

FATORES GENÉTICOS MODULADORES DOS NÍVEIS ELEVADOS DE HEMOGLOBINA FETAL NA ANEMIA DAS CÉLULAS FALCIFORMES

Teresa Almeida¹, Íris Mateus², Lígia Braga¹, Orquídea Freitas¹, Paula Kjollerström¹, Paula Faustino²

¹ Unidade de Hematologia do Hospital de Dona Estefânia (HDE) – CHLC,

² Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA); Lisboa



INTRODUÇÃO

A Drepanocitose ou Anemia das Células Falciformes (ACF) é uma anemia hereditária de transmissão autossómica recessiva caracterizada pela presença de hemoglobina S (HbS) devido à homocigotia para a mutação A→T no codão 6 do gene da beta-globina (HBB:c.20A>T) localizado em 11p15.5. Embora se trate de uma doença monogénica, o seu fenótipo clínico é bastante heterogéneo (1). Este fato deve-se à influência modificadora tanto de fatores ambientais como de fatores genéticos (2, 3). De entre estes últimos, salienta-se o nível elevado de hemoglobina fetal (HbF; 4). O nível de HbF é também variável entre indivíduos drepanocíticos sendo condicionado por diversos fatores genéticos polimórficos existentes no agrupamento génico da beta-globina e por outros não associados a este agrupamento, como por exemplo os fatores transcrpcionais BCL11A e KLF1 (5, 6).

Este trabalho teve como objetivos identificar molecularmente os fatores genéticos associados a níveis elevados de HbF num grupo de doentes com ACF seguidos no HDE.



Fig. 1. Glóbulos vermelhos de configuração normal e um drepanócito.

MATERIAIS E MÉTODOS

O grupo analisado foi constituído por 14 doentes drepanocíticos, em idade pediátrica compreendida entre os 3 e os 17 anos, todos com HbF elevada (média 15,8% ± 3,7).

Após extração de DNA de alíquotas de sangue periférico foram caracterizados, recorrendo a metodologias de PCR-RFLP ou a sequenciação direta pelo método de Sanger, a mutação drepanocítica (HBB:c.20A>T), quatro polimorfismos (SNPs) no promotor do gene *HBB* (rs112075506, rs11221553, rs112479157 e rs7482144), os haplotipos de restrição no agrupamento génico da beta-globina, um SNP no gene *BCL11A* (rs11886868) e foi sequenciado o gene *KLF1*.

Os resultados obtidos na genotipagem destes doentes foram confrontados com os encontrados num outro grupo de crianças com drepanocitose (n=35) mas com HbF baixa (HbF<8%).

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado usando o software SPSS vs 20. Para verificação da normalidade da distribuição das variáveis foi usado o teste de Shapiro-Wilk e para o estudo de associação da variável HbF com os diferentes grupos de genótipos foi usado o teste de Kruskal-Wallis.

O valor de *p* foi considerado estatisticamente significativo quando <0,05.

RESULTADOS

Após confrontação dos resultados de genotipagem obtidos neste grupo de doentes com os anteriormente encontrados numa população semelhante, também de crianças drepanocíticas, mas com HbF baixa (HbF <8%), foi possível constatar:

1 – Há diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos doentes drepanocíticos, agrupados segundo o nível de HbF (grupo com nível elevado de HbF e grupo de doentes com HbF baixa) quanto ao seu genótipo no SNP rs7482144 (Tabela I). O alelo T deste SNP (vulgarmente conhecido como o local *Xmn I* a -158 do gene G-gama-globina) e o haplotipo Senegal no agrupamento génico da beta-globina (que inclui o alelo T deste local polimórfico) encontram-se estatisticamente associados a níveis elevados de HbF (Tabela II e Fig. 2).

Tabela I – Distribuição dos doentes drepanocíticos segundo o seu nível de HbF (com nível elevado vs nível baixo de HbF) pelos diferentes genótipos referentes ao SNP *Xmn I* a -158 de Gγ-globina (rs7482144).

