

Instituto Português de Oncologia  
 Instituto Português de Saúde Doutor Ricardo Jorge  
 Seminário Departamento Genética Humana - UIDB/FP  
 2022

## Modulação genética da gravidade da anemia hemolítica e de eventos clínicos adversos em crianças Angolanas com Anemia das Células Falciformes

Inês Carmo<sup>1</sup>, Espirito Santo<sup>2,3</sup>, Mariana Delgado<sup>4</sup>, Catarina Ginet<sup>5</sup>, Arménio Miranda<sup>1</sup>, Pedro Lopes<sup>1</sup>, Ana Paula Arez<sup>6</sup>, Miguel Brito<sup>7,8</sup>, Paulo Amorim<sup>1,9,10</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), Lisboa, Portugal; <sup>2</sup> Hospital Politécnico David Brenhanho (HDPB), Luanda, Angola; <sup>3</sup> Centro de Investigação em Saúde da Angola (CISA), Casimiro, Angola; <sup>4</sup> Health and Technology Research Centre (HTRC), Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal; <sup>5</sup> School Health and Tropical Medicine (SHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisboa, Portugal; <sup>6</sup> Instituto de Saúde Ambiental (ISAMB), Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal; <sup>7</sup> Laboratório Genético (TERGA), Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### 1. Introdução

#### Hemoglobina (Hb)

- Elemento fundamental do sistema circulatório, presente nos eritrócitos e que transporta O<sub>2</sub> dos pulmões para os tecidos
- Proteína tetramérica composta por dois pares de cadeias de globina (α, ζ, β, γ, δ, ε) cada uma ligada a um grupo heme

A síntese da hemoglobina é controlada pelos agrupamentos génicos situados no cromossoma 11 e no cromossoma 16

A expressão dos vários genes globínicos altera-se ao longo da vida humana

### 1. Introdução

#### Hemoglobinopatias

- O termo hemoglobinopatias engloba todas as doenças genéticas que afetam a hemoglobina
- São causadas por mutações, deleções e/ou inserções nos genes do α ou β-globina ou nas suas regiões regulatórias

```

    Hemoglobinopatias
    /
    Talassemias
    /
    - estrutura normal, mas com menor quantidade de cadeias globínicas
    /
    - α-talasémia
    /
    - β-talasémia
    \
    Variantes Estruturais da Hemoglobina
    \
    - síntese de cadeias globínicas com estruturas anormais
    \
    - HbS, HbC ou HbE
    
```

### 1. Introdução

#### Talassémias

##### α-talasémia

- A α-talasémia é caracterizada por anemia hipocrômica e microcítica

Condição	Manifestações clínicas
Portador silencioso (αα)	Clínica normal e hemograma normal
Tríplice deleção (α-α)	Anemia hipocrômica e microcítica ligeira
Dupla deleção (αα)	Anemia hipocrômica e microcítica moderada e grave, anemia hemoglobinopática
Síndrome de Hemoglobina H (HbH)	Anemia grave, anemia generalizada, icterícia, hepatomegalia, splenomegalia, produção muito de urina

As deleções mais comuns são a -α<sup>1</sup>2b e -α<sup>1</sup>2b

### 1. Introdução

#### Variantes Estruturais da Hemoglobina

##### Anemia das Células Falciformes (Sickle Cell Anemia, SCA)

- Doença autossómica recessiva, causada pela alteração em homocigotia c.20A>T no gene HBB
- Resulta na formação de hemoglobina de tipo S nos eritrócitos

HbS → HbS polimerizada → Eritrócito desgenado → Eritrócito falciforme desidratado

- A polimerização da HbS leva à apoptose prematura dos eritrócitos e a uma anemia hemolítica crónica

### 1. Introdução

#### Anemia das Células Falciformes

- Medula óssea acelera a eritropoiese → Liberação de elevadas quantidades de reticulócitos
- Libertação de hemoglobina, arginase e LDH na circulação → Desequilíbrio na biodisponibilidade de NO → moléculas de adesão celular (VCAM1 e ICAM1) ↑ vaso constricção, vasculopatia e disfunção endotelial
- Deformação dos eritrócitos leva a perda das suas capacidades reológicas → Ocorrência de obstruções → Crises de dor vaso-oclusivas

## 1. Introdução

### Anemia das Células Falciformes

Fenótipo e Manifestações clínicas

- Dactilite
- Síndrome torácica aguda
- Hipoesplenismo
- AVC
- Ulcerações nas pernas
- Priapismo

