

Variantes na região não codificante do gene *TLR2* associadas à infeção bacteriana grave na anemia falciforme pediátrica

Variants in non-coding regions of the TLR2 gene associated with severe bacterial infection in pediatric sickle cell anemia

Susana David^{1,2}, Pedro Aguiar³, Liliana Antunes⁴, Alexandra Dias⁵, Anabela Morais⁶, Anavaj Sakuntabhai^{7,8}, João Lavinha^{1,9}

suzana.david@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Centro de Estudos de Ciência Animal. Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(3) Centro de Investigação em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

(4) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(5) Departamento de Pediatria, Hospital Prof Doutor Fernando Fonseca, Amadora, Portugal

(6) Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal

(7) Unité de la Génétique Fonctionnelle des Maladies Infectieuses, Institut Pasteur, Paris, France

(8) Centre National de la Recherche Scientifique, URA3012 Paris, France

(9) Biosystems and Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A anemia falciforme é caracterizada por hemólise crónica, crises vaso-occlusivas (CVO) e infeções recorrentes frequentemente graves. Uma coorte de 95 doentes pediátricos com anemia falciforme foi estudada quanto à associação genótipo-fenótipo para o subfenótipo “infeção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente” e três regiões polimórficas não codificantes do gene *TLR2*, a saber, a indel -196 a -174, o SNP rs4696480 e uma repetição em tandem (GT)_n. A ausência do haplótipo [Del]-T-[n≥17] (Hap7) em homozigotia parece proteger contra a infeção bacteriana grave, numa associação estatisticamente significativa, resistindo à correção para testes múltiplos. Além disso, uma redução na taxa de incidência da infeção bacteriana grave foi associada a um aumento do componente hemolítico, aos níveis de hemoglobina fetal (antes do tratamento pela hidroxiureia) e à prevalência da alfa-talassemia de 3,7 kb. Estes resultados poderão vir a ter implicações práticas nas estratégias de cuidados de saúde para reduzir a morbilidade e mortalidade dos doentes com anemia falciforme.

_Abstract

Sickle cell anemia (SCA) is characterized by chronic hemolysis, severe vasoocclusive crises (VOC) and recurrent often-severe infections. A cohort of 95 SCA pediatric patients was the background for genotype-to-phenotype association of the patient's infectious disease phenotype “severe bacterial infection at least once during the patient's follow-up” and three noncoding polymorphic regions of the *TLR2* gene, the -196 to -174 indel, SNP rs4696480 and a (GT)_n short tandem repeat. The absence of the haplotype [Del]-T-[n≥17] (Hap7) in homozygosity protected against severe bacterial infection, in a statistically significant association, resisting correction for multiple testing. Moreover, a reduction in the incidence rate of severe bacterial infection was associated to a rise in the hemolytic score, fetal hemoglobin levels (prior to hydroxyurea treatment) and 3.7-kb alpha-thalassemia. These results could have practical implications in health care strategies to lower the morbidity and mortality of SCA patients.

_Introdução

Como primeira linha de defesa do hospedeiro, o sistema imune inato discrimina entre um grande número de patógenos através dos recetores de reconhecimento de padrões (*pattern-recognition receptors*, PRRs). Os recetores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) são uma família pluripotente de PRRs que reconhecem um amplo espectro de agentes infecciosos. Entre estes, o TLR2 tem sido associado à resposta imune inata contra bactérias, fungos, parasitas e vírus.

A anemia falciforme (AF) é uma anemia crónica monogénica autossómica recessiva, potencialmente fatal, clinicamente heterogénea (1). A doença é caracterizada por episódios recorrentes de vaso-oclusão, hemólise crónica e infeções recorrentes frequentemente graves. O desenvolvimento e a validação de preditores precoces da gravidade da doença é uma estratégia orientada para reduzir a morbilidade e mortalidade nos doentes afetados.

