

_Moduladores genéticos de vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose

Genetic modulators of cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia

Marisa Silva¹, Sofia Vargas¹, Raquel Maia², Alexandra Dias³, Teresa Ferreira³, Anabela Morais⁴, Isabel Mota Soares⁵, João Lavinha^{1,6}, Rita Silva⁷, Paula Kjölllerström², Paula Faustino^{1,8}

paula.faustino@insa.min-saude.pt

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

(2) Unidade de Hematologia. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(3) Núcleo de Hematologia. Departamento de Pediatria, Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, Amadora, Portugal

(4) Departamento de Pediatria. Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(5) Departamento de Pediatria, Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal

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

(7) Unidade de Neuropediatria. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(8) Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A drepanocitose é uma doença genética causada pela mutação c.20A>T, em homozigotia, no gene da beta-globina, que leva à síntese de uma hemoglobina anómala – hemoglobina S. Para além da anemia hemolítica crónica, as manifestações clínicas são diversas e, em crianças, a mais grave é a vasculopatia cerebral que inclui os acidentes vasculares cerebrais (AVC) e os enfartes cerebrais silenciosos. Apesar de monogénica, variantes noutros genes poderão atuar como modificadores do seu curso e gravidade clínica. Neste trabalho, estudámos 70 doentes pediátricos, de origem subsaariana, com drepanocitose e bem caracterizados em termos de vasculopatia cerebral. Procedemos à genotipagem de variantes nos genes *VCAM1* e *NOS3* envolvidos na ativação do endotélio dos vasos sanguíneos e no tónus vascular. A análise estatística revelou uma associação positiva entre a presença da variante rs1409419_T, bem como do haplotipo 7 de *VCAM1*, e a ocorrência de AVC. Por outro lado, para o gene *NOS3*, observámos uma associação negativa entre o VNTR_alelo 4b e o haplotipo V, e a ocorrência de enfarte cerebral silencioso, bem como entre o haplotipo VII e a ocorrência de vasculopatia cerebral. Os resultados obtidos sublinham a importância de *VCAM1* e *NOS3* como moduladores genéticos, bem como o seu potencial como biomarcadores para a prevenção e prognóstico da vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose.

_Abstract

*Sickle cell anemia is a genetic disease caused by homozygosity for the mutation c.20A>T in the beta-globin gene which leads to the synthesis of an abnormal hemoglobin – hemoglobin S. In addition to chronic hemolytic anemia, the disease includes various clinical manifestations of which cerebral vasculopathy (that comprises overt stroke and silent cerebral infarction) is the most severe in children. Despite being a monogenic disease, its progression and severity may be modified due to the effect of variants in other genes. In this work, we studied 70 sickle cell anemia pediatric patients of sub-Saharan ancestry well characterized in terms of cerebral vasculopathy. We genotyped variants in the *VCAM1**

*and *NOS3* genes, due to the involvement of these genes in blood vessel endothelium activation and vascular tone balance. Statistical analyses showed a positive associative between the presence of the rs1409419_T variant, as well as of the haplotype 7 of *VCAM1*, and stroke. On the other hand, for the *NOS3* gene, we observed a negative association between the presence of the VNTR_4b allele and haplotype V and silent cerebral infarcts. A similar association was observed between haplotype VII and cerebral vasculopathy as a whole. Our results underline the importance of *VCAM1* and *NOS3* genes as genetic modulators, as well as their role as potential biomarkers for cerebral vasculopathy prevention and prognosis in children with sickle cell anemia.*

_Introdução

A drepanocitose, ou anemia das células falciformes, é a forma mais comum e mais grave das síndromes drepanocíticas e resulta da presença, em homozigotia, da mutação c.20A>T, no gene da β-globina (*HBB*). A hemoglobina anómala que daí resulta – hemoglobina S – polimeriza no interior dos glóbulos vermelhos, em situações de desoxigenação, levando-os a adotar uma forma de foice (os drepanócitos), o que dá o nome à doença.

A drepanocitose é considerada, pela Organização Mundial de Saúde, a mais importante hemoglobinopatia, a nível mundial, em termos de frequência e de impacto social (1), sendo que cerca de 50-90% das crianças afetadas nascidas na África subsaariana morrem antes dos 5 anos de idade (2). O facto de os portadores heterozigóticos para a mutação drepanocítica



tica possuírem proteção contra a malária, explica as elevadas frequências desse alelo na África subsaariana, Mediterrâneo, Médio Oriente e subcontinente Indiano. No entanto, os movimentos populacionais, históricos e recentes, têm levado a uma maior distribuição da mutação, tornando a drepanocitose um problema de saúde pública a nível global (1).

