

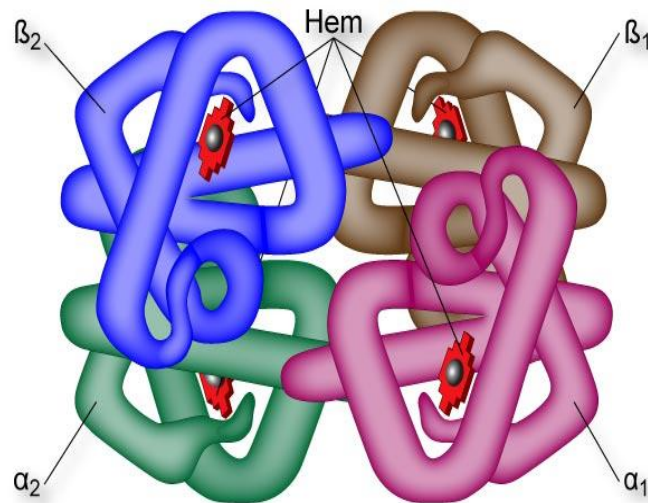
Workshop
O papel da Genética Humana na Saúde Pública
INSA, 8 de Outubro de 2012

Investigação em doenças mendelianas: o exemplo das **Hemoglobinopatias** e da **Hemocromatose Hereditária**

Paula Faustino
Unidade de Investigação e Desenvolvimento
Departamento de Genética Humana
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge



A Hemoglobina e as Hemoglobinopatias



Molécula de Hb A = $\alpha_2\beta_2$



Glóbulos Vermelhos

Hemoglobinopatias

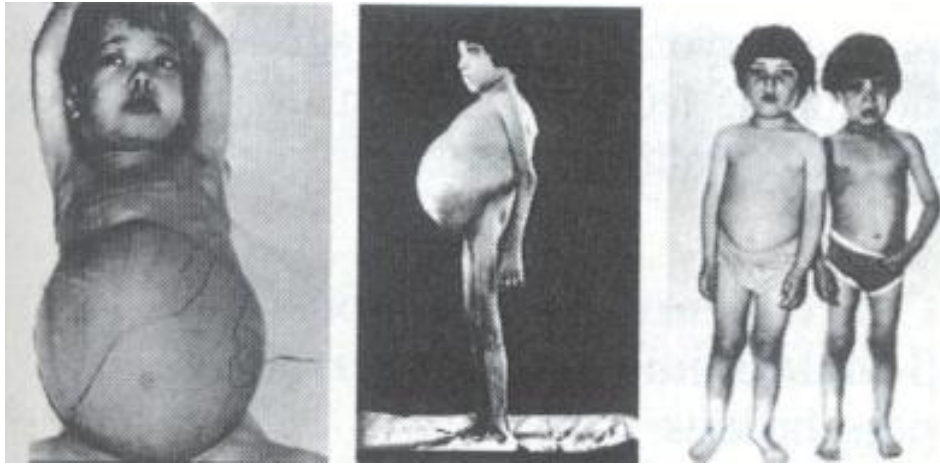
Quantitativas - Talassémias

ausência ou diminuição de síntese de uma cadeia globínica, ex: β -talassémia, α -talassémia, a Persistência Hereditária de Hb F.

Qualitativas - Variantes da Hemoglobina

resultantes da alteração da estrutura de uma cadeia globínica, ex: Hb S (drepanocitose), Hb C, Hb D, etc.

As hemoglobinopatias do tipo quantitativo: exemplo da β -talassémia



• Talassémia Major

- 2 genes *HBB* afetados (indivíduo homozigótico ou composto heterozigótico)
- Anemia muito grave, dependente de transfusões
- Esplenomegália e Hepatomegália
- Deformações ósseas
- Eritropoiese extramedular
- Sobrecarga em ferro – tratamento com quelantes do ferro
- Manifestação em tenra idade
- Fatal

Base molecular:
mutações/deleções/inserções nos genes da beta-globina (*HBB*) ou nas suas regiões regulatórias

• Talassémia Minor ou traço talassémico

(1 gene *HBB* afetado; ind. heterozigótico)

O indivíduo é clinicamente assintomático.

