

# VARIANTES GENÉTICAS PRÓ-TROMBÓTICAS COMO (IMPROVÁVEIS?) FACTORES DE RISCO PARA AS GRANDES CRISES VASO-OCCLUSIVAS NA DREPANOCITOSE

I Moreira ■ P Faustino ■ I Picanço ■ R Martins ■ A Morais ■ A Dias ■ I Soares  
C Rolão ■ JL Ducla-Soares ■ L Braga ■ D David ■ J Lavinha

## RESUMO

**CONTEXTO:** A drepanocitose é uma anemia hemolítica hereditária com características pró-adesivas, pró-inflamatórias e pró-coagulantes, incluindo alterações na hemostase e ativação da cascata da coagulação.

**PLANO DO ESTUDO:** Neste estudo analisaram-se, em 140 drepanocíticos africanos e 126 indivíduos sem hemoglobina S também de origem africana, variantes genéticas polimórficas em quatro *loci* envolvidos na coagulação (*F2* 20210G>A e *F5* R506Q), na fibrinólise (*PAI-1* 5G>4G), ou no metabolismo da homocisteína (*MTHFR* 677C>T). Estratificaram-se os pacientes em dois grupos de acordo com a ocorrência ou não de, pelo menos, uma complicação vaso-oclusiva (CVO) grave até à data da sua participação no estudo.

**RESULTADOS:** Não se observou uma associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de uma CVO grave e a herança do alelo predisponente à trombose, 4G no *locus PAI-1* ou 677T no *locus MTHFR*. Nenhum drepanocítico apresentava os alelos *F2* 20210A ou *F5* 506Q (factor V Leiden). Visando excluir a possibilidade de que genuínas diferenças inter-grupos fossem mascaradas pela presença de indivíduos mais jovens no grupo sem-CVO, dividiu-se este num sub-grupo de pacientes mais novos e num sub-grupo de pacientes cuja idade não diferia significativamente do grupo com-CVO grave. Mesmo assim, não foi encontrada associação significativa. No entanto, pode observar-se, no grupo de doentes com o alelo *PAI-1* 4G (cuja expressão resulta numa diminuição da actividade fibrinolítica), uma tendência (OR=1,6) para um risco acrescido de CVO. Esta tendência era ligeiramente maior (OR=2,1) se se considerasse apenas a CVO síndrome torácica aguda.

**CONCLUSÕES:** O alelo 4G no promotor do *PAI-1* poderá ser um factor de risco para CVO na drepanocitose, uma hipótese a testar numa série maior de doentes, idealmente oriunda de uma população homogénea e com alta prevalência de drepanocitose.

Palavras-chave: drepanocitose, polimorfismos genéticos (*F2*, *F5*, *MTHFR*, *PAI-1*), vaso-oclusão.

## ABSTRACT

**CONTEXT:** Sickle cell disease (SCD) is a hereditary haemolytic anaemia with pro-adherence, pro-inflammatory and pro-coagulant features, including haemostatic changes and activation of the coagulation cascade.

**STUDY PLAN:** In this study we have tested 140 SCD African patients, and 126 African individuals not producing haemoglobin S, for polymorphic genetic variation at four loci involved in the control of blood coagulation (*F2* 20210G>A and *F5* R506Q), fibrinolysis (*PAI-1* 5G>4G), or homocystein metabolism (*MTHFR* 677C>T). Patients were stratified into two groups: those with at least one major vaso-occlusive complication (VOC) and those so far without any of these complications.

**RESULTS:** No statistically significant association was observed between the occurrence of a major VOC and the inheritance of the prothrombotic allele, 4G at *PAI-1* locus or 677T at *MTHFR* locus. No SCD patient had the *F2* 20210A or the *F5* 506Q (factor V Leiden) allele. In order to exclude the possibility of actual inter-group differences being masked by the presence of younger individuals in the uncomplicated patient group, we have sub-divided it into a sub-group of younger patients and a sub-group of patients with an average age not significantly different from the major-VOC group. Still, no significant association was found. Nevertheless, a trend (OR=1.6) towards an increased VOC risk could be observed in the group of patients carrying the *PAI-1* 4G allele, which results in a decreased fibrinolytic activity. This trend was slightly stronger (OR=2.1) if acute chest syndrome was the only VOC to be considered.

**CONCLUSIONS:** The 4G allele within the *PAI-1* promoter may be a VOC risk factor in SCD, a hypothesis to be tested in a larger patient series, ideally from a high sickle cell disease prevalence homogeneous population.

