 2013) e o trabalho de Araújo e colaboradores em Pernambuco. (Araújo et al., 2003)

1.4.1.2 Fisiopatologia

A fisiopatologia da beta talassemia está diretamente associada ao desequilíbrio na produção de globinas, causado pela redução quantitativa de cadeias beta. As cadeias de alfa globina livres precipitam nos precursores eritroides da medula óssea, formando agregados insolúveis, resultando em danos à membrana e morte celular prematura. A presença destas cadeias instáveis também já foi teorizada que afete a expressão de genes como o *GATA-1* (regulador essencial de expressão genica e maturação de eritrócitos) levando a eritropoese ineficaz que é a causa mais importante de anemia na beta talassemia, uma vez que cerca de 65% dos eritroblastos morrem antes de se tornar hemácias maduras. (Sankaran; Weiss, 2015; Chaichompoo; Svasti; Smith, 2022; De Paula et al., 2023).

A destruição acentuada dos eritroblastos promove aumento na produção de eritropoetina, gerando um ciclo de eritropoese ineficiente, o que resultará em deformidades ósseas causadas pela expansão medular em decorrência do aumento da

eritropoese e comprometimento dos órgãos como a hepatoesplenomegalia. (De Paula et al., 2023)

A liberação do heme presente nas cadeias desnaturadas é outro fator importante na fisiopatologia da doença por poder catalisar a reação de Fenton, aumentando significativamente o estresse oxidativo nas células. A reação de Fenton envolve a conversão do peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila altamente reativos na presença de íons metálicos, como ferro. Essa reação pode então afetar o DNA, proteínas e lipídeos nestas células, acelerando a sua perda de função e conseqüentemente sua morte por destruição no baço e fígado. (Bou-Fakhredin et al., 2022).

Um resumo dos efeitos importantes relacionados a fisiopatologia da doença estão descritos na Figura 5.

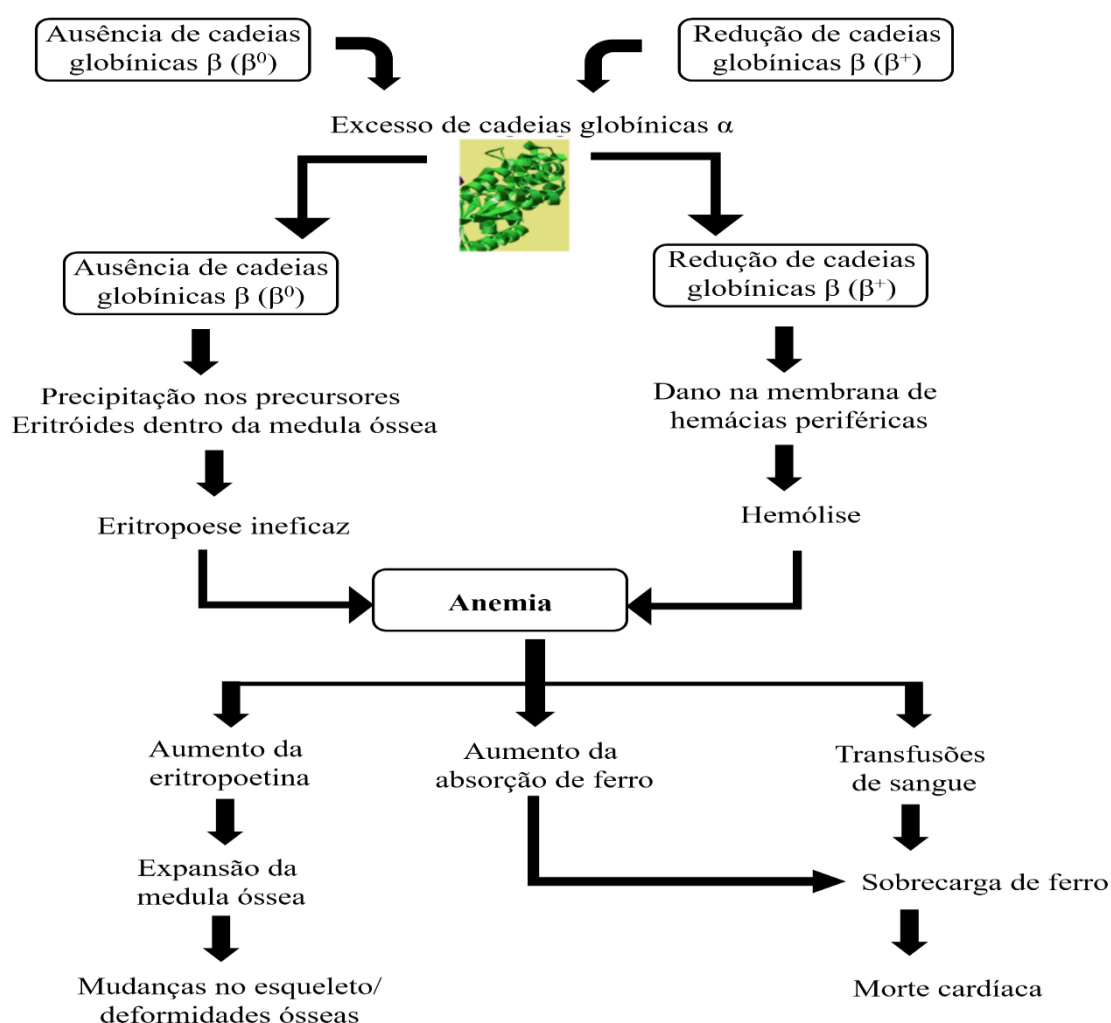


Figura 5. Fisiopatologia da beta talassemia. Representação esquemática de algumas das principais consequências da beta talassemia, como a precipitação de precursores eritroides na medula óssea, eritropoese ineficaz, aumento da eritropoetina, expansão da medula óssea, deformidades ósseas, sobrecarga de ferro e até o óbito do paciente. (Adaptado de Ali et al., 2021).

1.4.2 Formas Clínicas da Beta talassemia

Como já citado anteriormente, clinicamente, a beta talassemia é classificada em traço beta talassêmico, dependente e não dependente de transfusão. Esta classificação é embasada na apresentação clínica do paciente, no nível de desbalanceamento de cadeias alfa e beta, gravidade da anemia e a frequência de transfusão que os indivíduos requerem. (De Simone et al., 2022). Essa classificação é crucial para o manejo e tratamento adequado dos pacientes, auxiliando os profissionais da área da saúde a determinar a melhor abordagem terapêutica e monitoramento para cada caso. A seguir estão descritas as principais características de cada forma clínica:

1.4.2.1 Traço talassêmico (BTMe)

Os indivíduos acometidos são heterozigotos, clinicamente assintomáticos e habitualmente não necessitam de tratamento. Podem apresentar discreta anemia microcítica e hipocrômica, que podem acarretar problemas em situação de maior estresse como exercício físico ou gestação, e uma quantidade mínima de pacientes pode apresentar esplenomegalia leve a moderada. (Ali et al., 2021; De Simone et al., 2022).

1.4.2.2 Beta Talassemia Dependente de Transfusão (BTDT)

A BTDT ou anemia de Cooley corresponde à forma mais grave da doença, geralmente manifestam-se na infância e se caracteriza tanto pela homozigose β^+ quanto β^0 ou pela dupla heterozigose β^+/β^0 . A grave deficiência ou ausência da síntese de beta globina causa grave anemia ($Hb < 7,0g/dL$) em virtude da ineficiência da eritropoese e ao sequestro das hemácias no baço. Os indivíduos acometidos necessitam de transfusões

regulares, que ao longo dos anos resultam em sobrecarga de ferro em tecidos e órgãos, gerando complicações cardíacas, hepáticas e endócrinas, além de deformidades ósseas resultantes da expansão da medula óssea e afinamento da porção cortical (Ali et al., 2021; De Simone et al., 2022).

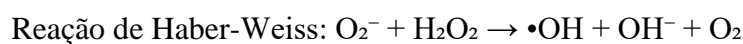
1.4.2.3 Beta Talassemia Não Dependente de Transfusão (BTNDT)

Os portadores apresentam um quadro mais favorável quando comparados aos indivíduos com BTDT, devido ao menor desbalanço entre cadeias alfa e não-alfa. Os pacientes mostram anemia moderada a severa, não dependendo de transfusões regulares. Normalmente, os sintomas e o reconhecimento da anemia ocorrem mais tarde, geralmente, após o segundo ano de vida. As manifestações clínicas da BTNDT podem ser influenciadas por diferentes fatores, dentre os quais a associação dos genótipos β^0 e β^+ e também mutações no gene alfa. A possível ocorrência de expansão da medula óssea pode levar a complicações como retardo no crescimento e anormalidades ósseas (Ali et al., 2021; De Simone et al., 2022)

1.5 Anemias hemolíticas e Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um processo patológico resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade do organismo de neutralizar essas espécies reativas mediante mecanismos antioxidantes. A presença de compostos oxidantes é responsável por agravar os sintomas de diversas doenças, incluindo anemias hemolíticas como a beta talassemia, uma vez que o dano oxidativo desempenha para nas células eritroides um papel crucial na hemólise contribuindo para a curta sobrevivência destas células na circulação. O estado oxidativo das células é determinado pelo equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio são pró-oxidantes e participam em diversos processos celulares como

envelhecimento, proliferação e sinalização em células saudáveis, entretanto quando excedem a capacidade antioxidante das células, são responsáveis por oxidações de biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, causando danos a organelas celulares e morte celular (Fibach e Dana, 2019). ERO como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) surgem durante o metabolismo aeróbico normal ou pela exposição a agentes internos e externos. A presença de metais de transição, como o ferro, aumenta consideravelmente a geração e a reatividade destas ERO. Este metal pode participar das reações de Fenton e Haber-Weiss (descritas abaixo), as quais são reações químicas que produzem radicais livres altamente reativos, como o radical hidroxila ($\bullet OH$):



O radical hidroxila é uma das ERO mais reativas e pode causar danos severos a lipídios, proteínas e DNA. Este mecanismo é, portanto, um fator crítico no agravamento de diversas doenças especialmente na beta talassemia, na qual a destruição dos glóbulos vermelhos libera ferro livre no plasma (figura 6) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Bou-Fakhredin et al., 2022).

