

Avaliação das variantes moleculares do gene *KLF1*: padronização e caracterização em indivíduos com níveis *borderline* de Hb A2, sem evidência de talassemia beta

Palavras-Chave: Hemoglobinopatias, Talassemia beta, *KLF1*.

Autores(as):
Gabriele Faria de Souza, IB – UNICAMP

Danaê Malimpensa, FCM-UNICAMP
Prof^(a). Dr^(a). Susan Elisabeth Domingues Costa Jorge, FCM – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias causadas por mutações nos genes responsáveis pela produção de hemoglobina (proteína que transporta oxigênio dos pulmões para o restante do corpo). A síntese das cadeias proteicas que compõem a hemoglobina é controlada por mecanismos moleculares ao longo do desenvolvimento humano, incluindo os fatores de transcrição. Um desses fatores é o *Erythroid Kruppel-like factor 1*, ou *KLF1*, que possui um papel regulador fundamental em genes responsáveis pelas cadeias beta e delta da hemoglobina (*HBB* e *HBD*, respectivamente).

Alterações no gene *KLF1* podem influenciar a concentração de hemoglobina A2 (HbA2). Níveis elevados de HbA2 (acima de 4%) são usados como um dos critérios para a identificação de indivíduos com traço de talassemia beta (heterozigotos). No entanto, algumas pessoas podem apresentar níveis limítrofes (entre 2,9% e 3,5%) sem a presença do traço beta talassêmico.

Este estudo objetiva, portanto, caracterizar cinco polimorfismos previamente descritos no gene *KLF1* [rs3817621 (-g.251C>G), rs79334031 (-g.148G>A), rs112631212 (c.115A>C), rs2072597 (c.304T>C) e rs2072596 (c.544T>C)], em 17 indivíduos previamente atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP, sem evidência de talassemia beta e com níveis *borderline* de HbA2 (2,9%–3,5%). Como controle, 17 indivíduos saudáveis (sem alterações laboratoriais) foram selecionados (A2 abaixo de 2,5%).

A caracterização molecular será realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do alvo gênico seguido por digestão através de enzimas de restrição (AclI, FaeI e BstNI), com posterior sequenciamento (Sanger) em amostras aleatórias para validação dos resultados.

METODOLOGIA:

Este estudo é de natureza descritiva observacional, com análise de amostras biológicas previamente coletadas. A população é composta por 34 indivíduos previamente atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp. Serão analisados dois grupos: 17 indivíduos com níveis limítrofes de HbA2 (2,9%–3,5%) e 17 com níveis padrão (<2,5%), sem diagnóstico de talassemia beta. Os critérios de inclusão consideraram idade ≥ 18 anos e disponibilidade de dados laboratoriais completos.

A caracterização populacional envolveu idade, sexo, autodeclaração de cor e índices hematimétricos: hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), GV, hemoglobina corpuscular média (HCM), amplitude de distribuição eritrocitária (RDW), HbF e HbA2. A análise genética será realizada com base em cinco polimorfismos no gene *KLF1*: [rs3817621 (-g.251C>G), rs79334031 (-g.148G>A), rs112631212 (c.115A>C), rs2072597 (c.304T>C) e rs2072596 (c.544T>C)], utilizando técnicas de digestão por enzimas de restrição (AciI, FauI e BstNI). Um subconjunto de amostras será submetido ao sequenciamento de Sanger para validação dos achados.

Todas as análises estatísticas e a construção dos gráficos descritivos foram realizadas no *software* GraphPad Prism (versão 9).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A partir dos dados coletados dos indivíduos objeto do estudo (com Hb A2 limítrofe), observa-se maior proporção de indivíduos do sexo feminino em relação ao sexo masculino (n= 11 e 6, respectivamente), com média de idade de 34,5 anos no grupo feminino e 39,7 anos no masculino - Figura 1A. Em relação à autodeclaração de cor, a maioria dos participantes era branca - Figura 1B.

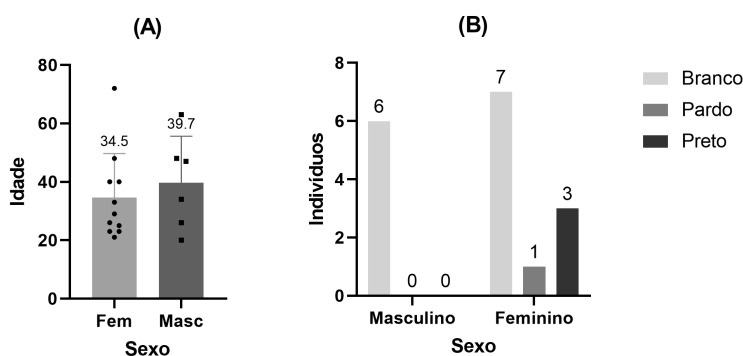


Figura 1: Distribuição de idade média por sexo (A) e autodeclaração de cor (B).