As manifestações clínicas da drepanocitose são complexas e envolvem vários mecanismos, tais como: hemólise crónica, inflamação sistémica, vaso-oclusão, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e ativação endotelial. A interação dinâmica entre estes eventos resulta num fenótipo clínico heterogéneo que, em crianças, abrange, entre outros: vasculopatia cerebral, síndrome torácica aguda, hiposplenismo, doença renal e crises dolorosas. A vasculopatia cerebral – causada por uma conjugação de dano endotelial nas artérias cerebrais, vaso-oclusão e isquémia do tecido cerebral – é uma das complicações mais graves e inclui acidentes vasculares cerebrais (AVC; com sinais clínicos aparentes) e enfartes cerebrais silenciosos (apenas diagnosticáveis através de exames imagiológicos), sendo que as crianças com drepanocitose apresentam um risco de AVC muito superior ao da população pediátrica geral (3).

A ecografia com Doppler transcraniano é, atualmente, a principal ferramenta imagiológica usada no rastreio de risco de AVC, sendo a ressonância magnética aplicada ao diagnóstico de AVC e ao aumento da eficácia na deteção de enfartes cerebrais silenciosos. Em termos terapêuticos, a abordagem atualmente preconizada consiste num regime regular de transfusões sanguíneas para crianças com risco alto/moderado de AVC (determinado pela ecografia com Doppler transcraniano) e, concomitantemente, poderá ser administrado o fármaco hidroxiureia (HU). No entanto, nem as estratégias de rastreio ou de diagnóstico, atualmente disponíveis, permitem identificar todas as crianças em risco de AVC e/ou enfarte cerebral silencioso, nem as abordagens terapêuticas são eficazes em todos os doentes e nos casos em que o são, não estão isentas de efeitos secundários adversos e limitações na sua aplicação. Assim, torna-se necessário identificar e desenvolver um painel de biomarcadores, de elevada sensibilidade e especificidade, com valor prognóstico e preditivo para AVC em crianças com drepanocitose.

Apesar da drepanocitose ser uma doença monogénica, causada sempre pela mesma mutação no gene da beta-globina, a progressão e gravidade clínica da doença podem ser afetadas pela presença de variantes noutros genes. Estes modificadores genéticos podem desempenhar um papel importante na ocorrência e gravidade das diversas manifestações clínicas, nomeadamente do AVC em crianças (4).

_Objetivo

O presente trabalho pretendeu avaliar o valor prognóstico, para o risco de vasculopatia cerebral, de variantes nos genes *VCAM1* (que codifica a molécula de adesão celular vascular 1, VCAM-1, envolvida na adesão e proliferação endoteliais) e *NOS3* (que codifica a sintase endotelial do óxido nítrico, eNOS, principal produtora de NO no sistema cardiovascular) envolvidos na resposta endotelial e tónus vascular.

_Materiais e métodos

O presente trabalho consistiu num estudo de caso-controlo, realizado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em colaboração com quatro hospitais da Grande Lisboa – Hospital D. Estefânia, Hospital de Sta. Maria, Hospital Fernando Fonseca e Hospital Garcia de Orta. Foram selecionados 70 doentes pediátricos (≥ 3 anos de idade) com drepanocitose, caracterizados em termos de vasculopatia cerebral, cujos progenitores eram originários da África subsaariana. Os critérios de exclusão compreenderam: idade < 3 anos; origem geográfica parental fora da região da África subsaariana; anterior terapêutica com HU; participação em regime hipertransfusional nos 120 dias anteriores à inclusão no estudo. Todos os representantes legais dos participantes deram o seu consentimento informado e esclarecido para participar neste estudo. Todas as amostras foram anonimizadas antes de serem enviadas ao laboratório.