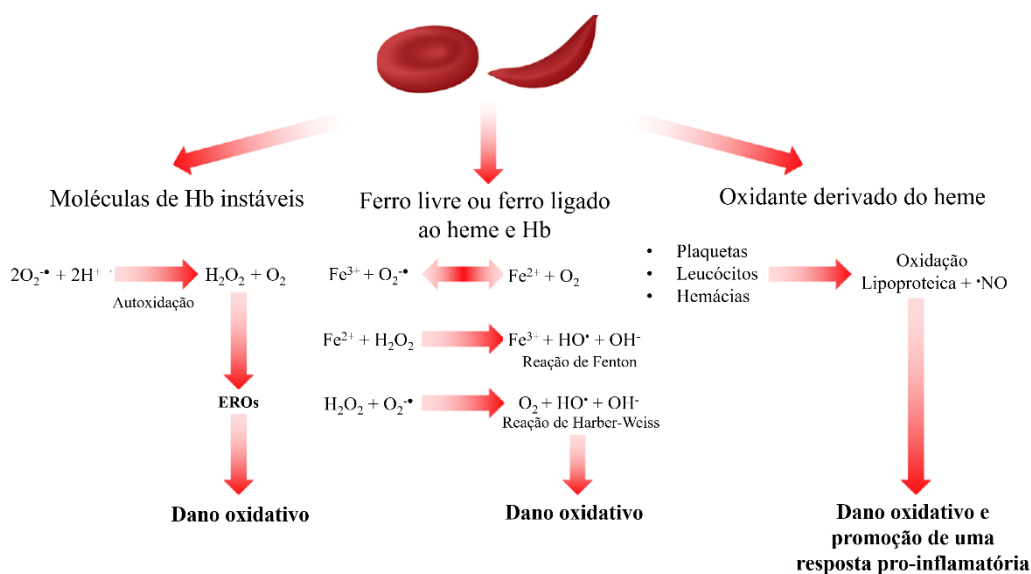


Figura 6. Fontes de ERO nos eritrócitos. Entre os principais fatores estão as moléculas instáveis de Hb, o ferro tanto em sua forma livre quanto ligado ao heme e Hb e os oxidantes derivados do heme, visto que este é uma molécula hidrofóbica que pode interagir com proteínas e lipídeos de membrana. (Figura adaptada de Bou-Fakhredin et al., 2022)

As células eritroides estão constantemente expostas a ciclos de auto-oxidação. Porém, nas anemias hemolíticas a auto-oxidação da hemoglobina (Hb) é bastante aumentada, pois as moléculas de Hb são altamente instáveis. Na beta talassemia especificamente, isso decorre do excesso de cadeias alfa livres que irão se precipitar na forma de hemicromos, capazes de se ligar a proteína banda 3, dando início a uma cascata de sinalizações que culminam com a desestabilização da membrana e remoção acelerada das hemácias (Bou-Fakhredin et al., 2022). Adicionalmente, os danos causados a membrana ocasionam a destruição de enzimas glicolíticas e conseqüentemente na redução da produção de NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), um importante agente redutor para várias enzimas antioxidantes (Voskou et al., 2015).

Após a hemólise, a Hb sofre reações oxidativas que levam a liberação do heme e do ferro e formação de ERO, que podem intercalar nas membranas celulares promovendo dano oxidativo ao endotélio, células hemopoéticas e vários órgãos. Na beta talassemia os sinais de estresse oxidativo podem ser observados não apenas nos eritrócitos, mas também nos leucócitos, plaquetas, células endoteliais e vários outros tecidos (Fibach e Dana, 2018; Romanello et al., 2018).

1.6 Defesas Celulares contra o Estresse Oxidativo

Ao longo da evolução, as células desenvolveram mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, dentre estes estão as enzimas antioxidantes, as quais podem reagir com ERO antes que haja danos às biomoléculas. Este sistema de defesa é composto

pelas proteínas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e peroxirredoxinas (PRDXs) (Fuji et al., 2021). Romanello e colaboradores identificaram também a presença de um nível aumentado de TRX1 em pacientes BTNDT (Romanello et al., 2018)

A SOD catalisa a transformação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, mediante alternados ciclos redução e oxidação do metal do sítio ativo, atuando, dessa forma, como primeira linha de defesa antioxidante (Johnson e Giulivi, 2005; Pacher; Beckman; Liaudet, 2007). O peróxido de hidrogênio produzido pode ser decomposto pela CAT, GPX ou pelas PRDXs. Dentre as três classes, as PRDXs e as GPXs se destacam uma vez que além de decompor H_2O_2 , estas enzimas podem decompor também hidroperóxidos de lipídeos e peroxinitrito, apontando uma grande versatilidade na proteção celular. Entretanto, as PRDXs se destacam ainda mais pela abundância e grande reatividade com os substratos. Em seres humanos, já foram descritas seis diferentes PRDXs localizadas em diferentes compartimentos celulares. Nos eritrócitos, a PRDX2 é terceira proteína mais abundante, indicando um possível papel no desenvolvimento e manutenção destas células, uma vez que já foi observado que ratos com expressão deletada de PRDX2 apresentavam anemia hemolítica com sinais similares aos observados em beta talassemia (Matte e Franceschi, 2019). Além da atividade de peroxidase, as PRDXs também participam de diversas cascatas de sinalização mediadas por peróxidos e possuem importantes funções através da interação com parceiros biológicos distintos (De Paula et al., 2023).

Em um trabalho anterior do nosso grupo, Romanello e colaboradores avaliaram a expressão gênica e o conteúdo proteico das isoformas de PRDXs 1, 2 e 6 em reticulócitos e eritrócitos de pacientes beta talassêmicos obtendo resultados bastante promissores, especialmente com relação a PRDX1 e TRX1 que se mostraram aumentadas em pacientes

beta talassêmicos não dependente de transfusão e a PRDX2 que apesar de aumentada em pacientes com talassemia dependente de transfusão, apresentou níveis elevados de oxidação (Romanello et al., 2018).

Uma vez que a literatura evidencia uma possível atuação destas enzimas na regulação de outras vias metabólicas importantes, nosso grupo avaliou possíveis interações gênicas associadas a vias alternativas que podem estar influenciando na geração dos diferentes fenótipos associados a beta talassemia. Nestes estudos, destacaram-se associações entre as proteínas antioxidantes e a proteína PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog) que será descrita em maiores detalhes a seguir.

1.7 PTEN (Phosphatase and tensin homolog)

O gene *PTEN* é responsável por codificar uma enzima encontrada em quase todos os tecidos do corpo. Esta enzima é uma fosfatase lipoproteica que tem um importante papel na regulação do ciclo celular e da apoptose, além de auxiliar no controle da migração celular, adesão, diferenciação e renovação de células-tronco (Worby e Dixon, 2014). Ele é encontrado de forma mutada em diversos tipos de câncer primário, como carcinoma endometrial, glioblastoma, pele, mama e próstata, além de emergir como fator de importância em outras doenças como diabete e transtornos do espectro autista. (Chang et al., 2008; Bermúdez-Brito; Goulielmaki; Papakonstanti, 2015; Bankoglu et al., 2018). Foi a primeira fosfatase descoberta com papel de supressor tumoral, controlando negativamente uma das vias promotoras de câncer mais críticas que existem, a via PI3K-Akt, que está associada à regulação do crescimento e da sobrevivência celular (Blanco-Aparicio et al., 2007; Makker; Goel; Mahdi, 2014). Existe também uma variante traducional de PTEN, denominada PTEN-Long, derivada de um sítio de início alternativo que adicionam 173 aminoácidos a região N-terminal, que possui a capacidade de

secreção, conseguindo migrar para diferentes células e afetar seu funcionamento (Hodakoski et al., 2015).

Esse gene presente no cromossomo 10q23 codifica uma proteína de 403 aminoácidos chamada PTEN (55 kDa) que apresenta atividade fosfatase dupla contra fosfolipídios e proteínas. A proteína possui cinco domínios essenciais: o sítio N-terminal de ligação de PIP2(DLP), um domínio fosfatase que contém o motif HCxxGxxR, um domínio C2, uma cauda carboxila-terminal e um motif de ligação PDZ (Figura 7). (Worby e Dixon, 2014; Nguyen Huu, 2021)

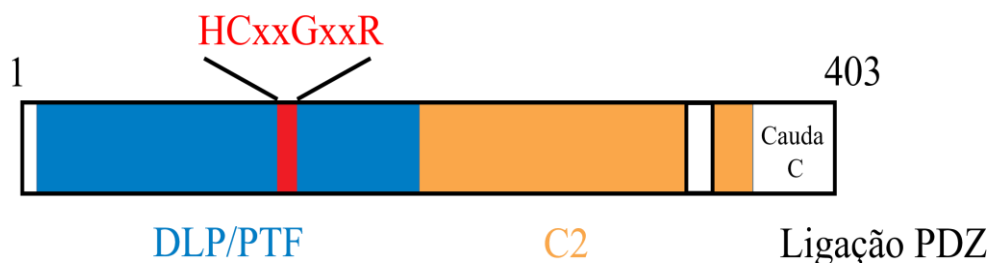


Figura 7. Representação esquemática da estrutura de PTEN. A proteína PTEN possui cinco domínios essenciais: o sítio N-terminal de ligação de PIP2(DLP), um domínio fosfatase que contém o motif HCxxGxxR, um domínio C2, uma cauda carboxila-terminal e um motif de ligação PDZ. (Figura adaptada de Worby e Dixon, 2014)

O domínio fosfatase de PTEN controla negativamente uma das vias promotoras de câncer mais críticas existentes: a via PI3K-Akt, que está associada a regulação do crescimento e da sobrevivência celular. A via PI3K-Akt tem início quando um fator de crescimento se liga ao receptor tirosina-quinase, causando a ativação da proteína chamada PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), que por sua vez fosforila fosfolipídios de membrana celular chamados de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂). Essa adição de um fósforo na posição 3 de PIP₂ resulta na formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), que fosforila proteínas como a AKT (*Serine/threonine kinase 1*), ativando uma

cascata de sinalização resultando na produção de proteínas e no crescimento, migração, sobrevivência e proliferação celular. PTEN atua de maneira antagônica à proteína PI3K, ao remover o grupo fosfato da posição 3 do PIP₃, gerando PIP₂, rompendo a cadeia de sinalização da Akt. (Hodakoski et al., 2015)

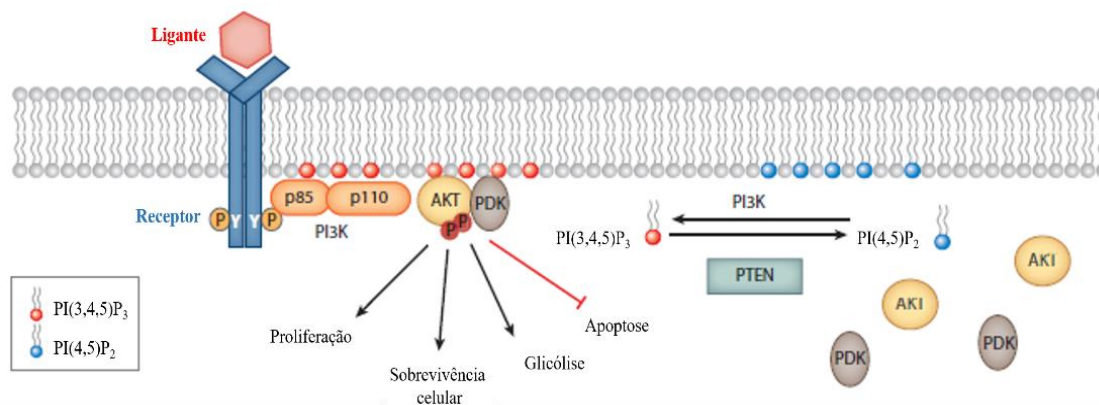


Figura 8. Representação esquemática da via envolvendo PTEN e PI3K/AKT. A via PI3K-Akt tem início quando um fator de crescimento se liga ao receptor tirosina-quinase, causando a ativação da proteína chamada PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), que por sua vez fosforila fosfolipídios de membrana celular chamados de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂). Essa adição de um fósforo na posição 3 de PIP₂ resulta na formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), que fosforila proteínas como a Akt, ativando uma cascata de sinalização envolvida no crescimento, migração, sobrevivência e proliferação celular. PTEN atua de maneira antagônica à proteína PI3K, removendo o grupo fosfato do PIP₃, gerando PIP₂, rompendo a cadeia de sinalização da Akt. (Figura adaptada de Worby e Dixon, 2014).