Os índices hematimétricos dos indivíduos apresentam-se dentro da referência laboratorial, sem aparentes diferenças entre os sexos, com exceção dos parâmetros de GV, Hb e Hct ($p=0.01$, 0.004 e 0.01 , respectivamente) - Tabela 1 e Figura 2A-2H.

Parâmetro	Feminino (média)	Masculino (média)	Valor de Referência
Idade	34,5	39,7	-
HbA2 (%)	3,14	3,20	(1,5% - 3,5%)
HbF (%)	0,42	0,46	≤1%
GV	3,94	4,93	VR: M:4,5-6,1 / F:4,2-5,4
Hemoglobina (Hb)	11,69	14,85	VR: M:14-18 / F:12-16
Hematócrito (Ht)	35,35	43,83	VR: M:41-52 / F:36-46
VCM (fL)	89,79	88,87	VR: 80-99
HCM (pg)	29,70	30,23	VR: 27-32
RDW (%)	13,32	12,53	VR: 10-15

Tabela 1: Dados hematimétricos dos indivíduos em tabela.

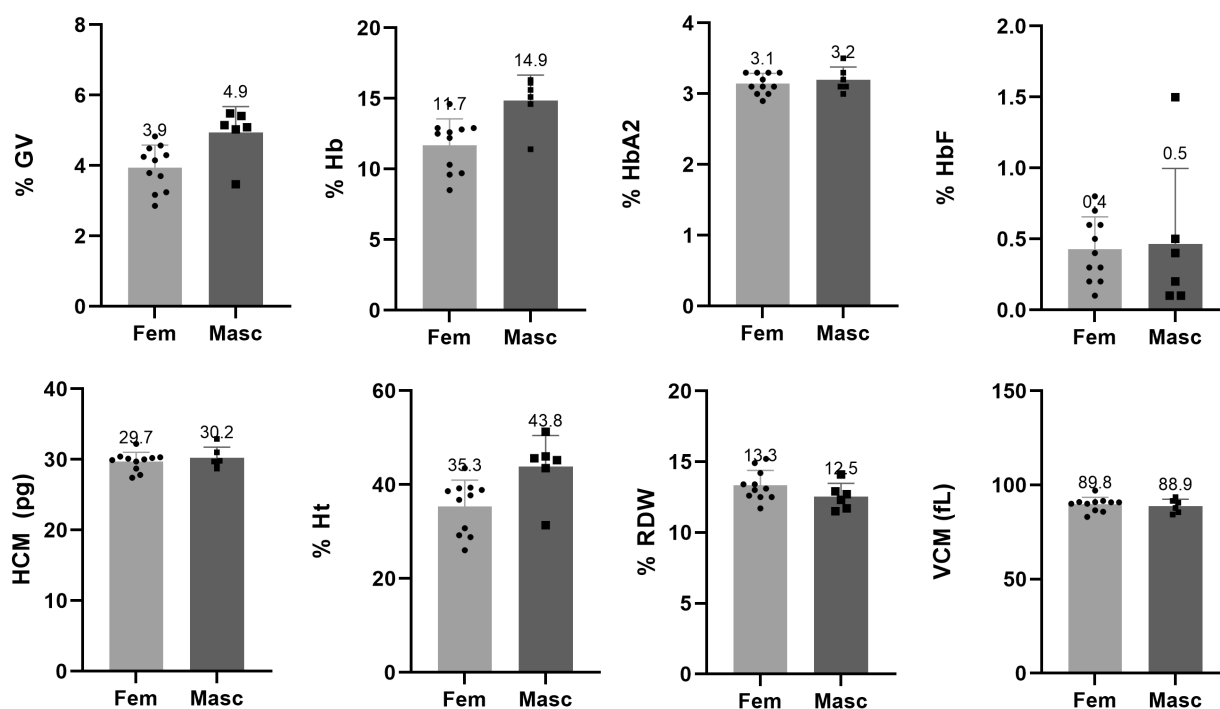


Figura 2: Dados hematimétricos dos indivíduos em gráficos individuais (A-H)¹, com média e SD.

CONCLUSÕES:

¹ GV (A), Hb (B), HbA2 (C), HbF (D), HCM (E), Ht (F), RDW (G) e VCM (H).

Os dados hematimétricos avaliados até o momento mostram que indivíduos com níveis borderline de HbA2 (entre 2,9% e 3,5%) apresentam resultados hematimétricos compatíveis com a faixa de normalidade, tanto nos índices eritrocitários (como volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina) quanto nos valores de hemoglobina total e hematócrito. A contagem de hemácias permaneceu dentro dos parâmetros esperados, observando apenas diferenças fisiológicas entre os sexos, como eritrócitos, hemoglobina e hematócrito naturalmente mais altos nos homens.