Os participantes foram agrupados em 4 grupos consoante o tipo de vasculopatia cerebral apresentado: *i)* grupo “AVC” ($n=15$), ocorrência de, pelo menos, um episódio de acidente vascular cerebral isquémico, confirmado clínica e imagiológica; *ii)* grupo “enfarte cerebral silencioso” ($n=9$), ocorrência de, pelo menos, um enfarte cerebral silencioso,



confirmado imagiologicamente; *iii*) grupo “vasculopatia cerebral” (n=24), ocorrência de, pelo menos, um episódio de AVC e/ou enfarte cerebral silencioso; *iv*) grupo “controle” (n=29) ausência de vasculopatia cerebral, confirmada clínica e imagiologicamente. Adicionalmente, os doentes foram avaliados em termos de risco de ocorrência de AVC, tendo a estratificação sido determinada pelos valores de velocidade máxima média de fluxo na artéria cerebral média (TAMMV), obtidos durante a ecografia com Doppler transcraniano, conforme segue: risco elevado/moderado – TAMMV \geq 170 cm/s (n=31); e risco reduzido – TAMMV $<$ 170 cm/s (n=29).

O DNA genômico foi isolado a partir de amostras de sangue periférico de cada participante. A homozigotia para a mutação c.20A>T no gene *HBB* foi confirmada por PCR-RFLP. A escolha dos potenciais genes modificadores foi efetuada com base em trabalhos efetuados anteriormente no nosso laboratório (5). A genotipagem das variantes em *VCAM1* e *NOS3* foi realizada por PCR, PCR-RFLP ou por sequenciamento de Sanger. A partir das variantes detetadas, foi possível identificar vários haplotipos em ambos os *loci* usando o software PHASE (https://els.comotion.uw.edu/express_license_technologies/phase).

Adicionalmente, procedemos à análise *in silico* de locais de ligação de fatores de transcrição, associados à presença das variantes localizadas na região do promotor de *VCAM1*.

A análise estatística foi efetuada com recurso ao software SPSS (v.25.0, IBM Inc., Chicago, USA). As variáveis categóricas foram representadas por número, frequências e percentagens. O teste exato de Fisher foi usado para a comparação entre variáveis categóricas. O valor de $p > 0,05$ foi utilizado para definir significância estatística. O alelo *minor* de cada variante foi avaliado, usando o modelo dominante, para potencial associação com AVC, enfarte cerebral silencioso, vasculopatia cerebral geral (AVC e/ou enfarte cerebral silencioso) ou risco de AVC (de acordo com as TAMMV medidas pelo Doppler transcraniano), através de tabelas de contingência 2x2, fenótipo x genótipo. Apenas foram consideradas para análise de associação variantes cujos alelos *minor* apresentavam uma frequência $> 0,05$.

_Resultados e discussão

O principal objetivo do presente estudo, que constitui parte de uma investigação mais alargada sobre moduladores genéticos de vasculopatia cerebral pediátrica em drepanocitose, consistiu na avaliação de dados demográficos, clínicos, imagiológicos e genéticos, de forma a desenhar futuramente um painel de biomarcadores com valor preditivo e preventivo para aquela manifestação clínica.