Também foram reportadas importantes funções de PTEN durante a hematopoese, observando a relação da proteína com a manutenção das células-tronco hematopoéticas, uma vez que a deleção do gene eventualmente levou ao esgotamento desse tipo celular. PTEN também está envolvida no momento do comprometimento da célula-tronco com as diferentes linhagens que podem se formar a partir delas. (Wu; Zhu; Wu, 2020)

O promotor do gene *PTEN* é regulado positiva e negativamente por vários fatores de transcrição, como, por exemplo, EGR1, p53 e NFκB. Algumas modificações epigenéticas também foram relatadas como mecanismo de supressão desse gene, como

metilação e desacetilação de histonas no promotor. A regulação pós-transcricional é realizada por miRNAs (Bermúdez Brito; Goulielmaki; Papakonstanti, 2015).

Além dessas funções no citoplasma, a PTEN também desempenha papéis importantes no núcleo, sendo encontrado no núcleo de diversas células, como as do endotélio, endométrio em proliferação e ilhotas pancreáticas, e ausente nos tecidos neoplásicos. Um dos fatores que acreditasse colaborar para essa migração é a ubiquitinação. PTEN nuclear auxilia na integridade genômica e na estabilidade de p53, importante fator de transcrição. Foi observado que o estresse oxidativo contribui para aumentar a presença de PTEN no núcleo, uma vez que a forma fosforilada da proteína tem sua migração atenuada. (Chang et al., 2008; Ho et al., 2020)

O aumento do estresse oxidativo pode causar a supressão reversível da função fosfatase de PTEN. Estudos recentes evidenciaram que esta supressão pode ser mediada por altos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que causam a oxidação dessa enzima na Cys124, levando à formação de uma ligação dissulfeto entre esta cisteína e a Cys71 inibindo o sítio ativo desta enzima (Verrastro et al., 2016).

Um estudo realizado por Huo e colaboradores, demonstrou que a deleção de PTEN em fibroblastos embrionários de camundongos provoca a diminuição na expressão das PRDXs 1, 2, 5 e 6 e de SOD1, resultando no aumento dos níveis de ERO, diminuição da capacidade antioxidante e aumentos dos danos oxidativos ao DNA (HUO et al., 2008). Além disso, a PRDX1 é capaz de se ligar a PTEN protegendo-o contra a supressão de sua atividade de fosfatase lipídica, o que ocorre sob estresse oxidativo. Estes achados sugerem que as PRDXs e PTEN ajam juntos para manter os níveis antioxidantes celulares e suprimir vias promotoras de câncer, como a via PI3K-AKT (CAO; SCHULTE; KNIGHT, 2009). Além disso, também já foi descrita a ação protetora da PRDX2, porém, não de maneira direta como a PRDX1, mas através de sua atividade de combate ao H_2O_2 . Apesar

desses resultados, não existem estudos na literatura relacionando esta proteína e suas interações na beta talassemia.

2. JUSTIFICATIVA

Na beta talassemia, o estresse oxidativo afeta negativamente a função biológica dos eritrócitos em vários níveis e contribui significativamente para a patogênese da doença (Voskou et al., 2015). Nessa anemia hemolítica, o ambiente celular é extremamente favorável à formação de ERO, os quais resultam em danos oxidativos que culminam em hemólise e na eritropoese ineficaz na medula óssea (Fibach e Rachmilewitz, 2008). Neste contexto, a atuação do sistema de defesa antioxidante enzimático é de fundamental importância para a manutenção dos eritrócitos.

Um trabalho realizado recentemente por nosso grupo de pesquisa mostrou níveis significativamente aumentados de PRDX1 em pacientes com BTNDT quando comparados a indivíduos saudáveis e com BTDT, enquanto a PRDX2 mostrou-se mais elevada em BTDT. Adicionalmente, também foi observado um aumento nos níveis de TRX1 e SOD1 em pacientes BTNDT em relação aos indivíduos saudáveis (ROMANELLO et al., 2018). Em outro trabalho, foi visto a presença de elevados níveis da proteína APEX1 em pacientes talassêmicos, proteína esta que já foi associada a regulação da expressão de PTEN (Fantini et al., 2008; Maia de Oliveira da Silva, 2019).

Conforme já mencionado, o estresse oxidativo tem uma importante participação na regulação de PTEN, seja de sua atividade quanto de sua localização celular, podendo causar tanto a sua migração para o núcleo quanto retardar a passagem deste para o citoplasma (Verrastro et al., 2016; Ho et al., 2020). Além disso, como Huo e colaboradores demonstraram, diversas proteínas antioxidantes, especialmente a PRDX1 e 2 além da SOD1 tem sua expressão atrelada a produção de PTEN, proteínas estas que já tiveram uma associação demonstrada nos fenótipos da beta talassemia. (Huo et al., 2008; Romanello et al., 2018).

Considerando os dados da literatura a respeito das importantes interações de PTEN com o sistema antioxidante e os dados observados por nosso laboratório, e considerando a escassez de estudos observando essas relações no contexto da beta talassemia, nosso estudo visou entender como essa proteína pode estar relacionado com os fenótipos da beta talassemia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do trabalho é investigar a relação entre a expressão gênica e os níveis proteicos de PTEN e os diferentes fenótipos observados em pacientes com beta-talassemia, comparando esses achados tanto entre os próprios pacientes, categorizados em fenótipos dependentes e não dependentes de transfusão, quanto em relação a indivíduos saudáveis.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão genica e os níveis proteicos de PTEN comparando com a geração de ERO nos reticulócitos e eritrócitos de pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão e dependente de transfusão, comparando-os também com indivíduos sadios.
- Avaliar a expressão gênica de AKT e PI3K em pacientes com BTNDT e BTDT e correlacionar com os níveis de PTEN observados.
- Avaliar a atividade de PTEN (fosforilação da extremidade C-terminal) em hemácias de pacientes beta talassêmicos.
- Avaliar a expressão gênica de SHP2 em pacientes com BTNDT e BTDT e correlacionar com os níveis de PTEN observados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética Institucionais (CAAE: 28263220.9.1001.5504) e todos os pacientes e controles só foram incluídos no estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Todos os procedimentos foram realizados conforme a resolução nº 466/2012 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

4.2 Pacientes e controles

Foram convidados pacientes com diagnóstico molecular de beta talassemia previamente realizado pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco (Fundação HEMOPE). Estes pacientes se encontravam em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatórios e sem crises de dolorosas recentes. Amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram usadas como controles, este grupo foi composto por doadores voluntários. A seguir mais dados são fornecidos sobre os grupos analisados.

Foram analisados 13 pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão, homozigotos para a mutação IVS-I-6 (T→C) (β^+), com idades entre 32 e 63 anos ($49,15 \pm 8,76$), sendo 8 do sexo feminino e 5 do sexo masculino. Os controles analisados somam 16 indivíduos sadios no total, com idades entre 22 e 42 ($28 \pm 1,67$), sendo 8 do sexo feminino e 8 do sexo masculino.

Adicionalmente, também foram utilizadas amostras de pacientes beta talassêmicos dependentes de transfusão para efeitos comparativos, as quais correspondem a 9 no total, com idades entre 14 e 35 ($24 \pm 8,52$), sendo 4 do sexo masculino e 5 do sexo feminino. Estes pacientes apresentavam os seguintes genótipos: IVS-I-6 (T → C) (β^+) / IVS-I-5 (G

→ C) (β^+) (5 indivíduos), IVS-I-6 (T → C) (β^+) / IVS-I-110 (G → A) (β^0) (1 indivíduo), IVS-I-1 (G → A) (β^0) / IVS-II-849 (A → G) (β^0) (1 indivíduo), CD12 (-C) / IVS-II-849 (A→G) (1 indivíduo), IVS-I-1 (G→A) / IVS-I-1 (G→A) (1 indivíduo). Os dados hematológicos dos pacientes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados hematológicos dos pacientes.

Parâmetros	Beta talassemia não dependente de transfusão n=13	Beta talassemia dependente de transfusão n=9
Cel. Verm. (10^6mm^3)	3,9 ± 0,55	2,98 ± 0,46
Hb (g/dL)	7,6 ± 0,54	6,53 ± 1,24
VCM (fL)	66,3 ± 8,85	71,5 ± 4,4
Ret (%)	7,9 ± 3,57	3,73 ± 3,2
Hct (%)	25,3 ± 1,66	21,3 ± 3,78
HbF (%)	8,5 ± 3,99	41,61 ± 41,89
HbA (%)	84,3 ± 4,02	55,12 ± 41,52
HbA2(%)	7,2 ± 0,74	3,27 ± 0,51
Cel. Branc. (10^3mm^3)	11,8 ± 6,52	12,42 ± 5,34

Cel. Verm., células vermelhas; Hb, hemoglobina; VCM, volume corpuscular médio; Ret, reticulócitos; Hct, hematócrito; HbF, hemoglobina fetal; HbA, hemoglobina A; HbA2, hemoglobina A2; Cel. Branc., células brancas. Os dados são apresentados com média e desvio padrão.

