

# Influência do Polimorfismo rs7203560 no Elemento Regulatório dos Genes da globina $\alpha$ sobre Marcadores de Hemólise em Pacientes

## Brasileiros com Anemia Falciforme

**Palavras-Chave:** Hemoglobinopatias; Anemia Falciforme; HS-40; Polimorfismos genéticos; Hemólise; População brasileira.

**Autores(as):**

**Diogo Augusto Brunini Teixeira, FCM – UNICAMP**

**Prof. Dr. Magnun Nueldo dos Santos, FCM - UNICAMP**

---

### RESUMO

A Anemia Falciforme (AF) é um problema de saúde pública em praticamente todas as populações onde o corre, inclusive na brasileira, causada pela homozigose do alelo  $\beta$  S [HBB: c.20A>T], cujos produtos proteicos são as cadeias  $\beta$  S [ $[\beta 7(A3)Glu>Val]$ ]. A Hemoglobina (Hb) S ( $\alpha 2 \beta S 2$ ), quando em sua forma desoxigenada, tem forte tendência à formação de polímeros, que tornam os eritrócitos rígidos e em forma de foice, resultando em vaso-oclusão e hemólise crônica grave. O tratamento para a doença se baseia em transfusões sanguíneas e administração de Hidroxiuréia. Entre os moduladores genéticos de gravidade da AF encontra-se a Talassemia  $\alpha$ . A reduzida concentração intracelular de moléculas de Hb, dada a menor biossíntese de cadeias  $\alpha$ , leva a um menor grau de polimerização da HbS, o que, por sua vez, diminui a intensidade da anemia. A Talassemia  $\alpha$  é geralmente causada por deleções nos genes que codificam as cadeias  $\alpha$  da Hb ou por mutações no principal elemento regulatório desses genes, o HS-40 ( $\alpha$ -Major Regulatory Element). Este elemento é polimórfico e um dos polimorfismos conhecidos, o rs7203560, foi recentemente relacionado a menores escores de hemólise em pacientes com AF. Entretanto, dados sobre essa relação são escassos, não havendo ainda nenhum estudo na população brasileira. Os objetivos principais deste projeto são determinar a frequência da mutação rs7203560 e avaliar se sua presença se correlaciona com menores graus de hemólise em uma amostra de 60 pacientes adultos com AF do Hemocentro de Pernambuco-HEMOPE. O HS-40 será amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciado em sequenciador automático (método de Sanger). As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs7203560 serão determinadas e os genótipos comparados com marcadores de hemólise (reticulócitos, bilirrubina e a LDH) dos pacientes. Até o momento, as 60 amostras supracitadas já passaram pela amplificação e estão em processo final de sequenciamento, e os dados sobre marcadores de hemólise de cada paciente já foram coletados e catalogados, além dos demais determinantes de cada indivíduo (sexo, idade, uso ou não de hidroxiuréia e comorbidades associadas), e as análises estatísticas já foram programadas para serem realizadas assim que os dados de sequenciamento forem obtidos.

## OBJETIVOS

Objetivo geral: Verificar se os genótipos do polimorfismo rs7203560 se correlacionam com os graus de hemólise observados em uma amostra de pacientes brasileiros adultos com AF acompanhados no HEMOPE.

Objetivos específicos:

- (1) Determinar a frequência do polimorfismo rs7203560 no grupo populacional analisado;
- (2) Avaliar os dados de quantificação dos seguintes marcadores de hemólise: percentagem de reticulócitos e concentrações plasmáticas ou séricas de bilirrubina direta, indireta e total e da enzima Lactato Desidrogenase (LDH);
- (3) Investigar a existência de associação entre os genótipos do polimorfismo rs7203560 (AA, AC e CC) e os scores hemolíticos apresentados pelos pacientes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

1) Aspectos Éticos: O presente projeto já recebeu a autorização do comitê de ética (parecer nº 5.940.176) para utilizar os dados clínico-laboratoriais e amostras de material genético (DNA) de pacientes com AF previamente coletados no Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE) para a realização do projeto de doutorado “Haptoglobina, Hemopexina e Marcadores de Hemólise, Hipercoagulabilidade e Inflamação Sistêmica e Vascular na Anemia Falciforme” orientado pelo Prof. Dr. Magnun Nueldo Nunes dos Santos (parecer nº 1.504.475).

2) População analisada: O grupo amostral conta com 60 indivíduos adultos portadores de AF (68% de homens e 32% de mulheres) e faixa etária variando entre 19 e 42 anos. Trinta e dois (53,33%) dos pacientes nunca foram tratados com Hidroxiureia (Hidréia), enquanto os 28 restantes (46,67%) recebem essa droga regularmente. Todos os indivíduos não receberam nenhuma transfusão sanguínea ou foram hospitalizados nos três meses anteriores à coleta dos dados, e apresentavam um quadro sem indicação de crises ou infecção [Hb em steady state (estável)].