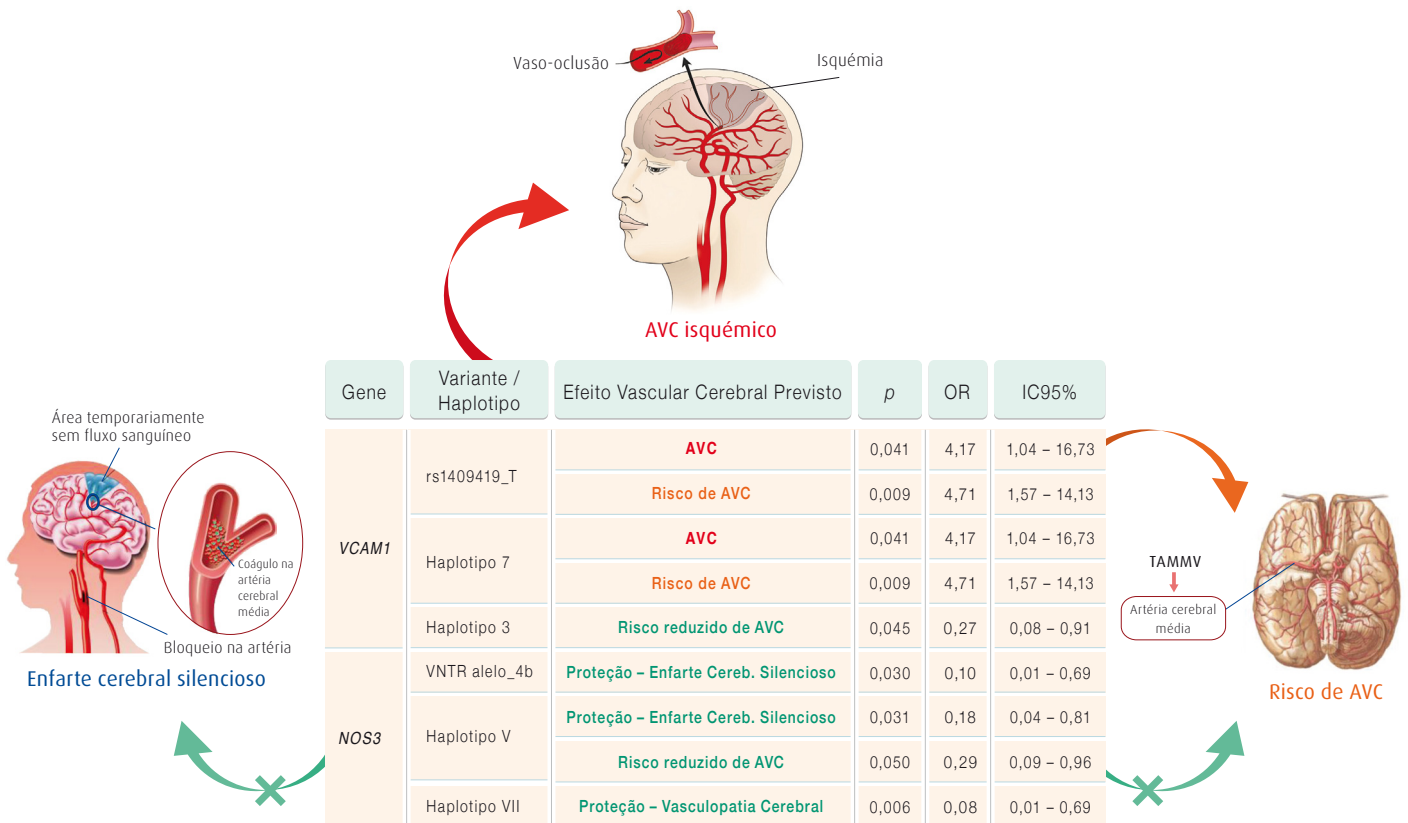
A genotipagem de 6 locais polimórficos no promotor do gene *VCAM1* e de 3 no gene *NOS3* permitiu a caracterização de 7 haplotipos principais em *VCAM1* (identificados de 1 a 7) e também de 7 haplotipos no gene *NOS3* (identificados de I a VII), (tabela 1). A nossa abordagem permitiu identificar associações, estatisticamente significativas, entre a presença de variantes e/ou haplotipos específicos de *VCAM1* e *NOS3* e a presença/ausência de vasculopatia cerebral nos doentes estudados (figura 1).

Tabela 1: Variantes estudadas nos genes *VCAM1* e *NOS3* e haplotipos identificados.

Gene / Variante	Haplótipo						
<i>VCAM1</i>	1	2	3	4	5	6	7
rs1409419 (T>C)	C	C	C	C	C	C	T
rs3917024 (C>T)	C	C	C	C	C	T	C
rs3917025 (CT>--)	CT	CT	CT	CT	--	--	CT
rs3783598 (T>G)	T	T	T	T	T	G	T
rs1041163 (T>C)	T	T	C	C	T	T	T
rs3783599 (C>T)	C	T	C	T	C	C	C
<i>NOS3</i>	I	II	III	IV	V	VI	VII
rs2070744 (C>T)	C	C	C	T	T	T	T
VNTR* no intrão 4	4a	4b	4b	4a	4b	4b	4c
rs1799983 (T>G)	G	G	T	G	G	T	G

* Alelos VNTR: 4a = 4 repetições de uma sequência de 27 pb; 4b = 5 repetições de uma sequência de 27 pb; 4c = 6 repetições de uma sequência de 27 pb

Figura 1: Associação observada entre as variantes genéticas e os haplotipos identificados, nos genes *VCAM1* e *NOS3*, e o efeito modulador putativo na vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose.



