



Varição genética associada ao nível de hemólise crónica na drepanocitose: um estudo longitudinal

Andreia Coelho¹, Alexandra Dias², Anabela Morais³, Baltazar Nunes⁴, Emanuel Ferreira¹, Isabel Picanço¹, Paula Faustino¹, João Lavinha¹

joao.lavinha@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, INSA.

(2) Departamento de Pediatria, Hospital Prof Doutor Fernando Fonseca.

(3) Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria.

(4) Departamento de Epidemiologia, INSA.

Introdução

A compreensão da causa e mecanismo das doenças complexas (multifatoriais) frequentes pode beneficiar largamente do estudo de doenças mendelianas (monogénicas) raras devido à sua relativamente mais simples etiopatogénese. A drepanocitose é uma anemia crónica monogénica, autossómica recessiva, clinicamente heterogénea, caracterizada por episódios graves e recorrentes de vaso-oclusão e infeção e por hemólise crónica. A apresentação, o curso e o desfecho da doença dependem de determinantes ambientais, comportamentais e genéticos. A hemólise intra- e extravascular está na origem de algumas das complicações da doença, especialmente devido à consequente alteração na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Entre os chamados sub-fenótipos hemolíticos da drepanocitose incluem-se o AVC, a hipertensão pulmonar, o priapismo, as úlceras de perna e a colelitíase ⁽¹⁾.

Objetivos

Para identificar preditores precoces de vaso-oclusão na drepanocitose, estudámos a associação entre três biomarcadores de hemólise e a herança de variantes genéticas em genes candidatos relacionados com o nível de hemoglobina fetal (HbF), a adesão vascular dos eritrócitos, o tónus vascular e, ainda, um determinante alfa-talassémico numa série de doentes pediátricos seguidos longitudinalmente.

Material e métodos

Participantes: 99 doentes pediátricos com drepanocitose homocigótica (SS) seguidos em dois grandes hospitais gerais da área metropolitana de Lisboa, 97% dos quais de origem sub-

sariana. Idade à entrada no estudo (mediana): 9,9 anos. Tempo de seguimento/doente (mediana): 5,0 anos. Foi obtido consentimento informado dos representantes legais dos participantes.

Caraterização fenotípica: Os dados clínicos, hematológicos e bioquímicos, incluindo os relevantes para este estudo (Hb, LDH, bilirrubina total, reticulócitos), foram colhidos retrospectivamente nos processos clínicos dos doentes.

Genotipagem: Realizada em DNA genómico total isolado de leucócitos do sangue periférico por várias técnicas baseadas na PCR. Foram caraterizadas 41 variantes genéticas (34 SNP, 6 indel, 1 STR), com frequência do alelo minor $\geq 0,05$ na população de doentes, nos *loci* seguintes: *BCL11A*, *CD36*, *EDN1*, *HBA*, agrupamento *HBB* (incluindo *HBG2*), *ITGA4*, *HMOX1*, *NOS3*, *THBS1* e *VCAM1*. Todas as distribuições genotípicas se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir dos genótipos obtidos foram inferidos 105 haplotipos (PHASE). No entanto, apenas os 51 com frequência $> 0,02$ foram considerados na análise estatística.

Colheita e análise de dados: Foi construída uma base de dados demográficos e clínicos. Os estudos de associação entre genótipos nos *loci* candidatos e biomarcadores de hemólise foram realizados através de testes paramétricos (LDH, bilirrubina total) ou não-paramétricos (reticulócitos) com subsequente correção para comparações múltiplas ⁽²⁾. Foram assumidos diferentes modelos de hereditariedade.