Apresenta um quadro hematológico típico:

GV \uparrow

VGM < 80 fL (microcitose)

HGM < 27 pg (hipocromia)

HbA2 $> 3,5\%$

As hemoglobinopatias do tipo qualitativo: exemplo da drepanocitose ou anemia das células falciformes

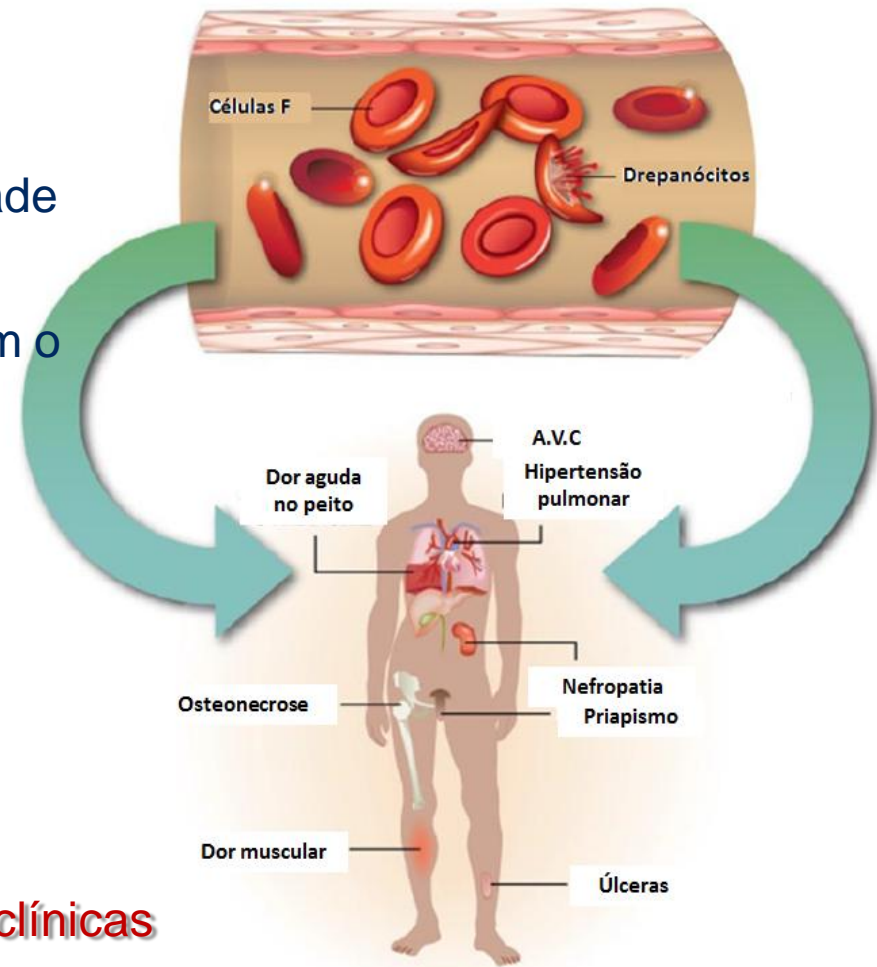
Base molecular: Uma só mutação no gene da beta-globina; codão 6
GAG>GTG; HBB:c.20A>T (Ac. Glutâmico > Valina) → Hb S

A Hb S produz efeitos deletérios porque, em desoxigenação, há redução da sua solubilidade e ocorre polimerização.