3) Sequenciamento das amostras de DNA para identificação do polimorfismo rs7203560: A região do cromossomo 16p13.3 que contempla o rs7203560 será inicialmente amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com primers e condições previamente descritas. O sequenciamento, pela técnica de Sanger, será realizado em Sequenciador Automático ABI PRISM 3500 – Applied Biosystems, com primers também utilizados por Hartevelde et al, 2002.

4) Análises estatísticas: As frequências dos alelos A e C e dos genótipos AA, AC e CC serão inicialmente determinadas e avaliadas quanto ao equilíbrio de Hard-Weinberg no grupo analisado. Os valores dos indicadores de hemólise (contagem de reticulócitos, bilirrubina direta, indireta e total e LDH), obtidos junto aos prontuários médicos dos pacientes, serão comparados, tanto em relação aos alelos quanto aos genótipos, com os testes estatísticos apropriados, conforme orientação da Assessoria de Bioestatística da Câmara de Pesquisa da FCM/Unicamp.

## ATIVIDADES REALIZADAS E RESULTADOS PARCIAIS

### A) Preparação de amostras para sequenciamento genético

Conforme proposto na pesquisa, as amostras (DNA) de 60 pacientes brasileiros adultos com AF, provenientes do HEMOPE, já foram obtidas, e nesses meses iniciais foram preparadas para a realização da amplificação (Reação em Cadeia de Polimerase – PCR) e sequenciamento - pela técnica de Sanger – da região do cromossomo 16p13.3 que contempla o polimorfismo de interesse (rs7203560). A preparação constituiu-se pela identificação da concentração inicial das amostras e a avaliação do grau de pureza com a utilização do espectômetro NanoDrop®1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, EUA), com posterior adequação para a concentração de 50 a 100ng/μL por meio de diluição confirmadas com o mesmo equipamento, sendo as amostras de DNA preparadas para a realização dos ensaios, separadas em alíquotas de 15μL e armazenadas em ambiente adequado (freezer -80oC).

### B) Desenho dos oligonucleotídeos (primers) para a PCR e Sequenciamento

Uma atenção especial deve ser dispensada no desenho dos primers com o objetivo de garantir a especificidade e reprodutibilidade da reação de PCR. Portanto, alguns cuidados devem ser considerados como, por exemplo, a localização dessas sequências nos genes, o tamanho e porcentagem de GC do amplicon, que estão diretamente relacionados com a Temperatura de Melting (TM) esperada para o produto. Os primers foram desenhados (Tabela 1) com a utilização do software Primer Express (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, EUA) e a análise das sequências foram complementadas com a utilização dos programas Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) e Gene Runner. Vale ressaltar que os primers já foram adquiridos e encontram-se no Laboratório.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados para a avaliação da expressão gênica.

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento
Forward	GTGCTGACAGACTTGCTGGACA	482 pb
Reverse	CGTTATCCTGGCTGTGCTTIAT	

### C) Realização de PCR, purificação de PCR e reação de sequenciamento

Todas as 60 amostras previamente preparadas tiveram a região de interesse (região do cromossomo 16p13.3 que contempla o polimorfismo alvo {rs7203560}) amplificada por PCR, com quantificação pré e pós amplificação com o espectômetro NanoDrop®1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, EUA). As amostras foram então submetidas a purificação por meio de kits de purificação, também checadas antes e após por meio do espectômetro. Após isso, as amostras foram armazenadas em freezer -80 oC). Todas foram, posteriormente, submetidas a reação de sequenciamento pela técnica de Sanger, obtendo-se alíquotas de 10mcL para cada amostra, todas novamente armazenadas em ambiente e condições adequadas.

### D) Planilha com os dados laboratoriais

Cabe destacar que os dados referentes às concentrações dos marcadores de hemólise, correspondentes a cada uma das amostras, já estão planilhados e, posteriormente, serão utilizados para avaliar a possível associação com polimorfismo rs7203560 alvo desta pesquisa.

## E) Revisão de literatura

Por fim, foi realizada uma revisão da bibliografia disponível acerca dos pontos principais do projeto, buscando novas atualizações ou informações, visto que, de nosso conhecimento, até o momento só há na literatura três estudos publicados analisando a influência de polimorfismos do rs7203560 sobre scores hemolíticos em pacientes com AF, os quais são destacados abaixo.

- Alimohammadi-Bidhendi S. et al (2021) descrevem uma pesquisa em população iraniana, descrevendo um perfil de predominância de haplótipos do HS-40, importante devido ao número reduzido de populações nos quais esse perfil foi traçado.
- Milton JT. et al (2013), Kato GJ. et al (2017) e Rees DC. et al (2022) descrevem e trazem elementos aprofundados e atualizados sobre a fisiopatologia e sobre as diversas manifestações clínicas do espectro da Doença Falciforme, apontando tanto os influenciadores genéticos quanto ambientais na severidade e no tipo de manifestações apresentadas. Tais achados corroboram mais uma vez a importância da pesquisa sobre os moduladores genéticos da Doença Falciforme, tal como o objeto de estudo da atual pesquisa.
- Brandow AM. et al (2022) e Leonard A. et al (2022) apresentam a evolução de novas terapias - nos últimos 4 anos - modificadoras de doença em desenvolvimento e aprovadas para o tratamento da Doença Falciforme e suas complicações (L-glutamina, Crizanlizumab, Voxelotor), bem como perspectivas futuras para terapia gênica, incluindo cura definitiva.