_Objetivo

Neste contexto, o nosso objetivo foi investigar a associação genética da predisposição à infeção bacteriana grave e três *loci* nas regiões não-codificantes do gene *TLR2*, ou seja, a indel -196-174 de 22 pb no primeiro exão não traduzido, o SNP rs4696480, c-16934A> T (g.153685974T> A), no promotor, e o polimorfismo (GT)_n STR no segundo íntron numa coorte de 95 doentes pediátricos com AF.



_Métodos

População de estudo

Noventa e cinco doentes com AF, sem relação familiar conhecida, foram recrutados com base no critério de terem mais de três e menos de 20 anos de idade, inscritos num estudo longitudinal anterior (2). Os procedimentos do estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para a Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Genotipagem

O detalhe das metodologias de genotipagem encontram-se no artigo original. Muito sumariamente, a genotipagem do marcador: *TLR2* indel -196 a -174 foi realizada por PCR e os produtos visualizados em gel de agarose: uma única banda distinta entre os casos da Insertion/Insertion (Ins/Ins) e deleção/deleção (del/del) e duas bandas (Ins/del) nos heterozigotos; SNP rs4696480 foi realizada por análise de restrição (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP); STR, foi realizada por PCR utilizando o *primer* direto marcado com um fluorocromo e o número de repetições (GT)*n* identificado pelo dimensionamento dos produtos de PCR com o sequenciador ABI 310 e o *software* Genescan Analysis 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O equilíbrio de *Hardy Weinberg* foi verificado utilizando o teste qui-quadrado genotípico (1 grau de liberdade). A reconstrução dos haplótipos a partir dos dados de genotipagem foi realizada com o programa PHASE, versão 2.1 (3).

Derivação de um componente hemolítico

Um componente hemolítico foi derivado por análise de componentes principais (ACP) com 3 graus de liberdade: contagem de reticulócitos (%), concentrações séricas de lactato desidrogenase (U/L) e bilirrubina total (mg/dL). Para a ACP apenas foram utilizados valores de estado estacionário (e não de crise vaso-oclusiva).

Estudos de associação genótipo-fenótipo

Um modelo de regressão quasi-Poisson (4) multivariado foi aplicado nos estudos de associação entre os diferentes *loci* polimórficos do *TLR2* e o subfenótipo “infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acom-

panhamento do doente”: fenótipo ~ genótipo + nível de hemoglobina no estado estacionário + contagem de leucócitos no estado estacionário + hemoglobina fetal (antes do tratamento com hidroxiureia) + componente hemolítico + alfa-talassemia. As estimativas de risco foram obtidas utilizando o rácio da taxa de incidência (*incidence rate ratio*). As associações genótipo-fenótipo foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. A correção de Bonferroni foi realizada para comparações múltiplas.

_Resultados

População de estudo

Estudos de associação genética foram realizados para 95 doentes com AF (na sua maioria de origem subsaariana) e episódios infecciosos. O período total de observação para a coorte (estudo longitudinal) foi de 433,4 pessoas * ano. A média de idades foi de $7,7 \pm 3,7$ anos.