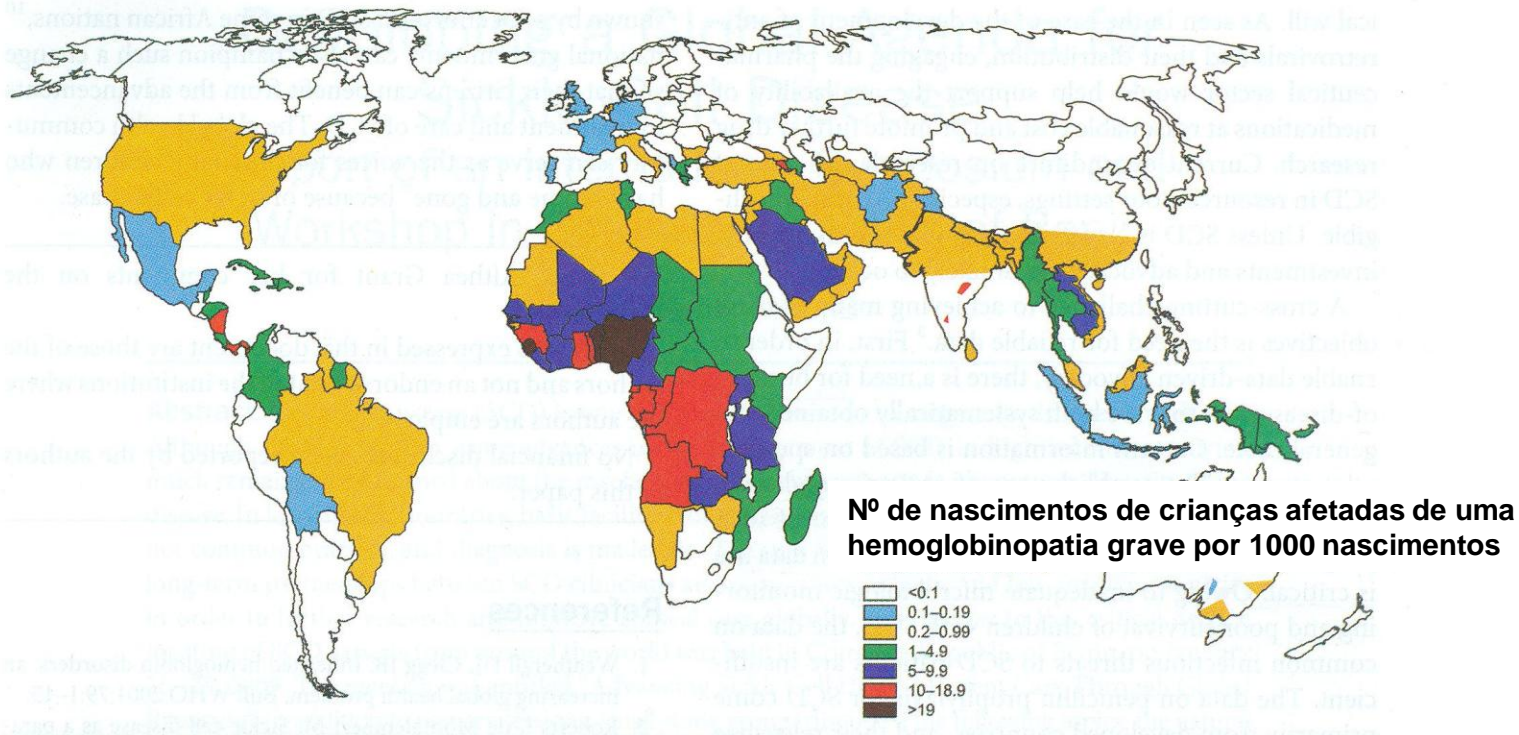
Formam-se grandes polímeros que deformam o GV em forma de foice = **drepanócitos**

- **Anemia hemolítica crônica** caracterizada por
 - hemólise crônica,
 - eventos recorrentes de vaso-oclusão,
 - infecções,
 - conseqüente falha de órgão