4.3 Separação de reticulócitos

As amostras de sangue periférico (4mL) foram coletadas em tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) e transferidas para tubo cônico de 15mL. Após centrifugação em 800g, 10 minutos a 4 °C, o plasma foi descartado, sendo adicionado 5x o volume de solução de lise de hemácias (0.144M NH_4Cl ; 0.01M NH_4HCO_3). As amostras foram incubadas 30 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 2500g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante contendo hemácias lisadas e reticulócitos foi transferido para novo tubo, homogeneizado com 1/10 de volume de uma solução de Sucrose/KCl (1.5M $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$; 0.15M KCl, filtrada ou preparada com H_2O tratada com DEPC) e centrifugado novamente 2500g por 20 minutos a 4 °C. O

sobrenadante contendo agora apenas reticulócitos foi transferido para novo tubo, tratado com 700µl de Ácido acético 10% e centrifugado 2500g 20 minutos a 4°C. O precipitado (*pellet*) foi então ressuspensionado e homogeneizado em 1mL de Trizol® (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), que rompe as células, dissolvendo os componentes celulares sem comprometer a integridade do RNA.

4.4 Extração de RNA

O RNA de reticulócitos foi extraído pelo método de Trizol® (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras contendo reticulócitos e Trizol® foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos, foram adicionados 200µL de clorofórmio (CHCl₃) e agitado vigorosamente, sendo realizada nova incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a 12.000g em temperatura de 4°C, a fase aquosa foi retirada e acondicionada em outro tubo, prosseguindo imediatamente para a etapa de precipitação com 500µL de isopropanol gelado. Após homogeneização, foi realizada nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 15.000g à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionado 1mL de etanol gelado a 75%, misturando por inversão com cuidado para que não houvesse descolamento do precipitado. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo então ressuspensionado em água livre de RNase e incubado a 42°C por 10 minutos e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA) e avaliadas quanto à integridade em gel desnaturante de agarose. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades

ribossomais 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80 °C.

4.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para retirar possíveis contaminações do RNA com moléculas de DNA, 2,0µg de cada RNA extraído foi tratado com 1,0 µL da enzima *DNAseI* (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 1,0 µL de tampão de reação (*DNAseI* reaction buffer) com MgCl₂ 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, MgCl₂ 20mM, KCl 500mM), em um volume final de 10µL. A reação foi incubada por 30 min à temperatura de 37°C e paralisada com a adição de 1,0 µL de EDTA 50mM e incubação por 10 min a 65°C.

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA tratado com *DNAseI*, através da reação de transcrição reversa, usando Oligo (dT) (Exxtend) e o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). À amostra de RNA tratada, foi adicionado 0,5 µL de oligoDt e 4,2 µL de DEPC H₂O, incubado a 65°C por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 2,0 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTPs Mix (100 mM de cada dNTP), 1,5 µL de 10X RT *Random Primers*, e 1,0 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL). A síntese de cDNA foi feita a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos. A reação foi paralisada através de incubação a 85 °C por 5 minutos. Para verificar a eficiência da reação da transcriptase reversa em sintetizar moléculas de cDNA foi realizada uma amplificação por qPCR utilizando iniciadores para o gene de referência beta actina (*ACTB*). A amplificação adequada deste gene indica uma boa síntese de cDNA.

4.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) onde foi utilizado o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), que emite sinal de fluorescência ao intercalar com DNA dupla-fita. Os *primers* foram desenhados no programa online OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA), analisados quanto a formação de estruturas como *hairpins* e *dimers* e submetidos ao programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmação de especificidade. Como controle endógeno utilizou-se *primers* para amplificação do gene da beta actina (BAC). Em todos os casos foram feitos controles negativos, com água estéril substituindo a amostra. As amostras foram amplificadas em duplicatas. As reações foram preparadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa usado foi: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Após a amplificação, a curva de melting foi determinada, através da variação de temperatura de 95 °C por 15s, 60 °C por 1 min e novamente 95 °C por 15s. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na tabela 3.

A quantificação dos resultados se baseia na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). As amostras estudadas tiveram a expressão relativa determinada. Os dados de Ct foram exportados para uma planilha no programa *Excel* (Microsoft Corporation) e, então, analisados. O ΔCt foi calculado utilizando as diferenças na média de Ct entre os genes alvos e seus controles endógenos. Após, o $\Delta\Delta Ct$ foi calculado em relação a uma situação considerada referência, que constitui a amostra calibradora. Em seguida, procede-se calculando o $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 3. Sequência dos primers utilizados

Gene	Número de Acesso	Forward primer	Reverse primer
Beta Actina (BAC)	NM_001101.5	5'- CAAGCAGGAGTATG ACGAGTC-3'	5'- GCCATGCCAATCT CATCTTG -3'
phosphatase and tensin homolog (PTEN)	NM_000314.8	5'- CACCAGATGTTAGTG ACAATGAAC -3'	5'- TCATGGTGTTTAA TCCCTCTTGA -3'
AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1)	NM_00101443 1.2	5'- TCTATGGCGCTGAGA TTGTG -3'	5'- CTTAATGTGCCCG TCCTTGT -3'
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PI3K)	NM_006218.4	5'- TACCCGAGTGCCAA AAATGC -3'	5'- AATCGGCCATGTG GTTTGTG -3'
SH2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase (SHP2)	NM_00137462 5.1	5'- CAGGGACGTTTCATTG TGATTG -3'	5'- AATCGGTA CTGTG CTTCTGTC -3'

4.7 Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real

4.7.1 Concentração de Primer

A concentração ótima do *primer* utilizado na qPCR, deve ser mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra sem que haja a formação de produtos secundários. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (*foward* e *reverse*) nas concentrações finais apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Matriz para Padronização da Concentração Ótima de *Primers Forward* e *Reverse*

<i>Primer Forward</i> (nM)	<i>Primer Reverse</i> (nM)		
	100	150	300
100	100/100	100/150	100/300
150	150/100	150/150	150/300
300	300/100	300/150	300/300

A concentração ideal foi aquela na qual o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), maior ΔRn (variação de fluorescência) e não apresentou formação de dímeros, mesmo nos poços com NTCs (*no-template controls*). Na tabela 5 estão listadas as concentrações ótimas dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo.

4.7.2 Eficiência de reação

Para que a reação de qPCR seja confiável e reprodutiva são necessárias condições ótimas de reação, onde as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo de amplificação, ocorrendo duplicação da amostra. Após determinadas às concentrações ideais dos *primers* foram realizadas diluições seriadas de uma amostra conhecida para avaliar a eficiência do experimento, a qual é indicada pela inclinação (*slope*) da curva padrão. Utilizaram-se diluições seriadas de amostras de cDNA de um indivíduo do grupo controle. Uma eficiência de 100% resulta em uma curva padrão com *slope* de -3,32. A eficiência de amplificação é dada pela fórmula $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Outros parâmetros como r^2 e Y- intercept (ponto no qual a curva corta o eixo Y) também são obtidos neste experimento e foram cuidadosamente avaliados. Para ser considerado eficiente, um

primer deve apresentar valor de eficiência entre 95 – 105%, $R2 \geq 0,99$, *slope* próximo a -3,32 e Y- intercept maior que 32 (Bustin et al., 2009). A curva de *melting* também foi analisada para verificar a formação de dímeros ou amplificações inespecíficas, representadas pelo aparecimento de mais de um pico. Após obtidos e analisados os parâmetros citados, é determinado um *threshold* que será utilizado nas análises posteriores (Bustin et al., 2009). Os principais parâmetros referentes a cada *primer* utilizado neste trabalho estão listados na tabela 7.

Tabela 5. Parâmetros de importância para os *primers* caracterizados

<i>Gene</i>	<i>Concentração</i>	<i>Eficiência</i>	<i>Threshold</i>
<i>Beta-Actina</i>	300/150	101,311%	0,098701
<i>PTEN</i>	100/150	101,685%	0,139978
<i>PI3K</i>	100/100	97,141%	0,1
<i>AKT1</i>	100/100	104,559%	0,08
<i>SHP2</i>	150/150	96,014%	0,08

4.8 Western Blotting

Para a lise das células vermelhas utilizou-se o seguinte tampão: EDTA (10mM), Trizma base (100mM), pirofosfato de sódio (10mM), fluoreto de sódio (100mM), ortovanadato de sódio (10mM), PMSF (2mM), Aprotinina (0,1mg/ml) Triton (10%) e cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science). Amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 3.000 g para separação do plasma e remoção do *buffy coat*. O precipitado de hemácias e o plasma foram transferidos para diferentes tubos, onde foi adicionado o mesmo volume de tampão às amostras. Estas amostras foram incubadas por 40 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 12.000g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Após estabelecer a mesma concentração de proteínas totais para todas as amostras (50µg), foram adicionados a elas tampão de Laemmli (Laemmli, 1970). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) por transferência submersa. A membrana foi bloqueada por 2 horas com 5% p/v de leite desnatado em TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, pH=8, com 0,1% v/v de Tween 20). Todos os anticorpos foram utilizados conforme orientação do fabricante. Anticorpos primários: *PTEN (138G6) Rabbit mAb #9559* (Cell Signaling), *Phospho-PTEN (Ser380/Thr382/383) Antibody #9554* (Cell Signaling), Anti-GAPDH policlonal rabbit (diluição 1:10.000, EMD Millipore #ABS16); Anticorpos secundários: Goat anti-rabbit IgG conjugated HRP (diluição 1:10.000, Biorbyt Ltd - Cambridge, Cambridgeshire, UK).

Após incubação com anticorpo secundário por 3 horas, a membrana foi lava lavada (TBS-T por 4X de 5 min. cada) e incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (SuperSignal West pico Chemiluminescent Substrate - ThermoScientific) por quimioluminiscência de acordo com as instruções do fabricante. As bandas foram visualizadas e fotografadas usando um aparelho fotodocumentador ChemiDoc (Bio- Rad, Hercules, Califórnia, EUA). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

4.9 Análise estatística

Os dados são apresentados na forma de média com desvio padrão (\pm SD; standard deviation) e foram comparados com o teste Kruskal-Wallis e correção de Dunn, utilizando o GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Níveis de RNAm de *PTEN* são alterados em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão

Os níveis transcricionais de *PTEN* foram analisados em reticulócitos de indivíduos saudáveis (CTRL) (n= 10) e pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão (BTNDT) (n= 13) e dependente de transfusão (BTDT) (n= 9). Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo dos níveis de RNAm de *PTEN* em pacientes BTNDT quando comparados com indivíduos sadios e nenhuma diferença entre os pacientes BTDT e os demais grupos analisados (figura 9).