Genótipo rs7482144 em <i>HBB2</i> *	Doentes SS com nível elevado de HbF (>8%) (n)	Doentes SS com nível elevado de HbF (>8%) (%)	Doentes SS com nível baixo de HbF (<8%) (n)	Doentes SS com nível baixo de HbF (<8%) (%)	Teste Qui-quadrado
CC	6	42,9	28	80,0	<i>p</i> =0,014
CT	3	21,4	5	14,3	
TT	5	35,7	2	5,7	
Total	14		35		

*O SNP rs7482144 localiza-se no promotor do gene Gγ-globina (*HBB2*).

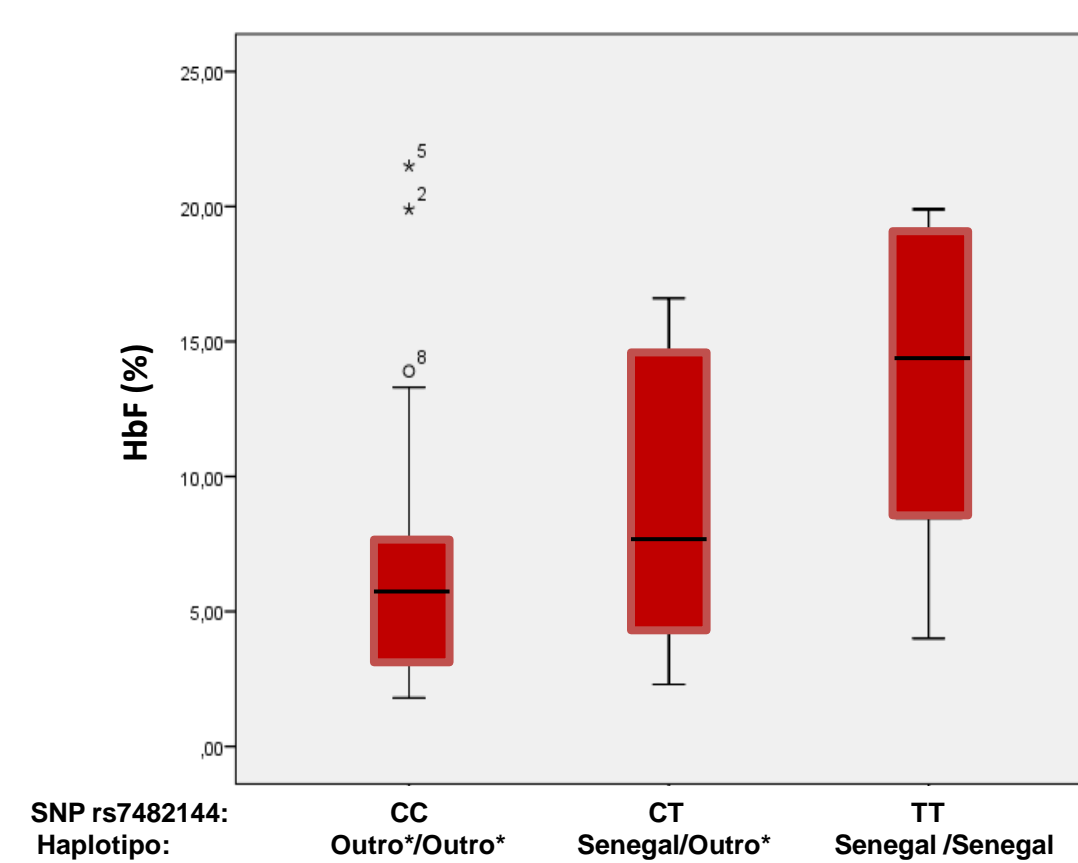


Fig. 2 – Box-plot da distribuição dos valores de HbF segundo os genótipos do polimorfismo rs7482144 e dos haplotipos de restrição no agrupamento génico da beta-globina. *Outro refere-se aos haplotipos Bantu e Benim.