➤ **Grande variabilidade nas manifestações clínicas**



As hemoglobinopatias no mundo

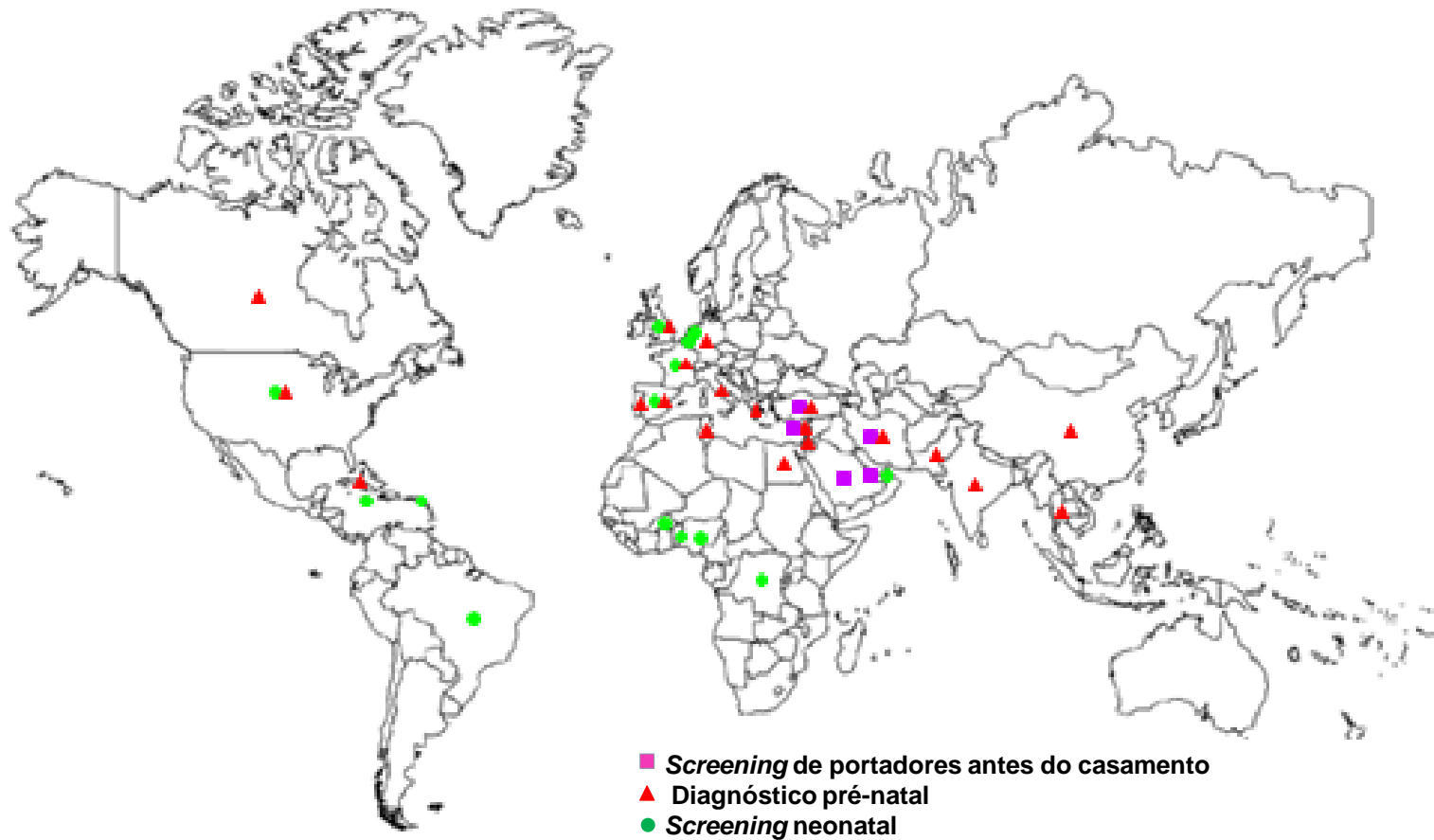


Distribuição mundial das hemoglobinopatias (fonte: OMS)

As hemoglobinopatias constituem **o grupo de patologias genéticas mais comuns nas populações humanas.**