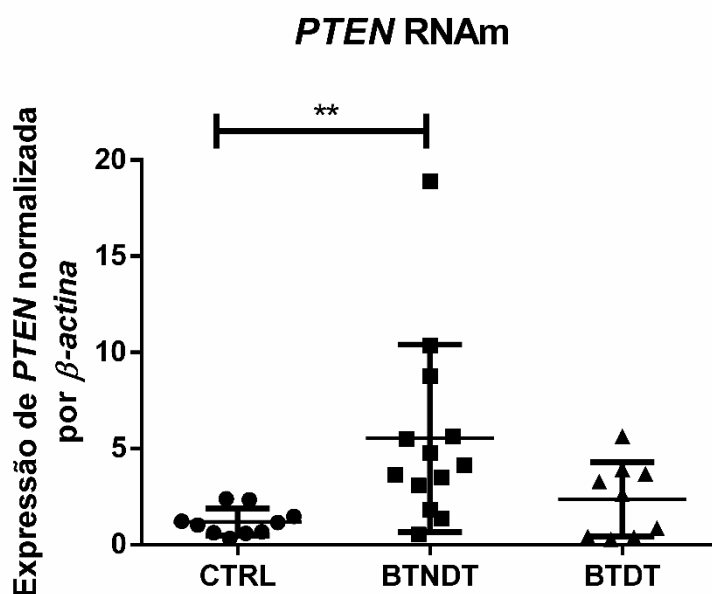


Figura 9. Análise da expressão gênica de *PTEN* em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependente de transfusão (n=13) e dependente de transfusões (n=9) e indivíduos sadios (n=10). A qPCR foi realizada utilizando os primers descritos na tabela 3. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referência beta actina (BAC). Os resultados estão apresentados na forma de mediana. Os valores de p foram considerados significativos (**p=0,0034). Para as análises, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Nossos resultados revelam um aumento significativo da expressão de *PTEN* nos pacientes beta talassêmicos não dependente de transfusão quando comparados aos

indivíduos controles, e ainda que não seja significativo, parece haver também um aumento em relação ao grupo de pacientes dependente de transfusões. Considerando os estudos de Huo que investigou os efeitos da deleção de PTEN e Romanello que estudou os antioxidantes em pacientes talassêmicos, nossos dados corroboram esta literatura, uma vez que este aumento observado nos pacientes não dependente de transfusão está em concordância com um aumento do RNAm de *PRDX1* e *SOD* observados por Romanello. (Huo et al., 2008; Romanello et al., 2018)

Curiosamente, observando os resultados da quantificação relativa de RNAm de *PTEN*, tornou-se perceptível uma separação entre dois grupos nas amostras constituídas pelo grupo de pacientes BTDT. Essa curiosa separação nos chamou a nossa atenção, por isso voltamos nossos olhos para os dados dos pacientes. Entre os pacientes beta talassêmicos dependente de transfusões inseridos no estudo, foi observada uma grande discrepância entre os níveis de HbA e HbF dos pacientes, então optamos por separar os resultados considerando esta separação e plotamos novamente os resultados separando estes grupos. Para melhor entendimento, os pacientes com altos níveis de HbA foram classificados como grupo BTDT A e o grupo com altos níveis de HbF foi denominado de BTDT F. Além disso, o grupo BTDT A passou a se diferenciar estatisticamente do grupo de pacientes BTNDT (Figura 10)

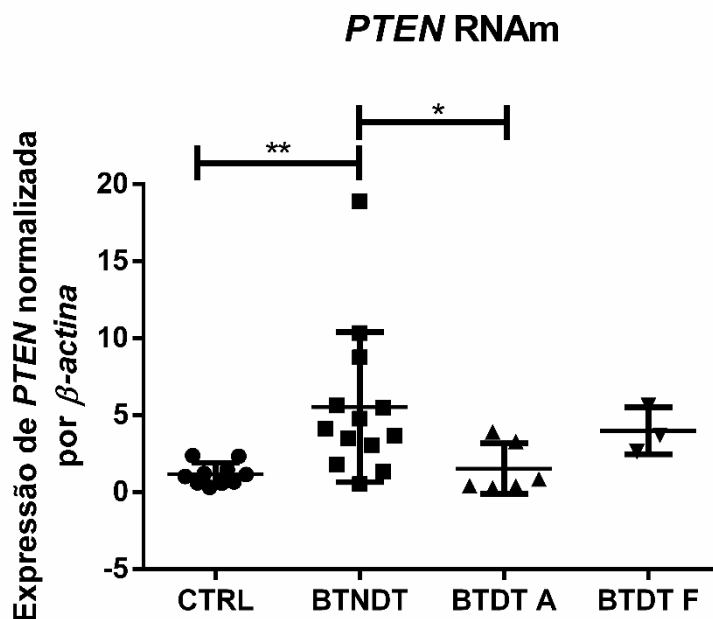


Figura 10. Análise da expressão gênica de *PTEN* em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão e dependentes de transfusão e indivíduos saudios. A qPCR foi realizada utilizando os primers descritos na tabela 3. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referência beta actina (BAC). Os resultados estão apresentados na forma de média com desvio padrão. Com a divisão dos pacientes dependente de transfusões em dois grupos, é possível perceber uma redução do grupo BTDT A em comparação ao grupo BTNDT ($p=0,0144$)

Observando os dados hematológicos desses pacientes foi possível perceber que o grupo denominado como BTDT A tem índices de HbA bem mais próximos do grupo de pacientes beta talassêmicos não dependente de transfusão. Além disso, chamou-nos a atenção que apesar de serem classificados como BTDT, o grupo denominado como BTDT F possui altos níveis de HbF e ainda que não seja estatisticamente significativo, ele parece apresentar os níveis mais altos de RNAm de *PTEN*. (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros hematológicos dos pacientes beta talassêmicos dependentes de transfusão agrupados segundo os níveis de HbF.

Parâmetros	Beta talassemia dependente de transfusão (A) n=6	Beta talassemia dependente de transfusão (F) n=3
Cel. Verm. (10^6mm^3)	3,2 ± 0,33	2,5 ± 0,08
Hb (g/dL)	7,2 ± 1,01	5,3 ± 0,21
VCM (fL)	72,1 ± 5,3	70,2 ± 1,91
Ret (%)	3,8 ± 3,71	3,7 ± 2,53
Hct (%)	23,3 ± 2,98	23,8 ± 2,5
HbF (%)	13,8 ± 4,86	97,2 ± 0,12
HbA (%)	82,7 ± 4,89	0
HbA2(%)	3,5 ± 0,44	2,8 ± 0,12
Cel. Branc. (10^3mm^3)	14,4 ± 5,6	8,5 ± 1,44

Uma das principais vias terapêuticas para tratamento da beta talassemia é a busca pelo resgate da expressão de HbF, que realizaria a função da cadeia beta afetada. Um estudo de Yu e colaboradores cujo objetivo era encontrar potenciais alvos para fármacos observou que inibir a atuação de PTEN teve um efeito positivo na ativação de HbF através da via AKT (Yu et al., 2022). Ao observarmos os dados dos pacientes estudados, podemos perceber a baixa concentração de HbF entre os pacientes talassêmicos não dependente de transfusão, que apresentaram altos níveis do RNAm quando comparados com o grupo controle.

Porém, quando observamos os subgrupos da BTDT, vemos que o grupo “F” tem uma maior concentração de RNAm que o grupo “A”, entretanto, os níveis observados de HbF são o oposto do que seria esperado, com os pacientes do grupo “F” apresentando uma quantidade maior de HbF, sugerindo que possa haver mecanismos de controle em ação muito além da simples redução ou eliminação de PTEN, como a existência de SNPs que afetem o funcionamento da proteína. Para a constatação dessa hipótese, estudos mais aprofundados e com mais pacientes devem ser conduzidos.

Um ponto importante a ser destacado que ressalta a presença de mecanismos ainda desconhecidos envolvidos nesse processo é que o estudo de Yu e colaboradores utilizou linhagens celulares como modelo de estudo, demonstrando que a inibição de PTEN teve

efeito positivo na produção de HbF sem que houvesse prejuízo da diferenciação, enquanto Zhang e colaboradores utilizaram uma linhagem de camundongos quando fizeram a observação do efeito negativo da deleção de *PTEN* na manutenção do pool de células-tronco hematopoéticas e a prevenção do comprometimento destas com doenças mieloproliferativas (Yu et al., 2022; Zhang et al., 2006).

5.2 Avaliação do conteúdo proteico de PTEN revela importante redução na presença da proteína em pacientes beta talassêmicos dependentes de transfusão

Visando caracterizar a produção da proteína PTEN e relacionar com os achados de qPCR, os níveis de proteína de PTEN foram avaliados em hemácias de indivíduos sadios (CTRL, n=6) e de pacientes beta talassêmicos, não dependente de transfusão (BTNDT, n=10) e dependentes de transfusão (BTDT, n=10). Diferente dos resultados encontrados no qPCR, não detectamos diferença significativa nos níveis da proteína quando comparados os grupos CTRL e BTNDT (A), porém, os níveis de PTEN foram significativamente menores em pacientes BTDT quando comparados com o grupo controle e com o grupo intermediário (B e C) (Figura 11).