**KEY-WORDS:** sickle cell disease, genetic polymorphism (*F2*, *F5*, *MTHFR*, *PAI-1*), vaso-occlusion.

## INTRODUÇÃO

## GENOTIPAGEM

A drepanocitose é uma anemia hemolítica hereditária e clinicamente heterogênea que apresenta características pró-adesivas, pró-inflamatórias e pró-coagulantes. Estas últimas incluem alterações na hemostase e activação da cascata da coagulação<sup>1,2</sup>. No entanto, o significado deste estado pró-coagulante não é claro, observando-se uma marcada variabilidade inter-individual na frequência e gravidade dos episódios vaso-oclusivos. Várias tentativas de delinear um perfil genético predisponente ou protector das complicações vasculares na drepanocitose, com potencial valor prognóstico, têm conduzido a resultados contraditórios<sup>3-5</sup>. Entretanto, anunciou-se, em 2003, a realização de um estudo de associação caso-controlo da doença cérebro-vascular em crianças drepanocíticas que combinaria a abordagem por genes candidatos com uma abordagem pan-genómica<sup>6</sup>. Infelizmente, os resultados de tão promissor estudo, tanto quanto sabemos, ainda não foram publicados.

O presente artigo relata os resultados de um estudo de associação entre a herança de determinados alelos em genes envolvidos no controlo da coagulação sanguínea, fibrinólise ou metabolismo da homocisteína e a ocorrência de complicações vaso-oclusivas graves em doentes drepanocíticos de origem africana.

## MÉTODOS

## AMOSTRA POPULACIONAL

Neste estudo analisámos 140 doentes drepanocíticos (genótipo *HBB SS*) de origem africana e que são seguidos nos hospitais portugueses. Do ponto de vista clínico, os doentes foram estratificados em dois grupos: por um lado, os que tinham tido, pelo menos, uma complicação vaso-oclusiva (CVO) grave (AVC, síndrome torácica aguda, osteonecrose ou úlcera de perna) e, por outro, aqueles que, até à data da sua participação no estudo, não tinham tido qualquer daquelas complicações. O primeiro grupo (com-CVO; n=41) tinha uma média de idades de 18,3±8,8 ano, *ratio* de sexos (F/M) de 0,98 e valor médio de Hemoglobina (Hb) de 8,1±1,1 g/dL. No segundo grupo (sem-CVO; n=99), estes parâmetros tinham, respectivamente, os valores de 9,1±7,6 ano, 1,05 e 8,0±1,1 g/dL. Como população de referência, foram analisados 126 indivíduos sem drepanocitose e não produtores de HbS (genótipo *HBB AA*) também de origem africana, com média de idades de 28±8,3 ano, *ratio* F/M de 5,3 e valor médio de Hb de 12,1±1,3 g/dL. O estudo obteve parecer favorável da comissão de ética institucional.

Investigámos a variação genética polimórfica em quatro *loci* envolvidos no controlo da coagulação sanguínea (protrombina, *F2*; factor V - *F5*), na fibrinólise (activador do inibidor do plasminogénio - 1, *PAI-1*) ou no metabolismo da homocisteína (metileno-tetrahydro-folato redutase, *MTHFR*). A genotipagem foi realizada em DNA extraído de sangue periférico<sup>7</sup>, por amplificação enzimática de DNA (PCR) seguida de análise de polimorfismo de conformação de DNA em cadeia simples (SSCP), em dois grupos multiplex, essencialmente como descrito anteriormente<sup>8,9</sup>. Sucintamente, as variantes *F5*: R506Q (Leiden) e promotor *PAI-1*: 4G/5G foram amplificadas em simultâneo (temperatura de *annealing*: 54°C), e analisadas por SSCP em gel de poliacrilamida não-desnaturante a 6%, em tampão TPE 1x; electroforese a 40W, 5h30m-7h30m, a 4°C. As variantes *F2*: G20210A e *MTHFR*: C677T (temperatura de *annealing*: 58°C) foram analisadas em gel MDE 0,75x (FMC BioProducts, Rockland, ME) em tampão TBE 0,6x; electroforese a 6W, 13h-16h, à temperatura ambiente. As bandas electroforéticas foram visualizadas por coloração do gel com nitrato de prata<sup>10</sup>.

## ANÁLISE DE DADOS

A análise estatística dos dados incluiu o teste de  $\chi^2$  de significância da associação e o cálculo de *odds-ratio* (OR) para a ocorrência de CVO.