Tabela II – Análise de associação dos níveis de HbF dos doentes drepanocíticos (observados como um todo, n=49) com os genótipos em rs7482144 assim como com os haplotipos no agrupamento génico da beta-globina

Genótipo rs7482144 e Haplótipo	Nº de doentes (n=49)	HbF (%)			Teste Kruskal-Wallis
		mediana	máximo	mínimo	
CC	34	5,8	1,8	21,5	<i>p</i> =0,049
Outro*/Outro*					
CT	7	7,4	2,3	16,6	
Senegal/Outro*					
TT	7	14,5	4	19,9	
Senegal/Senegal					

*Outro: refere-se aos haplotipos Bantu e Benim.

2 - Há diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos doentes drepanocíticos, agrupados segundo o nível de HbF (grupo com nível elevado de HbF e grupo com HbF baixa) quanto ao seu genótipo no SNP rs11886868 no gene *BCL11A* (Tabela III). O alelo C deste SNP encontra-se estatisticamente associado a níveis elevados de HbF (Tabela IV e Fig. 3).

Tabela III – Distribuição dos doentes drepanocíticos segundo o seu nível de HbF (com nível elevado vs nível baixo de HbF) pelos diferentes genótipos referentes ao SNP rs11886868 no gene *BCL11A*.

Genótipo rs11886868 em <i>BCL11A</i> *	Doentes SS com nível elevado de HbF (>8%) (n)	Doentes SS com nível elevado de HbF (>8%) (%)	Doentes SS com nível baixo de HbF (<8%) (n)	Doentes SS com nível baixo de HbF (<8%) (%)	Teste de Qui-quadrado
CC	2	14,3	0	0	<i>p</i> =0,005
CT	9	64,3	12	34,3	
TT	3	21,4	23	65,7	
Total	14		35		

*O SNP rs11886868 localiza-se no intrão 2 do gene *BCL11A*.

Tabela IV – Análise de associação entre os níveis de HbF no total dos doentes drepanocíticos (n=49) e o genótipo em rs11886868 no gene *BCL11A*

genótipo rs11886868 em <i>BCL11A</i>	Nº de doentes (n=49)	HbF (%)			Teste Kruskal-Wallis
		mediana	máximo	mínimo	
CC	2	17,2	19,9	14,5	<i>p</i> =0,026
CT	21	7,4	21,5	2,3	
TT	26	5,3	19,9	1,8	