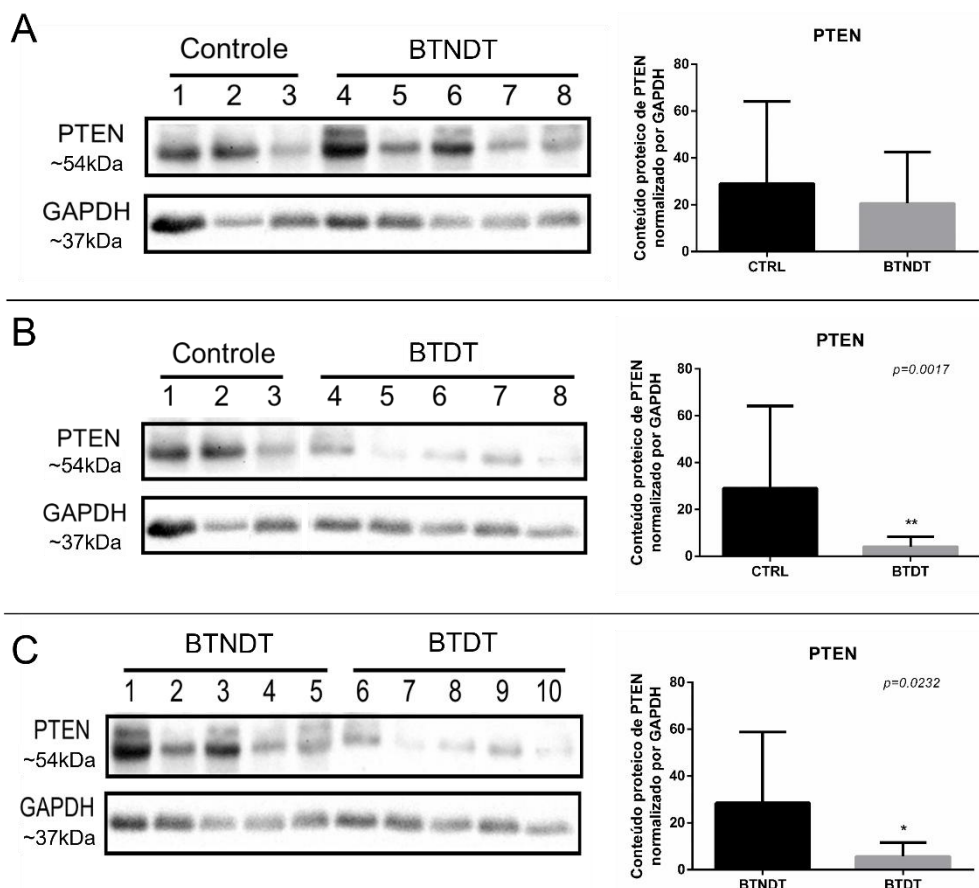


Figura 11. Análise do nível proteico de PTEN no lisado celular de eritrócitos de indivíduos saudáveis (CTRL, n=6) e em pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão (BTNDT, n=10) e beta talassemia dependente de transfusão (BTDT, n=10). As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50ug de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referência endógena o GAPDH. As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com desvio padrão (\pm SD) e são representativos de duas membranas independentes. (A) Não houve diferença significativa entre os níveis de PTEN em controles e BTNDT. (B) Houve redução considerável do conteúdo de PTEN em BTDT comparado a indivíduos controles ($p = 0,0017$) e também quando comparados ambos os fenótipos da doença (C) ($p=0,0232$).

De maneira similar ao que foi observado pelo estudo da expressão genica, observamos uma importante redução do conteúdo proteico de PTEN em pacientes beta talassêmicos dependente de transfusões, o que novamente concorda com os dados estabelecidos uma vez que esses pacientes demonstram também níveis reduzidos da PRDX1. Entretanto,

eles exibem níveis elevados da PRDX2 o que podem indicar que uma via diferente de sinalização está ativa.

PTEN exerce sua função de fosfatase desde que seu sítio ativo esteja protegido de inativação através da oxidação. Essa inativação pode ser aumentada pela presença de espécies reativas de oxigênio, especialmente H_2O_2 , que está presente em abundância nos pacientes beta talassêmicos. A proteção de PTEN desta inativação está intimamente ligada ao sistema antioxidante das células, principalmente PRDX1, PRDX2 e TRX1.

Conforme já citamos anteriormente, Romanello e colaboradores observaram que os pacientes talassêmicos dependente de transfusões possuem um nível reduzido de PRDX1 quando comparados com os não dependentes de transfusão, porém, há uma inversão ao observar os níveis de PRDX2. Entretanto, o mesmo estudo observou haver uma maior hiperoxidação das peroxirredoxinas 2-Cys em pacientes talassêmicos dependentes de transfusão, apontando que, ainda que a maior concentração de PRDX2 pudesse proteger PTEN, a grande presença de ERO pode inviabilizar esta colaboração (Romanello, et al. 2018).

Ainda não há uma clara definição de como PTEN migra para o núcleo, sendo que se acredita que esse processo possa ocorrer devido à ubiquitinação. Entretanto, foi observado por Chang e colaboradores que o estresse oxidativo colabora com essa recolocação, ao mesmo tempo, em que retarda a passagem de PTEN fosforilado para o citoplasma (Chang et al., 2008). Uma vez que a fase final da diferenciação eritroide envolve a extrusão do núcleo, todo o conteúdo proteico deste não pode ser avaliado, porém, podemos supor que esse mecanismo colabore para as quantidades discrepantes de proteína observadas. Corroborando com a possibilidade da perda desses níveis proteicos, não pudemos detectar nas proteínas a mesma diferença que observamos quando separamos os pacientes por sua concentração de HbA.

Outro importante parceiro já estabelecido de PTEN, a proteína APEX1 também já foi identificada como sendo diferencialmente regulada em pacientes talassêmicos não dependente de transfusão e dependente de transfusão (Fantini et al., 2008; Maia de Oliveira da Silva et al., 2019). APEX1, curiosamente, está envolvido tanto com a proliferação celular e a prevenção da morte celular, quanto regula fatores como a p53 e Egr-1 que estão envolvidos com apoptose. Foi observado que PTEN depende da ativação de Egr-1 por APEX1, e também que sua presença no núcleo pode estabilizar p53 e melhorar suas funções (Chang et al., 2008). Entre as ações conjuntas de p53 e PTEN, podemos destacar o estudo de Lee e colaboradores que observaram que a deleção de p53 pôde recuperar a capacidade de reconstituição das células-tronco hematopoéticas que se apresentava prejudicada pela prévia deleção de PTEN, sugerindo que a regulação fina de PTEN permitindo sua livre circulação pela célula seja um ponto-chave para a regulação da homeostase celular.

5.3 A expressão de PI3K é aumentada em pacientes talassêmicos

Considerando que as proteínas PI3K, AKT formam uma importante via de sinalização celular associada a PTEN que regula vários processos celulares, incluindo crescimento, sobrevivência, metabolismo e resposta ao estresse oxidativo avaliamos nossa hipótese é que a sinalização alterada da via PI3K/AKT/PTEN pode contribuir para a patogênese da beta talassemia. Por essa razão, avaliamos a expressão dessas enzimas em pacientes BTNDT (n=13) e BTDT (n=9), além de compará-los com o controle (n=10). Foi observado que tanto os pacientes BTNDT quanto os BTDT a expressão de *PI3K* mostrou um aumento significativo da expressão quando comparados com o controle, sem diferença entre os grupos de pacientes. Já para o gene *AKT1*, não foi observada diferença significativa entre os três grupos (Figura 12).

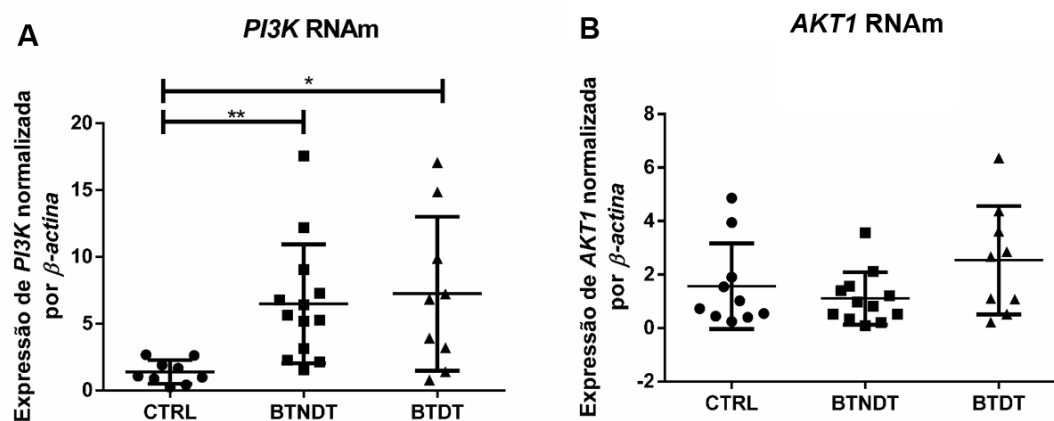


Figura 12. Análise da expressão gênica de PI3k e AKT em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependentes de transfusão (n=13) e dependentes de transfusão (n=9) e indivíduos saudáveis (n=10). A qPCR foi realizada utilizando os primers descritos na tabela 3. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referência beta actina (BAC). Os resultados estão apresentados na forma de média com desvio padrão (SD). (A). Houve um aumento significativo nos níveis de RNAm em pacientes BTNDT e BTDT quando comparados ao controle. (B). Não houve diferença significativa entre os grupos analisados para AKT1.

A via PI3K/AKT é de grande importância para a proliferação celular e também desempenha um importante papel na eritropoese. Bouscary e colaboradores demonstraram que PI3K é ativada pela EPO e que a inibição desta via levava a uma apoptose entre os progenitores eritroides (Bouscary et al., 2003). Desta forma, nossos dados corroboram esta observação, uma vez que níveis aumentados do RNAm de *PI3K* foram encontrados em ambos os grupos de pacientes beta talassêmicos.

Considerando a função antagonista entre PTEN e PI3K, é interessante observar que o grupo talassêmico intermediário possui, além do aumento da expressão de *PI3K*, um aumento da expressão de *PTEN*. Pacientes talassêmicos, conforme já mencionado, precisam produzir novas células eritroides em um ritmo mais acelerado quando comparado com a duração do processo em indivíduos controles. Entretanto, essa produção pode ser danosa para esses pacientes, uma vez que esse processo acaba gerando

a condição chamada de eritropoese ineficaz, que consiste na incapacidade dos progenitores eritroides de se diferenciarem completamente, seja por consequência da morte celular ou defeitos intrínsecos. Essa incapacidade de diferenciação também foi vista por Choorapoikayil e colaboradores que geraram zebrafish mutantes com a deleção de *PTEN*, onde sinalização de *PI3K* favoreceu a proliferação de células da linhagem sanguínea, porém a capacidade de diferenciação em células maduras foi comprometida. Essa morte celular gera um ciclo de sinalização para produção de novas células que eventualmente pode gerar consequências graves ao paciente, como a hepatoesplenomegalia e a sobrecarga de ferro. (Ramos et al., 2010; Choorapoikayil et al., 2014).

A presença de níveis elevados no RNAm em pacientes não dependente de transfusão sugere que *PTEN* realmente possa estar agindo para reduzir a elevada proliferação celular. Ao analisarmos os níveis proteicos de *PTEN*, entretanto, percebemos não haver diferença de conteúdo entre pacientes talassêmicos não dependente de transfusão e controles, porém, há uma redução significativa em seu conteúdo nos pacientes talassêmicos dependente de transfusão, tanto em relação ao grupo controle quanto em relação ao grupo intermediário, fazendo sentido se considerarmos que esses pacientes estão sujeitos a um prognóstico pior com relação aos danos causados pela eritropoese ineficaz.

Considerando os efeitos negativos causados pela eritropoese ineficaz nos pacientes, podemos supor que o controle exercido por *PTEN* esteja relacionado a uma tentativa do organismo de conter a produção excessiva de novas células eritropoéticas. Embora essa produção seja necessária devido à rápida destruição das hemácias, o processo contínuo também acarreta uma série de efeitos adversos, sugerindo que *PTEN* possa atuar como um modulador para mitigar esses impactos negativos.