Hemoglobina  
reticulócitos, LDH, bilirrubina  
anemia hemolítica, normocítica normocrômica

Tratamento

- Transfusões sanguíneas
- Hidroxiureia, Voxelator, Endari, Crizanlizumab
- Transplante de células-tronco hematopoiéticas (CTHD)
- Terapia gênica

## 1. Introdução

### Anemia das Células Falciformes

#### Distribuição Geográfica

- O alelo HbS é mais frequente no continente africano, Médio Oriente e Índia e em países da orla do Mediterrâneo
- Angola é um dos países com maior frequência chegando aos 18,18%
- Bengo → 14,76%
- Luanda → 12,03%

Grave problema de saúde pública

- O alelo HbS confere uma vantagem seletiva em relação a infecção por *Plasmodium falciparum*

## 1. Introdução

### Anemia das Células Falciformes

A patologia apresenta um fenótipo muito heterogêneo devido a agentes modificadores ambientais e genéticos

Modificadores Genéticos

- Hemoglobina Fetal (HbF)
- Alfa-Talasémia

Diminuem a concentração de HbS reduzindo a sua polimerização

Possíveis Modificadores Genéticos

- Cluster of Differentiation - 36: Gene CD36
- Vascular cell adhesion molecule-1: Gene VCAM1
- Endothelial Nitric Oxide Synthase: Gene NOS3

adesão de células sanguíneas ao endotélio vascular  
tônus vascular e manutenção da homeostase vascular

## 1. Introdução

### Objectivos

1. Caracterizar genotipicamente os genes candidatos a modificadores dos fenótipos da SCA (HbA, CD36, VCAM1 e NOS3) numa população pediátrica, residente em Angola
2. Avaliar a possível associação das variantes genéticas analisadas com os fenótipos clínicos, hematológicos e bioquímicos dos doentes
3. Investigar o papel de modulação das variantes genéticas analisadas com a gravidade específica do fenótipo hemolítico
4. Contribuir para desvendar o papel de variantes em genes envolvidos em mecanismos tais como a adesão de células sanguíneas ao endotélio vascular e na regulação do tônus vascular na gravidade da SCA

## 2. Materiais e Métodos

200 crianças angolanas, residentes em Luanda ou Caxito, entre os 3 e os 12 anos

- diagnóstico laboratorial de SCA
- tratamento com hidroxiureia
- caracterização hematológica, bioquímica e clínica

Foram estudadas 13 regiões polimórficas em 4 genes considerados possíveis moduladores da gravidade da SCA (HbA, CD36, NOS3 e VCAM1)

Gene	Variante (Sequência)	Método
HbA	α-talassemia 400 (378)	Clon-PCR
CD36	c1084122 a c1084361	PCR + Sequenciagem de Sanger
	c1111838	PCR-RFLP
NOS3	c2202744 a c2209083	PCR-RFLP
	c3281774	PCR
VCAM1	c1809416 a c1812014	PCR + Sequenciagem de Sanger
	c1971015 a c1981358	PCR + Sequenciagem de Sanger
	c1941363 a c1951299	PCR + Sequenciagem de Sanger

PCR, RFLP, Gap-PCR e Sequenciagem de Sanger

Determinação dos haplótipos → PHASE v2.1.  
Estudos de associação → IBM SPSS Statistics

## 3. Resultados e Discussão

### Hemoglobinizacão dos eritrócitos – Gene HBA

- Elevada prevalência (67,5%) de α-talassemia (deleção de 3,7 kb em HbA)
- Benefício notório na co-herança da α-talassemia no estado de saúde dos doentes

Retarda o início da doença de 6 meses de idade para 11 meses  
 $p = 0,053$

Diminui o nº de eventos clínicos adversos, tais como AVCs, osteomielite, esplenomegalia, hepatomegalia

### 3. Resultados e Discussão

#### Hemoglobinização dos eritrócitos - Gene HBA

- Diminuiu o grau de anemia
- Diminuiu o grau de hemólise
- Consequentemente reduziu o número de transfusões necessárias

	aa/aa	aa/-a3.7	-a3.7/-a3.7	P*		
	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP
Hemoglobina (g/dl)	65	7,24 ± 0,98	7,28 ± 0,86	26	7,94 ± 1,41	0,005
Eritrócitos (10 <sup>12</sup> /L)	65	2,65 ± 0,47	2,91 ± 0,45	26	3,02 ± 0,65	<0,001
Reticulócitos (%)	65	11,56 ± 4,25	10,53 ± 4,56	25	6,15 ± 3,42	<0,001
LDH (U/L)	58	476,94 ± 167,72	411,63 ± 113,16	23	381,75 ± 105,30	0,017
Nº Transfusões (ano)	65	0,45 ± 0,62	0,45 ± 0,61	25	0,18 ± 0,17	0,031