Resultados

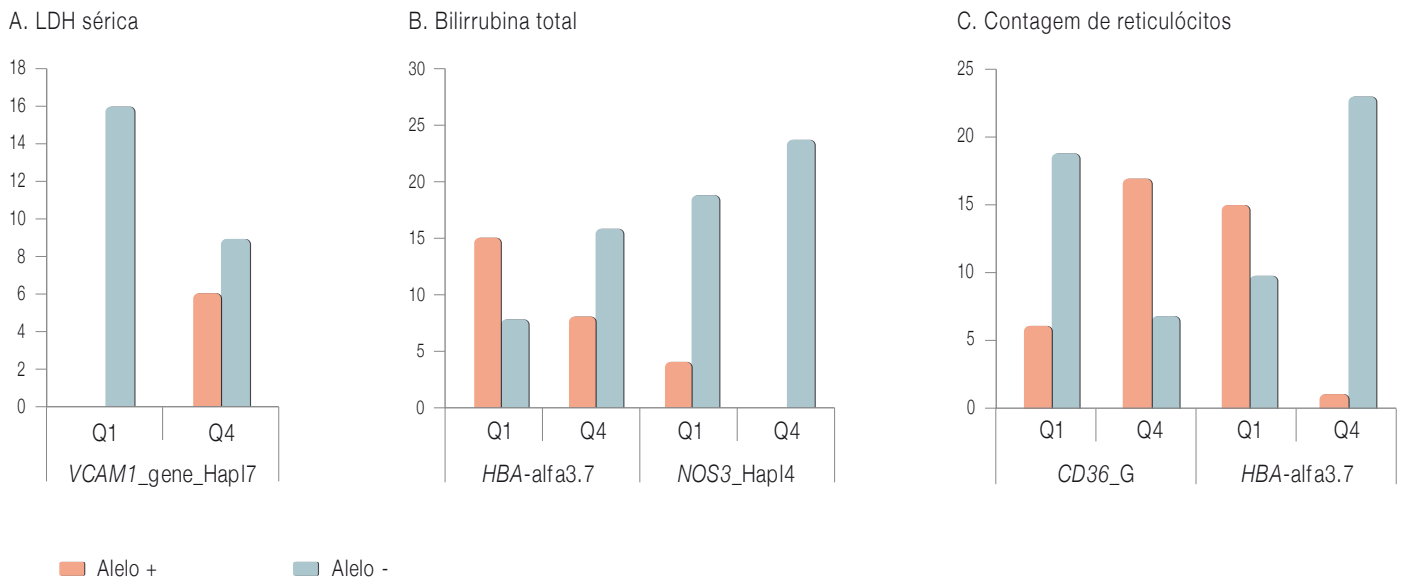
Foram colhidos dados demográficos e clínicos relativos a 557 pessoa*ano, incluindo 738 crises (530 vaso-oclusivas, 466 infecciosas, 143 anémicas). No entanto, neste estudo apenas as observações inter-crise foram consideradas por serem as que mais bem representam uma complicação crónica da doença como é a hemólise. Os resultados obtidos revelaram uma associação entre os marcadores de hemólise e (i) variantes em dois genes relacionados com a adesão dos drepanócitos ao endotélio vascular (*VCAM1*, *CD36*), (ii) uma variante do *NOS3*, o produto do qual gera NO nas células endoteliais implicadas no tónus vascular e (iii) um determinante alfa-talassémico, um notório modificador da gravidade da drepanocitose (**Quadro 1 e Gráfico 1**).

Quadro 1: Associação entre variantes de genes candidatos e marcadores de hemólise na drepanocitose.

Gene	Referência da variante	Alelo ^a	Alelo ou haplótipo associado	Presença do alelo ou haplótipo associado	Número de pacientes	Marcadores de hemólise ^b					
						LDH (U/L) média±DP	p	Bilirrubina total (mg/dL) média±DP	p	Contagem de reticulócitos (%) média±DP	p
VCAM1-gene	rs3783613	G/C	C	sim	12	1270,6±279,3	p=0,002				
	rs3176878	C/T	C								
	rs3783615	A/T	A	não	49	926,6±348,4					
	rs3176879	A/G	A								
VCAM1-promotor	rs1409419	C/T	C	Heterozigotia (Hapl 9/Hapl X) ^c	4			1,65±0,05	p<0,001		
	rs3917024	C/T	T								
	rs3917025	TC/delTC	delTC								
	rs3783597	C/G	G								
	rs3783598	T/G	T	Homozigotia (Hapl 9/Hapl 9; Hapl X/Hapl X)	88			2,50±0,43			
	rs1041163	T/C	C								
	rs3783599	C/T	T								
CD36	rs1984112	A/G	G	sim	45					13,06±0,80	p=0,001
				não	50				9,26±0,56		
NOS3	rs2070744	C/T	T	sim	90			2,41±0,42	p<0,001		
				não	2			5,18±0,01			
HBA	n/a	Não-del/del 3,7kb	del 3,7kb	sim	41			2,04±0,40	p=0,002		
				não	52			2,80±0,40			
				sim	42				8,77±0,48	p<0,001	
				não	53				13,21±0,73		

^a A primeira posição representa o alelo ancestral ^b Os níveis individuais dos pacientes são médias dos valores inter-crise medidos ao longo do período de seguimento ^c Hapl X = Não-hapl 9

Gráfico 1: Número de pacientes com drepanocitose com (+) ou sem (-) uma variante genética em (A) VCAM1, (B) HBA e NOS3, or (C) CD36 e HBA com os níveis de, respetivamente, a LDH sérica, bilirrubina total e contagem de reticulócitos nos dois quartis extremos (Q1, Q4).





_Discussão

A hemólise crónica é um traço distintivo do curso clínico da drepanocitose. Neste estudo demonstrámos uma associação estatisticamente significativa entre parâmetros bioquímicos ou eritrocitários correlacionados com diferentes estadios do fenótipo hemolítico e determinantes genéticos da adesão celular, metabolismo do NO e alfa-talassémia.

Moléculas de adesão (VCAM1, CD36): A adesão dos drepanócitos ao endotélio vascular é um fator crítico na patogénese da drepanocitose.