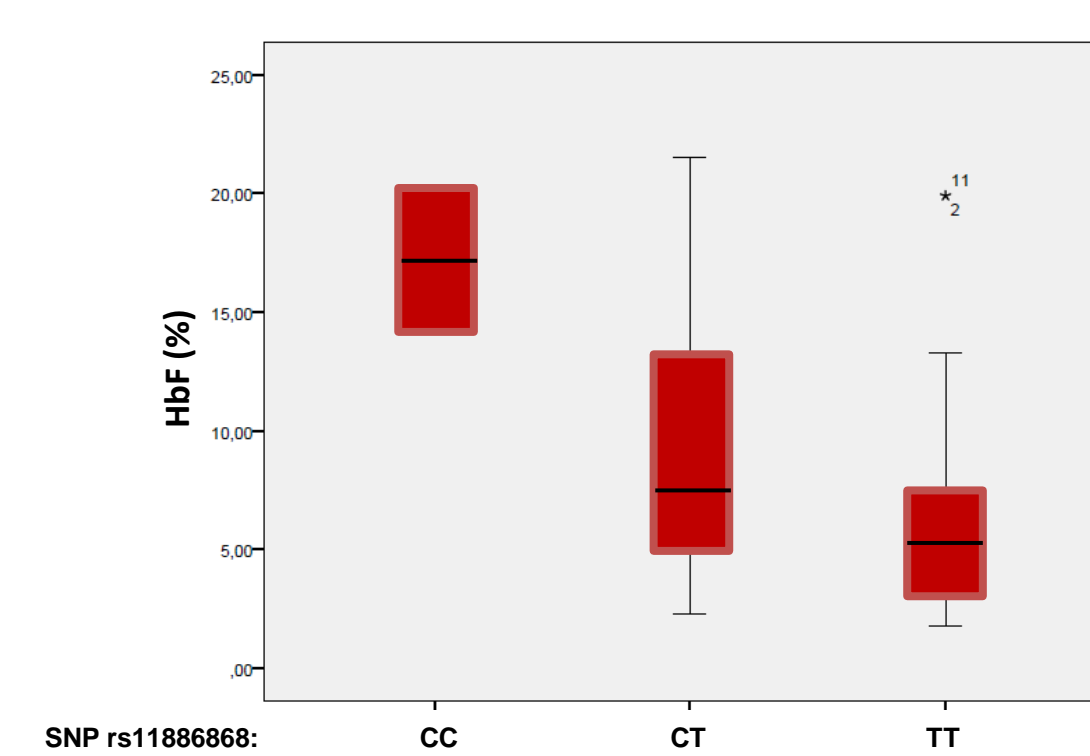


Fig. 3 – Box-plot da distribuição dos valores de HbF segundo os genótipos do polimorfismo rs11886868 no gene *BCL11A*.

3 - Não foram encontradas alterações moleculares no gene *KLF1* que pudessem ser associadas aos níveis elevados de HbF nestes grupo de doentes.

CONCLUSÕES

✓ Em conclusão, neste estudo identificámos dois polimorfismos globínicos, um SNP (*HBB2*_rs7482144_alelo T) e um haplotipo no agrupamento génico da beta-globina (Haplótipo Senegal) ambos associados a níveis elevados de HbF nestes doentes drepanocíticos.

✓ Quanto a fatores não globínicos, foram estudados dois genes (*BCL11A* e *KLF1*) que codificam para fatores transcrpcionais atuando em *trans* e que, conjuntamente com outros co-fatores, reprimem o silenciamento dos genes globínicos de expressão fetal (γ-globina) no período adulto (Fig. 4), (7). No gene *KLF1* não foram detetadas alterações que possam ser associadas aos níveis de HbF. Pelo contrário, o polimorfismo estudado no gene *BCL11A* mostrou-se fortemente associado aos níveis elevados de HbF. Assim, concluímos que existem polimorfismos em fatores genéticos não globínicos que podem modelar a expressão de HbF na drepanocitose.

✓ Uma vez que a HbF é o principal modulador das características clínicas e hematológicas da drepanocitose (porque não participa na formação do polímero de HbS e contribui para a redução da concentração média intracelular de HbS), os modificadores genéticos mencionados que estão a contribuir para a existência dos níveis elevados de HbF nestes doentes também deverão estar associados, conjuntamente com outros fatores, a fenótipos clínicos mais ligeiros da doença.