- A  $\alpha$ -talassemia provocar a diminuição da HbS atenuando assim a sua polimerização e consequentes efeitos nefastos
- A deleção -a3,7kb constitui um fator na melhoria das manifestações hematológicas e clínicas da SCA

### 3. Resultados e Discussão

#### Adesão de células vasculares - Gene CD36

- Dois SNP localizados na 5'UTR do gene CD36 mostraram ter influência no nível da hemoglobina
- A variante G do rs1984112 e a variante C do rs1413661 foram associadas a níveis mais baixos de hemoglobina

	Polimorfismo	N	Média ± DP	P*	
Hemoglobina (g/dl)	rs1984112	AA	109	7,47 ± 0,95	0,031*
		AG+GG	89	7,18 ± 0,97	
		GG	22	7,79 ± 1,28	
Nº Transfusões (ano)	rs1413661	GC+CC	176	7,28 ± 0,91	0,022*
		GG	22	0,25 ± 0,33	
		CC	91	0,28 ± 0,39	
Nº Hospitalizações (ano)	rs1413661	GC	85	0,50 ± 0,63	0,008**
		CC	91	0,32 ± 0,37	
		CC	85	0,58 ± 0,57	
Nº Hospitalizações (ano)	rs1413661	GC	85	0,58 ± 0,57	0,021**
		CC	91	0,41 ± 0,42	
		CC	91	0,41 ± 0,42	

Fatores de risco para a gravidade da anemia

### 3. Resultados e Discussão

#### Adesão de células vasculares - Gene CD36

- Os genótipos contendo o alelo C do rs1413661 foram associados a um maior número de transfusões sanguíneas e hospitalizações
- Fatores de risco para eventos clínicos adversos
- A presente população tem uma frequência do alelo C de 0,670 que é significativamente menor ( $p < 0,001$ ) que a da população Yoruba (0,870)
- pressão seletiva negativa sobre o alelo C

	Polimorfismo	N	Média ± DP	P*	
Hemoglobina (g/dl)	rs1984112	AA	109	7,47 ± 0,95	0,031*
		AG+GG	89	7,18 ± 0,97	
		GG	22	7,79 ± 1,28	
Nº Transfusões (ano)	rs1413661	GC+CC	176	7,28 ± 0,91	0,022*
		GG	22	0,25 ± 0,33	
		CC	91	0,28 ± 0,39	
Nº Hospitalizações (ano)	rs1413661	GC	85	0,50 ± 0,63	0,008**
		CC	91	0,32 ± 0,37	
		CC	85	0,58 ± 0,57	
Nº Hospitalizações (ano)	rs1413661	GC	85	0,58 ± 0,57	0,021**
		CC	91	0,41 ± 0,42	
		CC	91	0,41 ± 0,42	

### 3. Resultados e Discussão

#### Adesão de células vasculares - Gene VCAMI

- O alelo C do rs1041163, localizado no promotor do gene, demonstrou estar associado a níveis mais baixos de LDH.
- Hemólise mais leveira
- Potencial efeito protetor no fenótipo hemolítico
- Menor expressão/atividade da molécula de adesão VCAM1 a superfície endotelial → Menor adesão das células sanguíneas → Menor taxa de hemólise

	Polimorfismo	N	Média ± DP	P*	
LDH (U/L)	rs1041163	TT	96	456,58 ± 168,30	0,024
		TC+CC	84	401,03 ± 136,05	
		TC+CC	84	401,03 ± 136,05	

### 3. Resultados e Discussão

#### Adesão de células vasculares - Gene VCAMI

- Esta variante tem uma frequência significativamente mais elevada nesta população do que na população africana geral, ( $p < 0,011$ ).
- Discrepância ainda mais evidente ( $p < 0,001$ ) quando comparadas as frequências da população em estudo com as frequências da população Yoruba
- Enriquecimento da população africana SCA com o alelo protetor C

	Frequências Genéticas		
	População em estudo	População Africana	População Yoruba
TT	0,553	0,670	0,630
TC	0,387	0,292	0,352
CC	0,060	0,038	0,018