Fonte (imagens adaptadas): National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Wikimedia Commons, www.uhere.com

Relativamente a *VCAM1*, observámos uma associação positiva entre a presença da variante rs1409419_T, bem como do haplótipo 7, e a ocorrência de AVC ($p=0,041$; $OR=4,17$; $IC95\%=1,04-16,73$). Em contrapartida, detetámos associação negativa entre a presença do haplótipo 3 de *VCAM1* e risco de AVC ($p=0,045$; $OR=0,27$; $IC95\%=0,08-0,91$) (figura 1). O facto de as referidas variantes se encontrarem na região do promotor do gene, pressupõe que o efeito putativo da sua presença surja por alterações dos níveis de expressão de *VCAM1*, possivelmente por alteração/criação de locais de ligação de fatores de transcrição. Esta possibilidade foi confirmada por análise *in silico*. De salientar que o potencial modulador destas variantes no fenótipo em estudo deverá resultar, não do efeito individual, mas sim de um efeito cumu-

lativo no contexto dos haplotipos que as incluem. A exceção parece ser a rs1409419_T e o haplótipo 7 que a contém, já que a sobreposição de valores de ambos, em termos de associação com vasculopatia cerebral, sugere que a variante tenha um papel preponderante no efeito modulador do respetivo haplótipo.

A eNOS também envolvida na resposta endotelial, desempenha um papel crucial no equilíbrio vasodilatação/vasoconstrição, na remodelação e na proliferação vasculares. As variantes do gene *NOS3*, clinicamente mais relevantes, especialmente a nível cardiovascular, são a rs2070744 (localizada na região do promotor), a rs1799983 (localizada no exão 7) e o polimorfismo de repetição (VNTR) de uma sequência de



27 pb (localizado no intrão 4) (6). No nosso estudo, nenhuma das variantes ou haplotipos de *NOS3* identificados (tabela 1) revelou associação com a ocorrência de AVC. No entanto, o VNTR_alelo 4b, anteriormente referido, revelou uma associação negativa com a ocorrência de enfarte cerebral silencioso ($p=0,030$; OR=0,10; 0,01-0,69), tal como também verificado para o haplotipo V ($p=0,031$; OR=0,18; 0,04-0,81). Observámos ainda uma associação negativa entre a presença deste haplotipo V e o risco de AVC ($p=0,050$; OR=0,29; 0,09-0,96). Por fim, observámos, também uma associação negativa entre a presença do haplotipo VII e a ocorrência de vasculopatia cerebral (AVC e/ou enfarte silencioso) ($p=0,006$; OR=0,08; 0,01-0,69) (figura 1). Em resumo, as variantes de *NOS3*, nomeadamente os haplotipos identificados, parecem estar associados a um efeito protetor, em termos de enfarte cerebral silencioso, de vasculopatia cerebral (AVC e/ou enfarte cerebral silencioso) e de risco de AVC em crianças com drepanocitose.

Conclusão

O conjunto dos nossos resultados sublinha a relevância da modulação genética na fisiopatologia da vasculopatia cerebral pediátrica em drepanocitose. Os moduladores genéticos aqui identificados, após confirmação por estudos funcionais, poderão assumir grande relevância na prevenção da vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose. A sua aplicação na qualidade de biomarcadores com papel preditivo permitirá estabelecer bases para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas.

Financiamento:

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projeto PIC/IC/83084/2007), pelo Instituto de Saúde Ambiental/Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (projeto 2012DGH720).

Agradecimentos:

Os autores agradecem aos doentes e seus progenitores pela participação neste estudo. Agradecemos, ainda, à Prof. Constança Coelho pelo apoio na análise estatística.

Referências bibliográficas:

- (1) Grosse SD, Odame I, Attrash HK, et al. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. *Am J Prev Med.* 2011;41(6 Suppl 4):S398-S405. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2011.09.013>
- (2) Piel FB, Hay SI, Gupta S, et al. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Med.* 2013;10(7):e1001484. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001484>
- (3) Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.* 1998;91(1):288-94. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/91/1/288/1414494/288.pdf>
- (4) Hoppe C, Klitz W, Cheng S, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2004;103(6):2391-96. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3015>
- (5) 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>
- (6) Armenis I, Kalotychou V, Tzanetea R, et al. Prognostic value of T786C and G894T eNOS polymorphisms in sickle cell disease. *Nitric Oxide.* 2017;62:17-23. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.11.002>