## RESULTADOS

Os resultados da genotipagem nos *loci* *MTHFR* e *PAI-1* estão sumarizados no Quadro 1. Os *loci* *F2*: G20210A e *F5*: R506Q (factor V Leiden) não se revelaram polimórficos na amostra de doentes em estudo pelo que não voltarão a ser considerados neste artigo. A distribuição observada dos genótipos nos *loci* *MTHFR* e *PAI-1*, tanto na amostra da população de doentes como na da população de referência, não se desvia significativamente do previsto, assumindo que a população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não se observou uma associação estatisticamente significativa (teste de  $\chi^2$ ) entre a ocorrência de uma CVO grave e a herança (de uma ou duas cópias) do alelo variante nos *loci* *MTHFR* (alelo T) e *PAI-1* (alelo 4G). Com vista a excluir a possibilidade de verdadeiras diferenças inter-grupos (com-CVO *versus* sem-CVO) serem mascaradas pela presença de indivíduos mais jovens (e portanto expostos durante menos tempo ao genótipo SS) no grupo de pacientes sem-CVO, sub-dividimos este último num sub-

QUADRO 1: GENOTIPAGEM DOS DOENTES DREPANOCÍTICOS E DE UM GRUPO DE INDIVÍDUOS SEM DREPANOCITOSE DE UMA POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA NOS *LOCI MTHFR* E *PAI-1*

Fenótipo clínico	n	Genótipo n (%)					
		<i>MTHFR</i> (C677T)			<i>PAI-1</i> (promotor 5G/4G)		
		C/C	C/T*	T/T*	5G/5G	5G/4G*	4G/4G*
Sem drepanocitose, nem HbS							
População de referência	126	96 (76)	28 (22)	2 (2)	59 (47)	58 (46)	9 (7)
Com drepanocitose	140						
Sem-CVO	99	79 (80)	17 (17)	3 (3)	67 (68)	26 (26)	6 (6)
Sem-CVO-1	52	42 (81)	8 (15)	2 (4)	36 (69)	14 (27)	2 (4)
Sem-CVO-2	47	37 (79)	9 (19)	1 (2)	31 (66)	12 (26)	4 (8)
Com-CVO	41	35 (86)	5 (12)	1 (2)	23 (56)	17 (42)	1 (2)
STA	24	20 (83)	3 (13)	1 (4)	12 (50)	11 (46)	1 (4)

CVO, Complicação vaso-oclusiva. CVO-1 e CVO-2, doentes com média de idades de 3,7±1,8 e 15,0±7,1 ano, respectivamente. STA, Síndrome torácica aguda. A definição dos vários grupos fenotípicos encontra-se nas secções de Métodos e Resultados. Os símbolos \* e # assinalam as classes genotípicas que foram reunidas para se proceder à análise estatística.

grupo (sem-CVO-1) de doentes mais novos (3,7±1,8 ano; n=52) e num outro sub-grupo (sem-CVO-2) cuja média de idades (15,0±7,1 ano; n=47) não diferia significativamente da do grupo com-CVO. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem-CVO-1 e sem-CVO-2 no que respeita à distribuição genotípica nos *loci MTHFR* e *PAI-1* (Quadro 2). Optámos, então, por comparar apenas as distribuições genotípicas entre os grupos

com-CVO e sem-CVO independentemente da variável idade. Apesar de não atingir significância estatística, notámos uma tendência (OR=1,6) para um aumento do risco de CVO no grupo de pacientes com 1 ou 2 cópias do alelo *PAI-1* 4G, cuja expressão resulta numa diminuição da actividade fibrinolítica. Esta tendência era ligeiramente mais acentuada (OR=2,1) se a síndrome torácica aguda fosse a única CVO a ser considerada (Quadro 3 e Figura 1).

QUADRO 2: SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DAS DIFERENÇAS NA DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA NOS *LOCI MTHFR* E *PAI-1* E *ODDS-RATIO* (OR) ENTRE INDIVÍDUOS DREPANOCÍTICOS (SS) ESTRATIFICADOS POR IDADES

Locus	Comparação	Sem-CVO-1 (3,7±1,8 ano; n=52) <i>versus</i> Sem-CVO-2 (15,0±7,1 ano; n=47)		
		$\chi^2$	OR	IC
<i>MTHFR</i> C677T		0,800	1,14	0,43-3,04
<i>PAI-1</i> 4G		0,728	1,16	0,50-2,7

$\chi^2$  (1 grau de liberdade)<sub>0,05</sub> = 3,84. IC, Intervalo de confiança do OR (p=0,95).