### 3. Resultados e Discussão

#### Tônus Vascular - Gene NOS3

- Os genótipos contendo o alelo C do rs2070744, localizado na região promotora do gene, foram associados a níveis mais elevados de LDH - sugerindo uma hemólise mais grave
- Fator de risco hemolítico
- Fator de risco na gravidade clínica da doença
- Menor número de hospitalizações por ano
- A variante C é mais comum em caucasianos (42,0%) do que em afro-americanos (17,5%) ou asiáticos (13,8%) → baixa frequência (14%) na população africana geral e ainda mais baixa na população em estudo (9,8%) → pressão seletiva negativa do alelo C

	Polimorfismo	N	Média ± DP	P*	
LDH (U/L)	rs2070744	TT	145	418,94 ± 150,60	0,047
		TC+CC	85	477,79 ± 168,64	
		TC+CC	85	477,79 ± 168,64	
Nº hospitalizações (ano)	rs2070744	TT	145	0,48 ± 0,48	0,050
		TC+CC	85	0,65 ± 0,63	
		TC+CC	85	0,65 ± 0,63	

### 3. Resultados e Discussão

#### Haplótipos NOS3

Haplótipo II (T, 4b, G)

↓LDH e ↓ Internamentos por ano

	Restantes Haplótipos		Haplótipo II (T4bG)		p <sup>2</sup>
	N	Média ± DP	N	Média ± DP	
LDH (U/L)	60	467,74 ± 164,98	121	412,25 ± 148,21	0,034
NI Internamentos (ano)	70	0,56 ± 0,55	130	0,42 ± 0,46	0,025

Fator protetor da hemólise

	rs2070744	VWTR rs10814	rs1399883
Haplótipo II	T	4b	G
Haplótipo V	C	4b	G

Haplótipo V (C, 4b, G)

↓LDH e ↑ Internamentos por ano

	Restantes Haplótipos		Haplótipo V (C4bG)		p <sup>2</sup>
	N	Média ± DP	N	Média ± DP	
LDH (U/L)	152	421,46 ± 154,05	29	478,80 ± 158,31	0,046
NI Internamentos (ano)	169	0,45 ± 0,50	31	0,60 ± 0,43	0,02

Fator de risco hemolítico

Na presente população, a modulação da gravidade da SCA parece resultar apenas do efeito do rs2070744, que se sobrepõe a qualquer possível efeito dos restantes alelos

### 4. Conclusão

Este estudo:

- Contribuiu para **aumentar o conhecimento da modulação genética da gravidade da SCA pediátrica**, numa região onde a patologia é um grave problema de saúde pública e coexiste com condições ambientais nefastas de elevada taxa de agentes infecciosos, subnutrição e fraca assistência médica
- Confirmou o **papel positivo da co-herança da atalassemia**, tanto na anemia como nas manifestações clínicas da doença em idade pediátrica
- Validou a **importância do gene NOS3**, envolvido no metabolismo do NO e tonus vascular, no **risco hemolítico** e na **gravidade clínica da doença**
- Reforçou a **importância da adesão das células sanguíneas ao endotélio vascular** na variabilidade da **anemia hemolítica**. Neste contexto foi evidenciada a importância dos genes VCAM1 e CD36

Propomos, pela primeira vez, o SNP rs1413661 no gene CD36 como modulador genético da SCA em África

### 5. Perspetivas Futuras

- São necessários mais estudos para que estas variantes genéticas sejam classificadas como biomarcadores inespecíficos da gravidade da SCA
- As associações aqui encontradas podem ser analisadas de forma mais aprofundada, através do estudo funcional das variantes genéticas
- Estudar estas variantes pode permitir, no futuro, prever alguns subtipos de SCA, fazer um prognóstico mais preciso e possibilitar um tratamento individualizado, contribuindo para uma melhor qualidade de vida dos doentes.
- Será ainda importante explorar a possível modulação das variantes genéticas analisadas na interação da SCA com a infeção malaríca

### Agradecimentos

- Equipa do projeto:

Paula Faustino  
 Pedro Lopes  
 Armandina Miranda

Brigida Santos

Miguel Brito  
 Mariana Dolgudino  
 Catarina Gineite

Ana Paula Amorim

- Participantes e seus familiares
- Unidade de Tecnologia e Inovação, DGH, INSA
- Prof. Francisco Pina Martins, FCUL
- Entidade Financiadora