Considerando um marcador proximal de hemólise (LDH sérica), foi testada a hipótese de que as variantes observadas no *locus VCAM1* (tanto no promotor como no gene) possam ser modificadoras do fenótipo drepanocítico. Foram já identificadas variantes hiperativas do promotor (predisponentes para vaso-oclusão) e, na variante intra-génica G1238C, o alelo C foi associado a proteção contra AVC. Neste estudo, o *VCAM1_gene_haplótipo 7* (que inclui o referido alelo C) foi associado a níveis mais elevados de LDH e, potencialmente, a um fenótipo hemolítico mais grave. Estas observações aparentemente contraditórias poderão resultar de um papel dual da variante G1238C na etiologia molecular do AVC e da hemólise e/ou a modulação do fenótipo pelas outras três variantes que definem o haplótipo. Considerando um outro marcador de hemólise (bilirrubina total), foram observados níveis mais baixos em associação com a heterozigotia para o *VCAM1_promotor_haplótipo 9*. Este achado constituirá mais um exemplo do efeito protetor proporcionado pelo estado de heterozigotia para uma variante genética (vantagem do heterozigoto) (3, 4).

Verifica-se que os reticulócitos e eritrócitos nos doentes drepanocíticos têm uma expressão de CD36 superior aos indivíduos controlo. Por outro lado, sabe-se que a ligação da CD36 à trombospondina-1 promove a adesividade vascular. Neste estudo, o alelo rs1984112_G (localizado na 5'UTR do gene *CD36*) mostrou estar associado a uma elevação da contagem de reticulócitos, uma consequência distal da hemólise. Assim, a herança deste alelo parece ser um fator de risco na drepanocitose, particularmente em relação à hemólise subsequente a um reforço da adesão celular (5).

Metabolismo do NO: Observaram-se baixos níveis de bilirrubina total em associação com o alelo rs2070744_T no promotor do gene *NOS3*, o qual codifica a NO-sintase 3 que catalisa a produção de NO nas células endoteliais. O NO é um gás com potentes propriedades vasodilatadoras e anti-adesivas necessárias à manutenção do lúmen vascular.

Na drepanocitose observa-se um estado de resistência ao NO mediado pela inativação do NO pela Hb plasmática libertada na hemólise. A referida variante do promotor do *NOS3* parece ter um efeito sobre a expressão dos respetivos mRNA e proteína. O alelo C já foi considerado um fator de risco para doença coronária, enquanto o alelo T parece ter um efeito protetor na componente hemolítica da drepanocitose (6).

Alfa-talassémia: A presença da deleção de 3,7kb no gene *HBA* foi encontrada em associação com níveis mais baixos de hemólise (evidenciados pela bilirrubina total e contagem de reticulócitos). A alfa-talassémia, em co-herança com a drepanocitose, foi um dos primeiros modificadores genéticos desta a ser identificados em particular no que respeita ao sub-fenótipo hemolítico. Os doentes que apresentam a deleção de, pelo menos, um gene *HBA* têm uma hemólise reduzida em resultado de uma mais baixa concentração intracelular de HbS, a qual, por seu turno, diminui os danos celulares (falciformação) associados à polimerização da HbS (7).

_Conclusões

No seu conjunto, os nossos achados sugerem uma arquitetura genética complexa para o processo hemolítico na drepanocitose, envolvendo várias vias metabólicas, nomeadamente adesão às células do endotélio vascular, síntese do NO e controlo do volume e hemoglobinação dos eritrócitos (8). No entanto, devido à baixa prevalência das variantes genéticas significativamente associadas ao sub-fenótipo hemolítico, os nossos resultados carecem de replicação numa coorte mais numerosa seguida durante um período mais longo. Neste estudo propusemos várias hipóteses mecanísticas compatíveis com as observadas associações genótipo/fenótipo. São, por isso, necessários estudos funcionais que explorem as perspetivas agora abertas para uma melhor compreensão da variabilidade clínica inter- e intra-individual da drepanocitose (e outras doenças cardio-vasculares comuns) com potencial impacto positivo na personalização das intervenções terapêuticas.

Agradecimentos

Aos pacientes e suas famílias. À Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA pelo apoio técnico. À FCT pelo apoio financeiro (PIC/IC/83084/2007 e CIGMH).



artigos breves_ n. 5

Referências bibliográficas:

- (1) Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2012;87(8):795-803.
- (2) Bouaziz M, Jeanmougin M, Guedj M. Multiple testing in large-scale genetic studies. *Methods Mol Biol.* 2012; 888:213-33.
- (3) Dworkis DA, Klings ES, Solovieff N, et al. Severe sickle cell anemia is associated with increased plasma levels of TNF-R1 and VCAM-1. *Am J Hematol.* 2011;86(2):220-3. [LINK](#)
- (4) Dean M, Carrington M, O'Brien SJ. Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002; 3:263-92.
- (5) Zhang Y, Hildesheim ME, Nouraie M, et al. Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. *Am J Hematol.* 2012;87(3):326-30. [LINK](#)
- (6) Cattaruzza M, Guzik TJ, Stodowski W, et al. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ Res.* 2004; 95(8):841-7. [LINK](#)
- (7) Steinberg MH, Embury SH. Alpha-thalassemia in blacks: Genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood.* 1986; 68(5):985-90. [LINK](#)
- (8) Milton JN, Rooks H, Drasar E, et al.; Walk-PHAASST Investigators, Steinberg MH. Genetic determinants of haemolysis in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2013;161(12):270-8.