Componente hemolítico

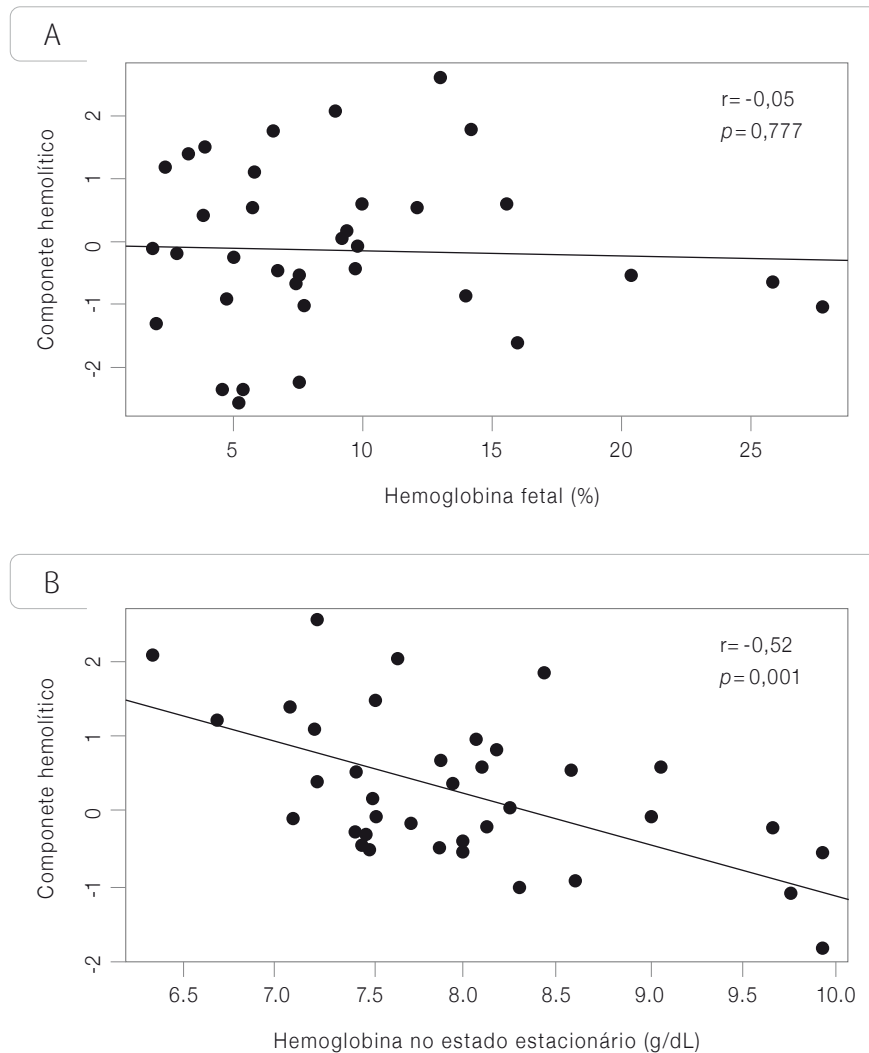
O componente hemolítico teve uma média de 0 (DP=1,23), predizendo 51% da variação entre as três variáveis (valor próprio=1,51) e um valor médio significativamente menor com o genótipo da alfa-talassemia ($p=0,023$), resultados que são comparáveis com de outros autores (5). Não observámos uma correlação positiva com a percentagem de hemoglobina fetal, antes do tratamento com hidroxiureia (gráfico 1a). No entanto, uma correlação negativa estatisticamente significativa com o aumento da percentagem de hemoglobina no estado estacionário foi observada ($p=0,001$) (gráfico 1b).

Estudos de associação genótipo-fenótipo

As estimativas de risco obtidas na análise de haplótipos foram estatisticamente significativas para o subfenótipo “infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente”, e resistiram à correção de Bonferroni para comparações múltiplas (tabela 1). Os resultados mostraram que, em relação ao grupo de referência [Outro que não Hap7], a presença de Hap7 no modelo alélico causou um aumento na taxa de incidência do fenótipo infeccioso ($p=0,00145$). Pelo contrário, em relação



Gráfico 1(A-B):  Correlação entre o componente hemolítico e a (A) hemoglobina fetal, (B) hemoglobina no estado estacionário.



a Hap7/[Outro que não Hap7], a ausência de Hap7 no genótipo homocigótico [Outro que não Hap7]/[Outro que não Hap7] causou uma redução na razão da taxa de incidência ($p=0,00145$). Uma associação estatisticamente significativa independente do genótipo também foi obtida em relação ao componente hemolítico (tabela 2). Um aumento de uma unidade do componente hemolítico causou uma diminuição de 82% na taxa de incidência do subfenótipo ($p=0,000366$). Esse resultado foi influenciado positivamente pelas covariáveis hemoglobina fetal (antes do tratamento com hidroxiureia) e alfa-talassemia de 3,7 kb.