QUADRO 3: SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DAS DIFERENÇAS NA DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA NOS *LOCI MTHFR* E *PAI-1* E OR ENTRE INDIVÍDUOS DREPANOCÍTICOS (SS) COM- E SEM-CVO

Locus	Comparação	Sem-CVO (n=99) <i>versus</i> Com-CVO (n=41)			Sem-CVO (n=99) <i>versus</i> STA (n=24)		
		$\chi^2$	OR	IC	$\chi^2$	OR	IC
<i>MTHFR</i> C677T		0,441	0,68	0,25-1,84	0,695	0,79	0,24-2,57
<i>PAI-1</i> 4G		0,193	1,64	0,78-3,46	0,105	2,09	0,85-5,16

$\chi^2$  (1 grau de liberdade)<sub>0,05</sub> = 3,84. IC, Intervalo de confiança do OR (p=0,95). STA, síndrome torácica aguda.

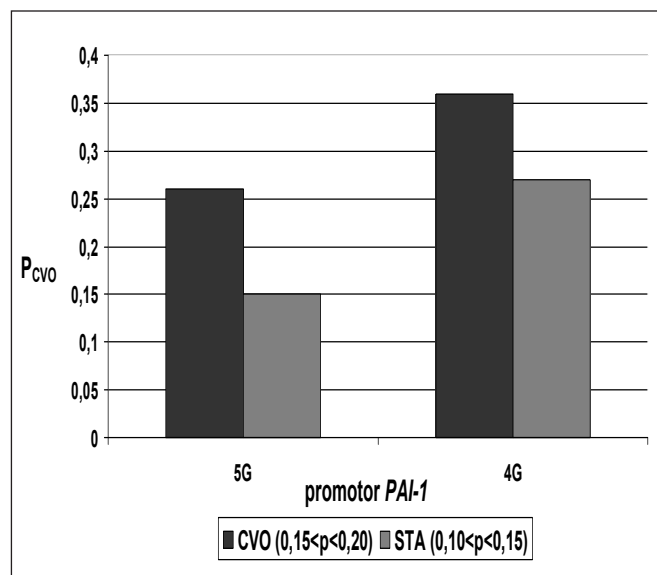


Figura 1: Probabilidade de uma complicação vaso-oclusiva grave ( $P_{CVO}$ ) em doentes drepanocíticos em função do seu genótipo *PAI-1* (promotor 4G/5G). 5G, Genótipo 5G/5G. 4G, Genótipos 5G/4G ou 4G/4G. STA, Síndrome torácica aguda. Na caixa sob a figura estão indicadas as probabilidades de significância estatística das diferenças observadas entre os dois grupos genotípicos. Em ambas as comparações as diferenças não são significativas ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O estudo aqui apresentado visava investigar a associação entre a variação genotípica, em genes envolvidos na manutenção da homeostase da fluidez da circulação sanguínea (*F2*, *F5*), fibrinólise (*PAI-1*) ou metabolismo da homocisteína (*MTHFR*), e a ocorrência de complicações vaso-oclusivas graves em doentes drepanocíticos de origem africana.

A análise genotípica efectuada sugeriu uma predisposição para CVO grave, em particular a síndrome torácica aguda, nos indivíduos portadores do alelo 4G na região do promotor do gene *PAI-1*. Estudos anteriores haviam posto em evidência, por exemplo através da determinação do tempo de lise do coágulo de euglobulina, um significativo abaixamento da actividade fibrinolítica nos drepanocíticos com CVO<sup>11-13</sup>. Estes achados apoiam a nossa sugestão de que um maior risco de CVO pode resultar, *inter alia*, do reforço da expressão do *PAI-1* com o concomitante reforço da inibição da activação do plasminogénio conduzindo, por essa via, à diminuição da capacidade de dissolução dos polímeros de fibrina que se depositam na parede interna dos vasos<sup>14,15</sup>. No entanto, nem sempre se tem observado um aumento de risco trombótico associado a uma diminuição da fibrinólise<sup>16,17</sup>.

Para confirmar estas sugestões e delinear um perfil multi-locus de susceptibilidade para CVO graves com significado para o prognóstico clínico, será necessário constituir uma série de pacientes clinicamente bem caracterizados de muito maior dimensão daquela a que tivemos acesso para a realização deste estudo. Tal série poderá ser obtida ou através da agregação de dados obtidos em diferentes populações de baixa prevalência de drepanocitose ou, com vantagem, através do recrutamento de pacientes numa única (e mais homogênea) população de elevada prevalência e, de preferência, beneficiando de um programa de rastreio neo-natal da doença (estudo de coorte).