A ausência de alterações laboratoriais relevantes reforça a hipótese de que esses níveis borderline de HbA2 podem estar relacionados a fatores regulatórios genéticos, incluindo a presença de variações no gene *KLF1*. A próxima fase do estudo irá investigar precisamente estas variantes. Assim, a caracterização hematimétrica desses indivíduos constitui base importante para o aprofundamento das análises genéticas, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos que modulam os níveis de HbA2 e auxiliando no diagnóstico de hemoglobinopatias em casos com perfis laboratoriais limítrofes.

BIBLIOGRAFIA

1. Balla, T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev.*, v. 93, n. 3, p. 1019-137, 2013.
2. Bazenet, C. E.; Ruano, A. R.; Brockman, J. L.; Anderson, R. A. The human erythrocyte contains two forms of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase which are differentially active toward membranes. *J Biol Chem.*, v. 265, n. 29, p. 18012-22, 1990.
3. Bulley, S. J.; Droubi, A.; Clarke, J. H.; Anderson, K. E.; Stephens, L. R.; Hawkins, P. T.; et al. In B cells, phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase- α synthesizes PI(4,5)P₂ to impact mTORC2 and Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 113, n. 38, p. 10571-6, 2016.
4. Bunn, H. F.; Forget, B. G. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspect. In: *Hemoglobin*. 1ª ed. Philadelphia: Saunders; 1986.
5. Cao, A.; Moi, P. Regulation of the Globin Genes. *Pediatr Res*, v. 51, p. 415–421, 2002.
6. Catapano, R.; Sessa, R.; Trombetti, S.; Cesaro, E.; Russo, F.; Izzo, P.; Makis, A.; Grosso, M. Identification and Functional Analysis of Known and New Mutations in the Transcription Factor KLF1 Linked with β -Thalassemia-like Phenotypes. *Biology*, v. 12, n. 4, p. 510, 2023.
7. Channing Yu, Kathy K. Niakan, Mark Matsushita, George Stamatoyannopoulos, Stuart H. Orkin, Wendy H. Raskind; X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*, v. 100, n. 6, p. 2040–2045, 2002.
8. Chung, J.; Bauer, D. E.; Ghamari, A.; Nizzi, C. P.; Deck, K. M.; Kingsley, P. D.; et al. The mTORC1/4E-BP pathway coordinates hemoglobin production with L-leucine availability. *Sci Signal.*, v. 8, n. 372, p. ra34, 2015.
9. Clarke, J. H.; Emson, P. C.; Irvine, R. F. Localization of phosphatidylinositol phosphate kinase II γ in kidney to a membrane trafficking compartment within specialized cells of the nephron. *Am J Physiol Renal Physiol.*, v. 295, n. 5, p. F1422-30, 2008.
10. Costa, F. F.; Conran, N. *Sickle Cell Anemia - From Basic Science to Clinical Practice*. 1ª ed. Springer; 2016.
11. Di Paolo, G.; De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, v. 443, p. 651-7, 2006.
12. Donze, D.; Townes, T. M.; Bieker, J. J. 1995 Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*, v. 270, p. 1955–1959.
13. Doughman, R. L.; Firestone, A. J.; Anderson, R. A. Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P(2) in its place. *J Membr Biol.*, v. 194, n. 2, p. 77-89, 2003.
14. El-Agouza, I.; Abu Shahla, A.; Sirdah, M. The effect of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: Possible consequences for clinical diagnosis. *Clin Lab Haematol*, v. 24, p. 285–289, 2002.
15. Feng, R.; Doerfler, P. A.; Yao, Y.; Wang, Y. D.; Li, C.; Root, D. E.; et al. The DNA Methylation Maintenance Protein UHRF1 Regulates Fetal Globin Expression Independent of HBG Promoter DNA Methylation. *Blood*, v. 132, p. 410, 2018.