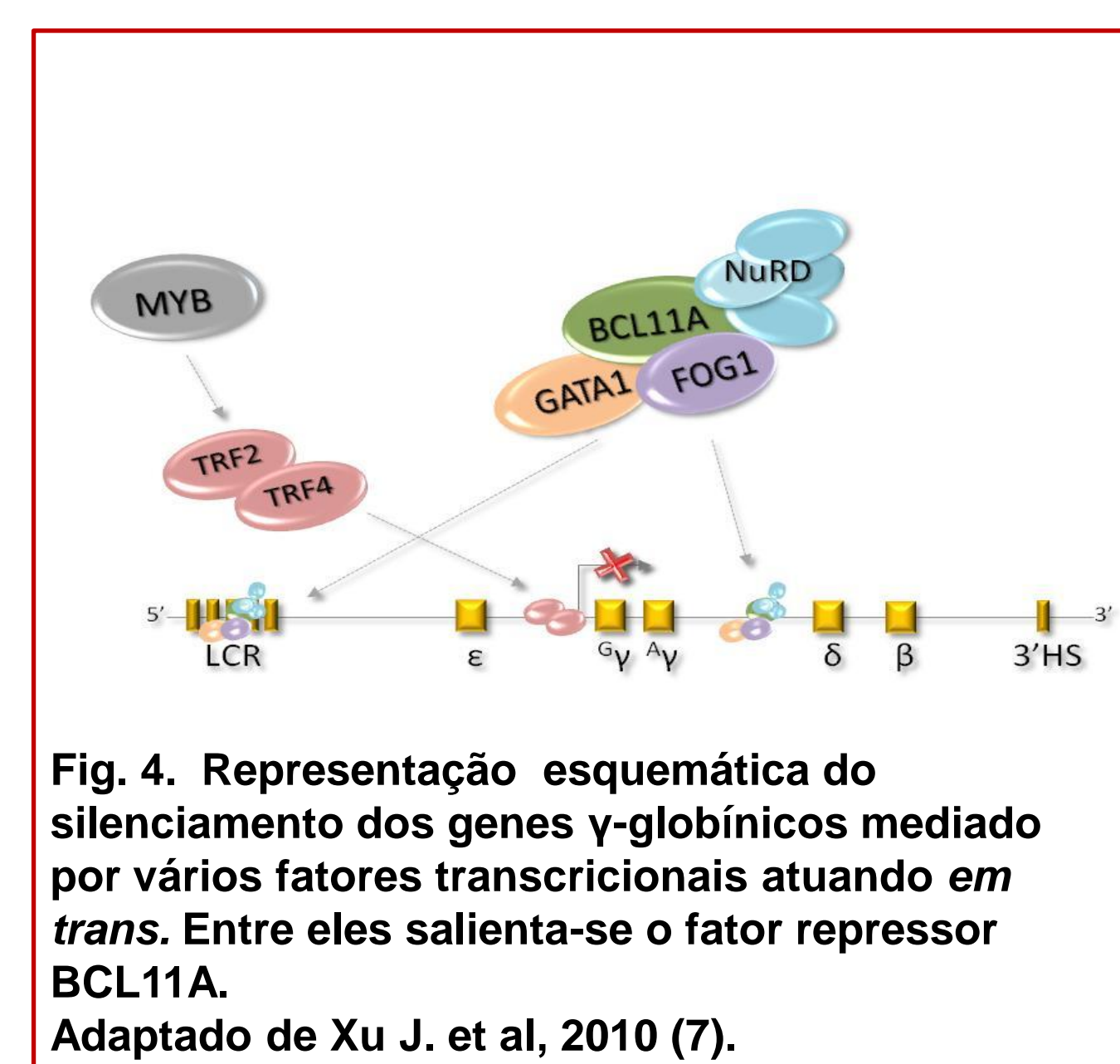


Fig. 4. Representação esquemática do silenciamento dos genes γ-globínicos mediado por vários fatores transcrpcionais atuando em *trans*. Entre eles salienta-se o fator repressor BCL11A. Adaptado de Xu J. et al, 2010 (7).

Agradecimentos

Estudo parcialmente financiado pela FCT: Programa de Financiamento Plurianual do CIGMH e Pest –OE/SAU/UI0009/2012. Os autores agradecem a Bruno Silva e a José Albuquerque pela participação na análise do gene *KLF1*.

Bibliografia

- Steinberg MH, 2008, The Scientific World Journal, 8:1295
- Ballas SK, Lief S, 2010, Am J Hematol, 85:6
- Driss A, et al., 2009, Genomics Insights 2:23
- Akinsheye I, et al., 2011, 118:19
- Lette G, et al., 2008, PNAS, 105:1869
- Barbosa CG, et al., 2010, Braz J Med Biol Res, 43:705
- Xu J, et al, 2010, Genes & Develop, 24:783