Uma vez que ocorreu uma evidente divisão entre os fenótipos de BTDT, optamos por tratar os dados dos genes *PI3K* e *AKT1* de maneira semelhante, considerando os grupos de pacientes observados com *PTEN*. É possível observar que não há diferença significativa entre os subgrupos BTDT e nenhum dos demais grupos. Para o gene *AKT1*, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos avaliados (Figura 13).

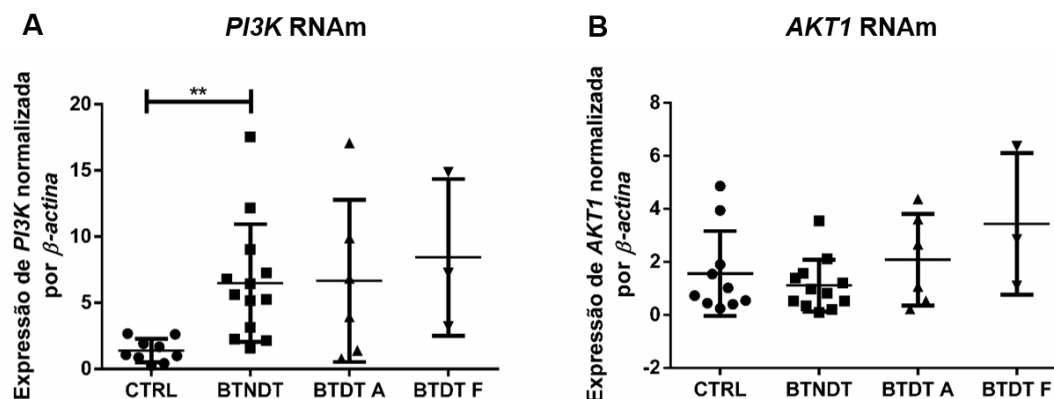


Figura 13. Análise da expressão gênica de *PI3k* e *AKT* em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependente de transfusão e dependentes de transfusão e indivíduos saudios. A qPCR foi realizada utilizando os primers descritos na tabela 3. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referência beta actina (BAC). Os resultados estão apresentados na forma de média com desvio padrão (SD). (A). Houve um aumento significativo nos níveis de RNAm em pacientes BTNDT quando comparados ao controle (** $p=0,0027$). (B). Não houve diferença significativa entre os grupos analisados para *AKT1*.

Quando separamos os grupos analisados considerando o agrupamento visto para o RNAm de *PTEN*, percebemos que *PI3K* não é possível identificar o aumento observado em BTDT. Se associarmos esses dados com os conhecimentos obtidos da literatura, podemos supor que esse aumento de *PI3K* esteja relacionado a proliferação celular presente na doença, enquanto os níveis de *PTEN* ainda que elevados podem estar concentrados em uma via secundária que pode estar relacionada com a HbF. Entretanto,

ainda são necessários estudos mais aprofundados para identificar corretamente essa relação.

5.4 Avaliação do estado de fosforilação de PTEN sugere uma queda em pacientes BTDT

A fosforilação da região C-terminal de PTEN regula tanto sua atividade quanto sua estabilidade. Na forma desfosforilada, PTEN permanece ativa, porém mais suscetível à degradação. Já sua forma fosforilada, embora reversivelmente inativada, perde a capacidade de interação com a via PI3K (Millella et al., 2015). Para avaliar o estado de fosforilação dessa proteína nos grupos analisados, realizamos um experimento de western blot, quantificando a forma fosforilada e comparando-a com a quantidade total de PTEN. Os resultados mostraram uma aparente redução na presença de PTEN fosforilada em pacientes com beta-talassemia não dependente de transfusão (BTDT) em comparação aos pacientes com beta-talassemia não dependente de transfusão (BTNDT) (Figura 14).

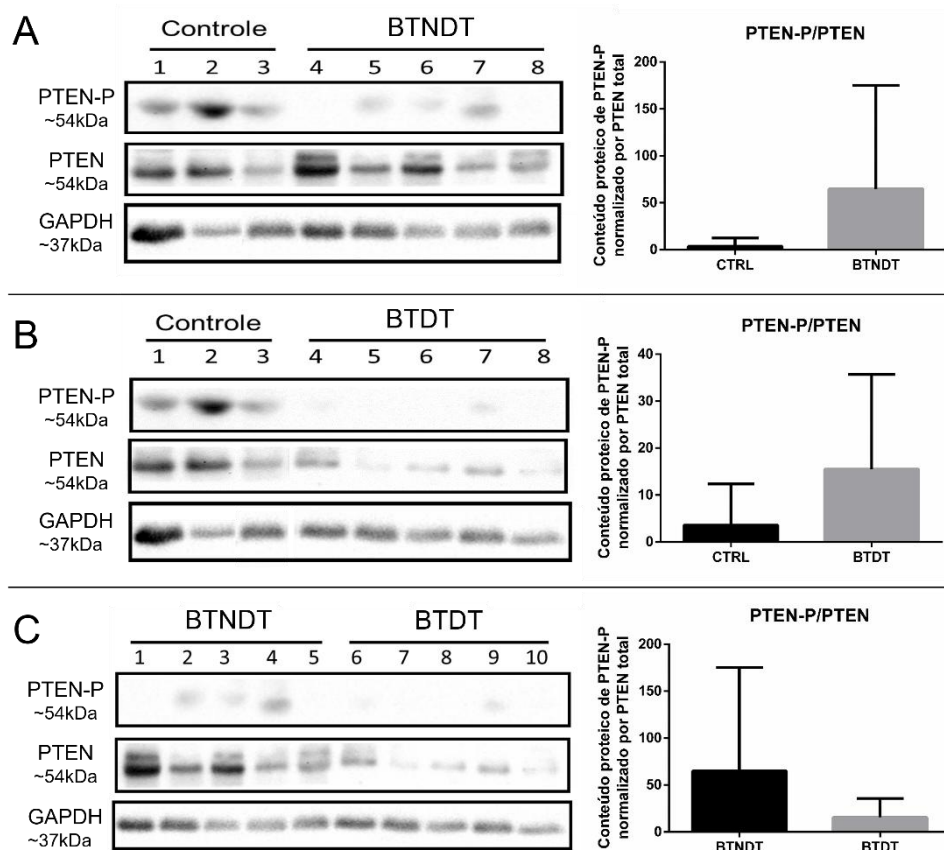


Figura 14. Análise da fosforilação de PTEN no lisado celular de eritrócitos de indivíduos saudáveis (CTRL) e em pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão (BTNDT) e beta talassemia dependente de transfusão (BTDT). As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50ug de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referência endógena o GAPDH, e os resultados representam o conteúdo de PTEN-P comparada com o conteúdo total de PTEN. As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com desvio padrão (\pm SD) e são representativos de duas membranas independentes. Não houve diferença significativa do conteúdo de PTEN-P entre os grupos analisados.

Como já descrito anteriormente, a forma fosforilada de PTEN possui uma maior estabilidade, porém perde sua capacidade de interação com o substrato PIP3. Além disso, também há indícios de uma maior migração desta conformação da proteína para o núcleo, onde o estresse oxidativo regula seu retorno ao citoplasma (Chang et al., 2008). Corroborando esse fato, podemos perceber que os indivíduos controle possuem uma

maior quantidade da proteína fosforilada quando comparados aos grupos de pacientes, uma vez que esses indivíduos estão submetidos a uma quantidade menor de estresse oxidativo, e, portanto, sua capacidade de circulação de PTEN na forma fosforilada não é afetada.

Observando os resultados obtidos, é possível perceber que o grupo de pacientes beta talassêmicos não dependente de transfusão, ainda que não estatisticamente significativo, indica uma quantidade maior de PTEN em sua forma ativa, o que novamente aponta para a questão da interrupção da via PI3K/AKT1 e consequente redução dos potenciais riscos trazidos pela eritropoese desenfreada que pode acometer esses pacientes.

Com relação aos pacientes dependente de transfusões, estes já haviam apresentado baixos níveis de PTEN total, e os resultados sugerem também uma baixa presença da forma fosforilada, indicando que a forma ativa é mais proeminente ainda que esteja presente em quantidades muito menores comparada aos pacientes beta talassêmicos não dependente de transfusão.

5.5 Avaliação de SHP2 não revela diferenças significativas entre os grupos de pacientes estudados.

SHP2 é uma tirosina-fosfatase com um papel na regulação oncogênica, sendo superexpresso em tumores gástricos, através da ativação de AKT. Além disso, já foi demonstrado um papel positivo dessa proteína em hematopoese (Tseng et al., 2012; Zhu et al., 2015). Considerando que alguns estudos já associaram de maneira inconclusiva a relação desta com PTEN, optamos por observar como estaria a expressão genica de *SHP2* nos pacientes analisados (Figura 15).

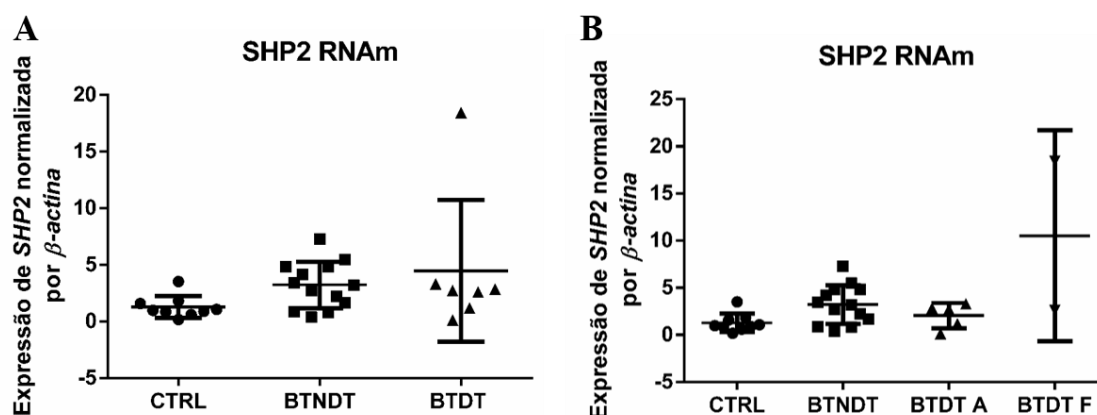


Figura 15. Análise da expressão gênica de SHP2 em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos não dependente de transfusão e dependente de transfusão e indivíduos saudios. A qPCR foi realizada utilizando os primers descritos na tabela 3. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referência beta actina (BAC). Os resultados estão apresentados na forma de média com desvio padrão (SD). (A). Não houve diferença significativa entre os grupos analisados. (B). Considerando a separação dos pacientes BTDT com relação aos níveis de HbA/HbF, também não houve diferença significativa.