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através do contrato de investigação IME/MGI/49853/ 2003.

## REFERÊNCIAS

1. Kurantsin-Mills J, Ofosu FA, Safa TK, Siegel RS, Lessin LS. Plasma factor VII and thrombin-antithrombin III levels indicate increased tissue factor activity in sickle cell patients. *Br J Haematol*. 1992;81:539-44.
2. Ataga KI, Key NS. Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;2007:91-6.
3. Andrade FL, Annichino-Bizzacchi JM, Saad ST, Costa FF, Arruda VR. Prothrombin mutant, factor V Leiden, and thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase among patients with sickle cell disease in Brazil. *Am J Hematol*. 1998;59:46-50.
4. Cumming AM, Olujuhunge A, Keeney S, Singh H, Hay CR, Serjeant GR. The methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism in patients with homozygous sickle cell disease and stroke. *Br J Haematol*. 1999;107:569-71.
5. Moreira Neto F, Lourenço DM, Noguti MA, Morelli VM, Gil IC, Beltrão AC, Figueiredo MS. The clinical impact of *MTHFR* polymorphism on the vascular complications of sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:1291-5.
6. Adams GT, Snieder H, McKie VC, Clair B, Brambilla D, Adams RJ, Kutlar F, Kutlar A. Genetic risk factors for cerebrovascular disease in children with sickle cell disease: design of a case-control association study and genomewide screen. *BMC Med Genet*. 2003;4:6.
7. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
8. David D, Moreira I, Lalloz MRA, Rosa HAV, Schwaab R, Morais S, Diniz MJ, de Deus G, Campos M, Lavinha J, Johnson D, Tuddenham EGD. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinol*. 1994;5:257-64.

9. Moreira I, Gago T, Crespo F, David D. Multiplex PCR-SSCP screening of potential genetic risk factors in a group of Portuguese patients with venous thrombosis. 16th International Congress on Thrombosis, Porto. Haemostasis. 2000;30 (Suppl 1).
10. Bunge S, Fuchs S, Gal A. Simple and non-isotopic methods to detect unknown gene mutations in nucleic acids. In: Adolph KW, editor. Methods in Molecular Genetics. San Diego: Academic Press, 1996:26-39.
11. Nsiri B, Gritli N, Mazigh C, Ghazouani E, Fattoum S, Machghoul S. Fibrinolytic response to venous occlusion in patients with homozygous sickle cell disease. Hematol Cell Ther. 1997;39:229-32.
12. Aluoch JR. Fibrinolytic activity in adult Kenyan patients with sickle cell disease. East Afr Med J. 1998;75:351-2.
13. Akinyoola AL, Adediran IA, Asaley CM, Bolarinwa AR. Risk factors for osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease. Int Orthop. 2008 Jul 17.
14. Kaplan KL, Bini A, Fenoglio J Jr, Kudryk B. Fibrin and the vessel wall. Adv Exp Med Biol. 1990;281:313-8.
15. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. Blood. 2000;95:1517-32.
16. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. Thromb Res. 2008;122(6):736-42.
17. Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR, Lisman T. Fibrinolysis and the risk of venous and arterial thrombosis. Curr Opin Hematol. 2007;14:242-8.

---

AUTORES: I Moreira<sup>1</sup>, P Faustino<sup>1</sup>, I Picanço<sup>1</sup>, R Martins<sup>1</sup>, A Morais<sup>2</sup>, A Dias<sup>3</sup>, I Soares<sup>4</sup>, C Rolão<sup>5</sup>, JL Ducla-Soares<sup>5</sup>, L Braga<sup>6</sup>, D David<sup>1</sup>, J Lavinha<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa; <sup>2</sup>Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria (HSM), Lisboa; <sup>3</sup>Serviço de Pediatria, Hospital Fernando Fonseca, Amadora; <sup>4</sup>Serviço de Pediatria, Hospital Garcia de Orta, Almada; <sup>5</sup>Serviço de Medicina I-D, HSM, Lisboa; <sup>6</sup>Serviço 1 – Medicina, Hospital Dona Estefânia, Lisboa, Portugal

*Correspondência:* Dr. João Lavinha, Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Av Padre Cruz 1649-016 Lisboa (Portugal).

E-mail: joao.lavinha@insa.min-saude.pt