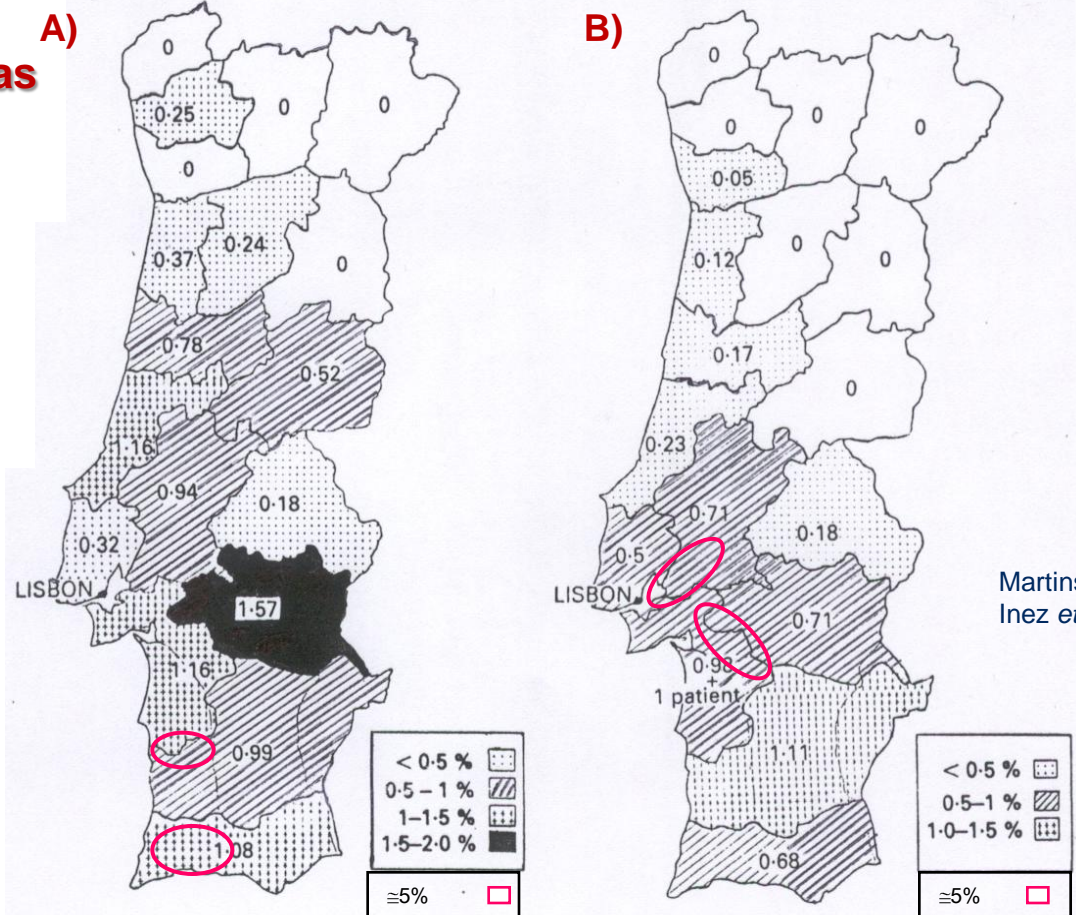
Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de **250 milhões de pessoas** em todo o Mundo são portadoras de algum tipo de hemoglobinopatia.

Programas de controlo das hemoglobinopatias no Mundo



As hemoglobinopatias em Portugal

Prevalência de portadores
A) de β -talassémia (%) e
B) de drepanocitose (%)