16. Galanello, R.; Barella, S.; Ideo, A.; et al. Genotype of subjects with borderline hemoglobin A2 levels: implication for beta-thalassemia carrier screening. *Am J Hematol*, v. 46, n. 2, p. 79-81, 1994.
17. Gelato, K. A.; Tauber, M.; Ong, M. S.; Winter, S.; Hiragami-Hamada, K.; Sindlinger, J.; et al. Accessibility of different histone H3-binding domains of UHRF1 is allosterically regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate. *Mol Cell*, v. 54, n. 6, p. 905-19, 2014.
18. Heck, J. N.; Mellman, D. L.; Ling, K.; Sun, Y.; Wagoner, M. P.; Schill, N. J.; et al. A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 42, p. 15-39, 2007.
19. Hoffbrand, A. V.; Moss, P. A. H. *Essential Haematology*. 6th ed. Malden: 2011.
20. Ishihara, H.; Shibasaki, Y.; Kizuki, N.; Wada, T.; Yazaki, Y.; Asano, T.; et al. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem*, v. 273, n. 15, p. 8741-8, 1998.
21. J C, Y Y, J F, J X, T Z, F C, et al. Structural Insight Into Coordinated Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 9 (H3K9me3) by the Plant Homeodomain (PHD) and Tandem Tudor Domain (TTD) of UHRF1 (Ubiquitin-Like, Containing PHD and RING Finger Domains, 1) Protein. *The Journal of biological chemistry*, v. 288, n. 2, 2013.
22. Lucia Perseu, Stefania Satta, Paolo Moi, Franca Rosa Demartis, Laura Manunza, Maria Carla Sollaino, Susanna Barella, Antonio Cao, Renzo Galanello; KLF1 gene mutations cause borderline HbA2. *Blood*, v. 118, n. 16, p. 4454-4458, 2011.
23. Madhupantula, S. V.; Mosca, P. J.; Robertson, G. P. The Akt signaling pathway: An emerging therapeutic target in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther*, p. 1032-49, 2011.
24. Malimpensa, D.; Faber, E.; Corat, M. A.; Lana, M. V.; Strauss, B. E.; Costa, F. F.; et al. CRISPR/Cas9 Unsettle PIP4K2A and α , β , and γ Globin Genes Expression | *Blood* | American Society of Hematology. *Blood*, v. 132, 2020.
25. Miller, I. J.; Bieker, J. J. 1993 A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol*, v. 13, p. 2776-2786.
26. Mosca, A.; Paleari, R.; Ivaldi, G.; Galanello, R.; Giordano, P. C. The role of haemoglobin A(2) testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies. *J Clin Pathol*, v. 62, n. 1, p. 13-7, 2009.
27. Peretti de Albuquerque Wobeto, V.; Machado-Neto, J. A.; Zaccariotto, T. R.; Ribeiro, D. M.; da Silva Santos Duarte, A.; Saad, S. T.; et al. PIPKIIalpha is widely expressed in hematopoietic-derived cells and may play a role in the expression of alpha- and gamma-globins in K562 cells. *Mol Cell Biochem*, v. 393, n. 1-2, p. 145-53, 2014.
28. Rameh, L. E.; Talias, K. F.; Duckworth, B. C.; Cantley, L. C. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, v. 390, n. 6656, p. 192-6, 1997.
29. Ruopeng Feng, Phillip A Doerfler, Yu Yao XT, Yong-Dong Wang, Chunliang Li, David E. Root, et al. The DNA Methylation Maintenance Protein UHRF1 Regulates Fetal Globin Expression Independent of HBG Promoter DNA Methylation. *Blood*, v. 132, p. 410, 2018.
30. Saxton, R. A.; Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, v. 168, n. 6, p. 960-76, 2017.
31. Somervaille, T. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. *J R Soc Med*, v. 94, n. 1, p. 602-3, 2001.
32. Sonati, M. F.; Costa, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)*, v. 84, n. 4 Suppl, p. S40-51, 2008.
33. Steinberg, M. H.; Rodgers, G. P. HbA2 : biology, clinical relevance and a possible target for ameliorating sickle cell disease. *Br J Haematol*, v. 170, n. 6, p. 781-7, 2015.
34. Wenning, M. R.; Mello, M. P.; Andrade, T. G.; Lanaro, C.; Albuquerque, D. M.; Saad, S. T.; et al. PIP4KIIA and beta-globin: transcripts differentially expressed in reticulocytes and associated with high levels of Hb H in two siblings with Hb H disease. *Eur J Haematol*, v. 83, p. 490-3, 2009.
35. Xu, L.; Zhu, D.; Zhang, Y.; Liang, G.; Liang, M.; Wei, X.; Feng, X.; Wu, X.; Shang, X. Compound Heterozygosity for KLF1 Mutations Causing Hemolytic Anemia in Children: A Case Report and Literature Review. *Front Genet*, v. 12, p. 691461, 2021.
36. Zaccariotto TR, Lanaro C, Albuquerque DM, Santos MN, Bezerra MA, Cunha FG, et al. Expression profiles of phosphatidylinositol phosphate kinase genes during normal human in vitro erythropoiesis. *Genet Mol Res*. 11. Brazil2012. p. 3861-8.
37. Zakaria, N. A.; Islam, M. A.; Abdullah, W. Z.; Bahar, R.; Mohamed Yusoff, A. A.; Abdul Wahab, R.; Shamsuddin, S.; Johan, M. F. Epigenetic Insights and Potential Modifiers as Therapeutic Targets in β -Thalassemia. *Biomolecules*, v. 11, n. 5, p. 755, 2021.