Tabela 1: Modelo de regressão quasi-Poisson¹ para o fenótipo “infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente” em doentes pediátricos com anemia falciforme (n=95) em relação ao haplótipo 7 do TLR2.

	Estimativa	EP	Z	p^2	Razão da taxa de incidência	IC Limite inferior	IC Limite superior	Razão da taxa de incidência redução/aumento (%)
Modelo alélico								
Hap7	2,52	0,75	3,37	0,00145 **	12.36699701	2.866318564	53.3585544	1137
Modelo genotípico								
[Outro que não Hap7]/[Outro que não Hap7]	-2,52	0,75	-3,37	0,00145 **	0.08086037	0.01874114	0.3488796	-92

¹ Modelo estatístico: modelo linear generalizado, *fenótipo ~ genótipo + nível de hemoglobina no estado estacionário + contagem de leucócitos no estado estacionário + hemoglobina fetal (antes de tratamento por hidroxiureia) + componente hemolítico + alfa-talassemia*. O Fenótipo=“infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente”. O grupo de referência para o modelo alélico foi a ausência do Hap7 ([Outro que não Hap7]). O grupo de referência para o modelo genotípico foi Hap7/Hap7.

² O alfa ajustado de Bonferroni $\alpha=0,001471$, onde o número de testes realizados por modelo de hereditariedade por *locus* n=34. As interações entre fatores foram testadas, mas por não serem estatisticamente significativas, não foram incluídas no modelo final. A análise estatística foi realizada em R (Team, R.C., 2013). Códigos de significância: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' EP: Erro Padrão; IC: intervalo de confiança

Tabela 2: Modelo de regressão quasi-Poisson¹ para o fenótipo infeccioso “infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente” em doentes pediátricos com anemia falciforme (n=95) em relação ao componente hemolítico.

	Estimativa	EP	Z	p^2	Razão da taxa de incidência	IC Limite inferior	IC Limite superior	Razão da taxa de incidência redução/aumento (%)
Componente hemolítico ²	-1,7206	0,4285	-4,015	0,000366 ***	0.17896141	0.077266233	4.145043e-01	-82
Hemoglobina fetal ³	-0,7612	0,2457	-3,098	0,004205 **	0.46708616	0.288567509	7.560431e-01	-53
Alelos alfa-talassemia 3,7 kb	-2,6593	1,1501	-2,312	0,027811 *	0.07000001	0.007347522	6.668916e-01	-93

¹ Modelo estatístico: Regressão quasi-Poisson num modelo linear generalizado, *fenótipo ~ genótipo + nível de hemoglobina no estado estacionário + contagem de leucócitos no estado estacionário + hemoglobina fetal (antes de tratamento por hidroxiureia) + componente hemolítico + alfa-talassemia*. O fenótipo=“infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente”. Para o componente hemolítico, não houve grupo de referência. Para a hemoglobina fetal não houve grupo de referência. O grupo de referência para a alfa-talassemia de 3,7 kb foi a ausência de alfa-talassemia de 3,7 kb.

² Componente hemolítico por unidade de pontuação.

³ Hemoglobina fetal (%).

As interações entre fatores foram testadas, mas por não serem estatisticamente significativas, não foram incluídas no modelo final.

A análise estatística foi realizada em R (Team, R.C., 2013). Códigos de significância: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' EP: Erro Padrão; IC: intervalo de confiança



_Conclusão

O curso clínico da AF é uma alternância de períodos entre crises quase assintomáticas (estado estacionário) (IC) com crises vaso-oclusivas (CVOs) dolorosas. As CVOs resultam da solubilidade reduzida da HbS desoxigenada, a sua subsequente polimerização e a formação de glóbulos vermelhos deformados (falciformes), que conduzem a alterações fisiopatológicas potencialmente fatais (6). Estas modificações contribuem para uma predisposição às infeções, que constituem a principal causa de morbilidade e mortalidade nesses doentes. Os doentes pediátricos na nossa coorte estavam sob supervisão médica rigorosa e sujeitos a medidas preventivas ou curativas abrangentes. No entanto, foram relatados episódios infecciosos graves e recorrentes.