De acordo com Zhu e colaboradores, SHP2 e PTEN possuem papéis antagônicos na mieloproliferação, porém cooperam para promover a eritropoese. Ainda que SHP2 tenha sido considerado tanto um oncogene quanto um supressor tumoral, Morales e colaboradores observaram que SHP2 e PTEN podem atuar juntos para ativar as vias supressoras de tumor (Morales et al., 2014; Zhu et al., 2015). Embora não significativo, nossos dados sugerem um possível aumento na expressão de *SHP2* em pacientes com beta-talassemia dependente de transfusão, o que pode indicar um mecanismo de controle proposto para combater a proliferação excessiva de células vermelhas. Esses achados podem fornecer informações importantes sobre a regulação celular em resposta à eritropoese exacerbada nesses pacientes. No entanto, estudos mais aprofundados com uma população maior de pacientes, bem como a avaliação da produção desta proteína e sua interação com PTEN devem ser realizados para a comprovação desta hipótese.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

PTEN tem associações muito importantes com diversas proteínas que estão sendo gradualmente associadas aos fenótipos da beta talassemia. Além de todas as suas funções já descritas em doenças como cânceres e diabetes, a comprovação de que ele também pode se envolver com a regulação de HbF o torna um alvo interessante demais para que sua participação no manejo da beta talassemia seja negligenciada.

O foco deste estudo entendeu mais profundamente como PTEN se apresenta nos diferentes fenótipos da beta talassemia. Nos resultados deste trabalho observamos uma importante diferença entre os fenótipos dos pacientes beta talassemicos analisados. Compreender as demais modificações que a proteína pode sofrer nesses fenótipos, assim como identificar novos parceiros além dos já conhecidos, certamente ampliará nosso entendimento sobre os mecanismos que distinguem pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão daqueles com beta talassemia dependente de transfusão.

Demonstramos aqui, pela primeira vez, que pacientes com beta talassemia não dependente de transfusão apresentam níveis elevados de RNAm, enquanto os níveis proteicos permanecem semelhantes aos dos controles. Esses dados sugerem que os níveis dessa proteína sejam regulados por processos pós transcricionais e que este resultado possa desempenhar um papel positivo na evolução dos pacientes não dependente de transfusão, em contraste com os níveis reduzidos observados nos pacientes com beta talassemia dependente de transfusão.

Da mesma forma, demonstramos também a curiosa dinâmica da expressão de PTEN nos pacientes beta talassêmicos dependente de transfusão e como ela parece se relacionar com os níveis de HbF nestes pacientes. Ainda que um estudo “*in vitro*” aponte

para uma relação contrária, outros dados da literatura embasam que o papel de PTEN é crucial para a eritropoese “*in vivo*” e, portanto, entender exatamente essa regulação funciona pode trazer diversas vantagens para o avanço do manejo da doença.

Estudos futuros focados na proteína PTEN devem explorar com maior profundidade como suas funções, além da fosforilação, influenciam os indivíduos com talassemia, assim como investigar detalhadamente o impacto de sua translocação nuclear nos diferentes perfis de pacientes beta talassemicos. Adicionalmente, outro aspecto a ser considerado em estudos futuros é a emergência de PTEN-long, cuja capacidade migratória pode ser uma aliada crucial para compreender a regulação de PTEN. Além disso, é importante investigar com mais detalhes como os mecanismos de interação entre SHP2 e PTEN ocorre nesses pacientes, oferecendo novas perspectivas sobre os mecanismos da doença.

7. REFERÊNCIAS

Abrasta – Associação Brasileira de Talassemia. **Jornada Abrasta de Talassemia**. 2023;1–9. Disponível em: <https://abrasta.org.br/info-abrasta/jornada-abrasta-de-talassemia/> Acesso em 20 de abril de 2024

ALI, S et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 9, n. 12, p. e1788, 2021.

ARAÚJO, AS. et al. A Different Molecular Pattern of β -Thalassemia Mutations in Northeast Brazil. **Hemoglobin**, v. 27, n. 4, p. 211-217, 2003.

BANKOGLU, EE et al. Role of PTEN in oxidative stress and DNA damage in the liver of whole-body Pten haplodeficient mice. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166956, 2016.

BERMÚDEZ BRITO, M; GOULIELMAKI, E; PAPAKONSTANTI, EA. Focus on PTEN regulation. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 166, 2015.

BLANCO-APARICIO, C et al. PTEN, more than the AKT pathway. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 7, p. 1379-1386, 2007.

BOU-FAKHREDIN, R et al. Redox balance in β -thalassemia and sickle cell disease: a love and hate relationship. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 967, 2022.

BOUSCARY, Didier et al. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 101, n. 9, p. 3436-3443, 2003.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**. v.55, n. 4, p.611-622, 2009.

CAO, J et al. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. **The EMBO journal**, v. 28, n. 10, p. 1505-1517, 2009.

CHAICHOMPOO, P; SVASTI, S; SMITH, DR. The roles of mitophagy and autophagy in ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10811, 2022.

CHANG, C et al. PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. **Molecular and cellular biology**, 28(10), p. 3281–3289, 2008.

CHLOORAPOIKAYIL, S et al. Pivotal role of Pten in the balance between proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells in zebrafish. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 2, p. 184-190, 2014.

COSTA, FF; FERTRIN, KY; CONRON, N. Síndrome Hemolítica. Fisiopatologia e Clínica. Classificação. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu, v. 1, p.161-167, 2013.

DA CUNHA, AF et al. Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia. In: **Point Mutation**. IntechOpen, 2012.

DE PAULA, CP et al. Peroxiredoxins in erythrocytes: far beyond the antioxidant role. **Journal of Molecular Medicine**, v. 101, n. 11, p. 1335-1353, 2023.

DE SIMONE, G et al. Thalassemias: from gene to therapy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 84, p. 101028, 2022.

FANTINI, D et al. APE1/Ref-1 regulates PTEN expression mediated by Egr-1. **Free radical research**, v. 42, n. 1, p. 20-29, 2008.

FIBACH, E; DANA, M. Oxidative stress in β -thalassemia. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 23, p. 245-261, 2019.

FIBACH, E; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Current molecular medicine**, v. 8, n. 7, p. 609-619, 2008.

FONSECA, SF.; MOURA NETO, JP.; GONCALVES, MS. Prevalence and molecular characterization of β -thalassemia in the state of Bahia, Brazil: First identification of mutation HBB: c. 135delC in Brazil. **Hemoglobin**, v. 37, n. 3, p. 285-290, 2013.

FUJII, J et al. Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood. **Free Radical Research**, v. 55, n. 8, p. 781-799, 2021.

GALANELLO, R; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 5, p. 1-15, 2010.

GELL, DA. Structure and function of haemoglobins. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 13-42, 2018.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.

HARTEVELD, CL. et al. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 44, p. 28-36, 2022.

HO, J et al. PTEN nuclear functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 5, p. a036079, 2020.

HODAKOSKI, C et al. Analysis of intracellular PTEN signaling and secretion. **Methods**, v. 77, p. 164-171, 2015.

HOFFBRAND, AV; MOSS, PAH. **Fundamentos em Hematologia** 7ª edição, Editora Artmed, 2018.

HOFFMAN, R. et al. (Ed.). **Hematology E-Book: Basic Principles and Practice**. Elsevier Health Sciences, 2022.

HUO, Y-Y et al. PTEN deletion leads to deregulation of antioxidants and increased oxidative damage in mouse embryonic fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1578-1591, 2008.

JAING, Tang-Her et al. Molecular genetics of β -thalassemia: A narrative review. **Medicine**, v. 100, n. 45, p. e27522, 2021.

JOHNSON, F; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 340-352, 2005.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOWRY, OH. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAIA DE OLIVEIRA DA SILVA, JP et al. Global gene expression reveals an increase of HMGB1 and APEX1 proteins and their involvement in oxidative stress, apoptosis and inflammation pathways among beta-thalassaemia intermedia and major phenotypes. **British journal of haematology**, v. 186, n. 4, p. 608-619, 2019.

MAKKER, A; GOEL, MM; MAHDI, AA. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. **Journal of molecular endocrinology**, v. 53, n. 3, p. R103-R118, 2014.

MATTE, A; DE FRANCESCHI, L. Oxidation and erythropoiesis. **Current Opinion in Hematology**, v. 26, n. 3, p. 145-151, 2019.

MILELLA, M et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 24, 2015.

MORALES, LD. et al. Protein tyrosine phosphatases PTP-1B, SHP-2, and PTEN facilitate Rb/E2F-associated apoptotic signaling. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97104, 2014.

NGUYEN HUU, T et al. Redox regulation of PTEN by peroxiredoxins. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 302, 2021.

PACHER, P; BECKMAN, JS.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

RAMOS, P et al. Iron metabolism and ineffective erythropoiesis in β -thalassemia mouse models. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1202, n. 1, p. 24-30, 2010.

RAO, E et al. Global distribution of β -thalassemia mutations: An update. **Gene**, p. 148022, 2023.

ROCHA, LBS; MARTINS, MF; GONÇALVES, RP. Distribuição das mutações da β -talassemia em Fortaleza, Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 437-441, 2010.

ROMANELLO, KS. et al. Global analysis of erythroid cells redox status reveals the involvement of Prdx1 and Prdx2 in the severity of beta thalassemia. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0208316, 2018.

SANKARAN, VG.; WEISS, MJ. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. **Nature medicine**, v. 21, n. 3, p. 221-230, 2015.

THEIN, S. L. Beta-thalassaemia. **BaillieresClinHaematol**. v.11, n.1, p.91-126, 1998.

TSENG, P-C et al. Regulation of SHP2 by PTEN/AKT/GSK-3 β signaling facilitates IFN- γ resistance in hyperproliferating gastric cancer. **Immunobiology**, v. 217, n. 9, p. 926-934, 2012.

VERRASTRO, I et al. Reversible oxidation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) alters its interactions with signaling and regulatory proteins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 90, p. 24-34, 2016.

VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. **Redox biology**, v. 6, p. 226-239, 2015.

WORBY, CA.; DIXON, JE. Pten. **Annual review of biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 641-669, 2014.

WU, Y; ZHU, H; WU, H. PTEN in regulating hematopoiesis and leukemogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 10, p. a036244, 2020.

YU, L et al. Identification of novel γ -globin inducers among all potential erythroid druggable targets. **Blood Advances**, v. 6, n. 11, p. 3280-3285, 2022.

ZHANG, J et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 518-522, 2006.

ZHU, HH et al. Shp2 and Pten have antagonistic roles in myeloproliferation but cooperate to promote erythropoiesis in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 43, p. 13342-13347, 2015.