## F) Atividades a serem realizadas

As etapas previstas para o próximo trimestre são:

- A purificação dos produtos de sequenciamento seguido da análise dos resultados do sequenciamento (n=60);
- A análise estatística dos resultados com a possível associação entre o polimorfismo rs7203560 com os marcadores laboratoriais de hemólise;
- Além disso, a revisão da bibliografia continuará sendo realizada para a elaboração do relatório final da IC, do manuscrito e, assim como, de resumos que serão preparados para submissão em eventos científicos que ocorrerão no segundo semestre de 2024.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. HOFFBRAND, Victor; MOSS, Paul. Fundamentos em Hematologia, 6ª ed. Artmed: 454p. 2013.
2. METTANANDA, S.; HIGGS, D. R. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. Hematol Oncol Clin North Am, 32(2): 177-191, 2018.
3. HARTEVELD, C. L.; HIGGS, D. R. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis, 5: 13,2010.
4. KATO, G. J.; PIEL, F. B.; REID, C. D.; GASTON, M. H. et al. Sick cell disease. Nat Rev Dis Primers, 4: 1-22, 2018.
5. STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. Am J Hematol, 87 (8): 795-803, 2012.
6. PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sick Cell Disease. N Engl J Med, 376(16): 1561-1573, 2017.
7. SONATI, M. E. F.; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. J Pediatr, 84(4): S40-51, 2008.
8. MUSALLAM, K. M.; KHOURY, R. A.; ABOUD, M. R. Cerebral infarction in children with sickle cell disease: a concise overview. Hemoglobin, 35 (5-6): 618-624, 2011.
9. MILTON, J. N.; SHAIKHO, E. M.; STEINBERG, M. H. Haemolysis in sickle cell anaemia: effects of polymorphisms in  $\alpha$ -globin gene regulatory elements. Br J Haematol, 186 (2):363-364, 2019.
10. HARTEVELD, C. L.; MUGLIA, M.; PASSARINO, G.; KIELMAN, M. F., BERNINI, L.F. Genetic polymorphism of the major regulatory element HS-40 upstream of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. Br J Haematol, 119(3): 848-854, 2002.
11. RIBEIRO, D. M., FIGUEIREDO, M. S.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F. et al. Haplotypes of  $\alpha$ -globin gene regulatory element in two Brazilian native populations. Am J Phys Anthropol, 121(1): 58-62, 2003.

12. RIBEIRO, D. M.; ZACARIOTTO, T. R.; SANTO, M. N.; SONATI, M. F.; COSTA, F. F. et al. Influence of the polymorphisms of the alpha-major regulatory element HS-40 on in vitro gene expression. *Braz J Med Biol Res*, 42 (9): 783-786, 2009.
13. CHANG, A. K.; GINTER SUMMARELL, C. C.; BIRDIE, P. T.; SHEEHAN, V. A. Genetic modifiers of severity in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*, 68(2-3):147-164, 2018.
14. MILTON, J. N.; BALDWIN, C. T.; MELISTA, E.; SEBASTIANI, P. et al. Genetic determinants of haemolysis in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*, 161, (2): 270-278, 2013.
15. RAFFIELD, L. M.; ULIRSCH, J. C.; NAIK, R. P.; LESSARD, S. et al. Common  $\alpha$ -globin variants modify hematologic and other clinical phenotypes in sickle cell trait and disease. *PLoS Genet*, 14, (3): e1007293, 2018.
16. Alimohammadi-Bidhendi S, Azadmehr S, Razipour M, Zeinali S, *et al.* Regulatory Mutation Study in Cases with Unsolved Hypochromic Microcytic Anemia and  $\alpha$ -Major Regulatory Element Haplotype Analysis in Iran. *Hemoglobin*. 2021 Jan;45(1):37-40. doi: 10.1080/03630269.2021.1882482. Epub 2021 Mar 27. PMID: 33775199.
17. Rees DC, Brousse VAM, Brewin JN. Determinants of severity in sickle cell disease. *Blood Rev*. 2022 Nov;56:100983. doi: 10.1016/j.blre.2022.100983. Epub 2022 Jun 9. PMID: 35750558.
18. Brandow AM, Liem RI. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. *J Hematol Oncol*. 2022 Mar 3;15(1):20. doi: 10.1186/s13045-022-01237-z. PMID: 35241123; PMCID: PMC8895633.
19. Leonard A, Tisdale JF, Bonner M. Gene Therapy for Hemoglobinopathies: Beta-Thalassemia, Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2022 Aug;36(4):769-795. doi: 10.1016/j.hoc.2022.03.008. Epub 2022 Jun 27. PMID: 35773052.
20. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT (2017) Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease, *Journal of Clinical Investigation*, 127, 750–760.