Este estudo de associação genótipo-fenótipo revelou aspetos importantes em relação à fisiopatologia da infeção na AF pediátrica. O efeito deletério do haplótipo Hap7 ([Del] -T- [M ou L]) na taxa de incidência de infeções bacterianas graves em doentes com AF pediátrica, foi evidenciado. Este haplótipo apresenta a deleção -196 a -174 de 22 bp, localizada no primeiro exão não traduzido e o alelo T do SNP rs4696480, no promotor do *TLR2*, que foram previamente associados à suscetibilidade a infeções de diversas etiologias. Outro aspeto interessante foi a análise de um componente hemolítico. A hemólise é uma das principais características fisiopatológicas da AF. Os nossos resultados mostram a sua relevância em relação à predisposição às infeções bacterianas.

A exploração destes resultados deverá continuar, com estudos de replicação noutras coortes de modo a obter conclusões mais consistentes; estudos prospetivos para comprovar a utilidade clínica da informação sobre o *TLR2* e análises detalhadas de *loci* do *TLR2* para identificar os marcadores mais propícios a serem utilizados na prática clínica futura.

À medida que aprofundamos e compreendemos melhor a base genética e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, intervenções direcionadas e personalizadas podem vir a reduzir a morbilidade e mortalidade atribuíveis à infeção em doentes com AF, particularmente vulneráveis.

Financiamento:

Este estudo foi realizado com o apoio da FCT/MEC através de fundos nacionais e cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do Acordo de parceria PT2020 (UIDMULTI/00211/2013). Foi ainda parcialmente financiado por subvenções da FCT (PIC/IC/83084/2007) e do Centro de Investigação em Genética Molecular Humana.

Agradecimentos:

Aos doentes e suas famílias, pela participação no estudo; a Dominique Labie, por ter sugerido este tema de pesquisa; à Unidade de Tecnologia e Inovação e Andreia Coelho e Emanuel Ferreira, pelo apoio técnico; a Eric David Bosne, pelos esclarecimentos sobre ACP; a Audrey V. Grant, Baltazar Nunes, Paula Faustino e Vera C.M. David, pelas suas sugestões úteis na elaboração do estudo.

Este artigo constitui, no essencial, uma tradução abreviada da publicação: David S, Aguiar P, Antunes L, Dias A, Morais A, Sakuntabhai A, Lavinha J. *Variants in the non-coding region of the TLR2 gene associated with infectious subphenotypes in pediatric sickle cell anemia. Immunogenetics.* 2018 Jan;70(1):37-51. Epub 2017 Jun 30. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1013-7>

Referências bibliográficas:

- (1) Driss A, Asare KO, Hibbert JM, et al. Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. *Genomics Insights.* 2009;2009(2):23-48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2855197/>
- (2) Coelho A, Dias A, Morais A, et al. Genetic variation in CD36, HBA, NOS3 and VCAM1 is associated with chronic haemolysis level in sickle cell anaemia: a longitudinal study. *Eur J Haematol.* 2014;92(3):237-43. <https://doi.org/10.1111/ejh.12226>
- (3) Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001;68(4):978-89. <https://doi.org/10.1086/319501>
- (4) Ver Hoef JM, Boveng PL. Quasi-Poisson vs. negative binomial regression: how should we model overdispersed count data?. *Ecology.* 2007;88(11):2766-72. <https://doi.org/10.1890/07-0043.1>
- (5) Nouraie M, Lee JS, Zhang Y, et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica.* 2013;98(3):464-72. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.068965>
- (6) Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood Rev.* 1996;10(1):29-44. [https://doi.org/10.1016/s0268-960x\(96\)90018-1](https://doi.org/10.1016/s0268-960x(96)90018-1)