Martins *et al*, J Med Genet 1993 e Inez *et al*, Arq INSA 1993

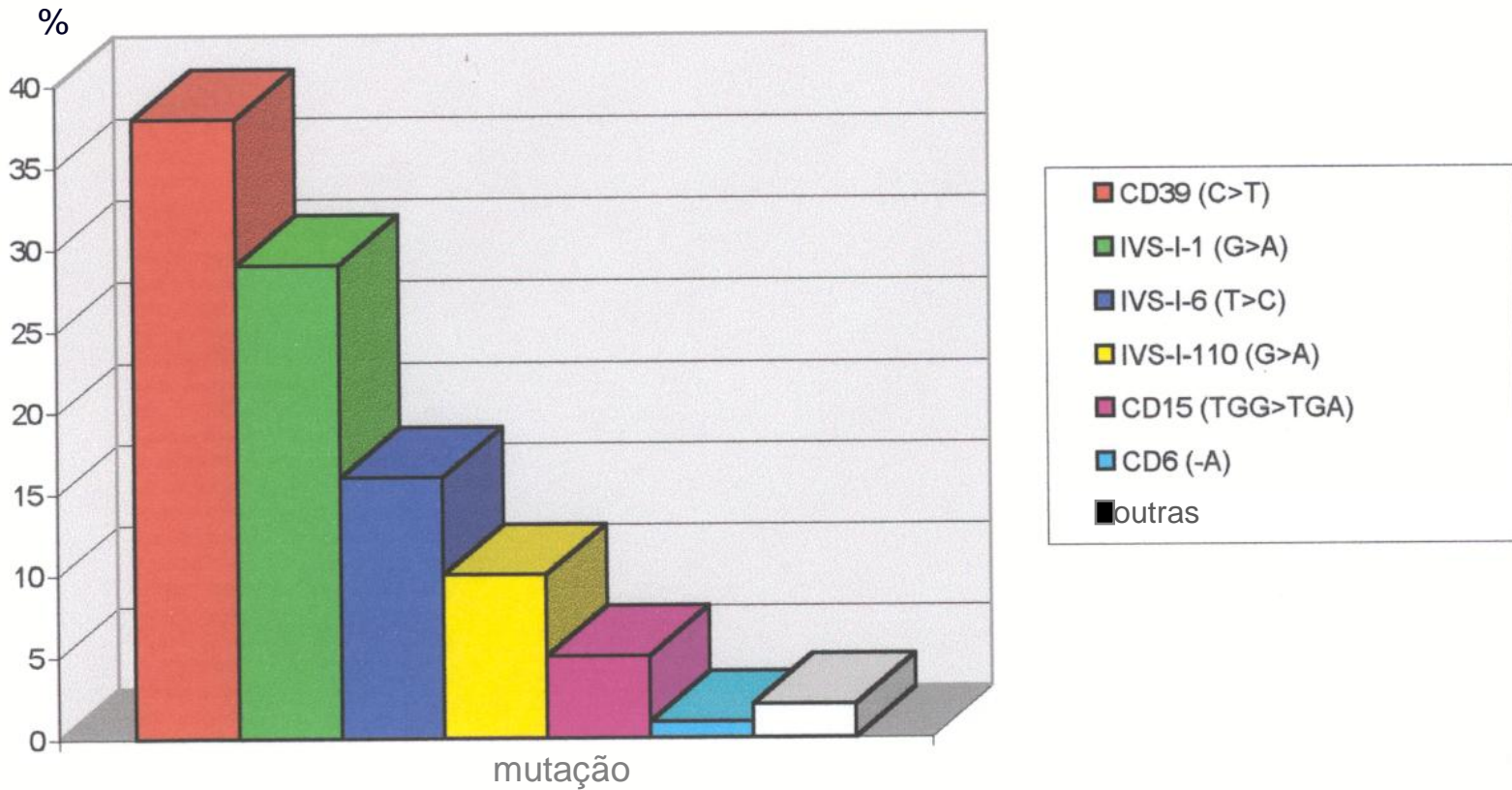
A prevalência de portadores de Hemoglobinopatia aumenta de norte para sul (onde alguns distritos atingem uma prevalência conjunta para as duas patologias superior a **2%**). Há áreas restritas onde a prevalência de portadores é bastante mais elevada (cerca de **5%**) assim como nas populações imigrantes dos PALOPs.

Estimasse que a Incidência à nascença de formas graves da doença (SS, S β -tal; β -tal/ β -tal): 5-10 novos casos /ano.

O nº de doentes drepanocíticos é aproximadamente de 600.

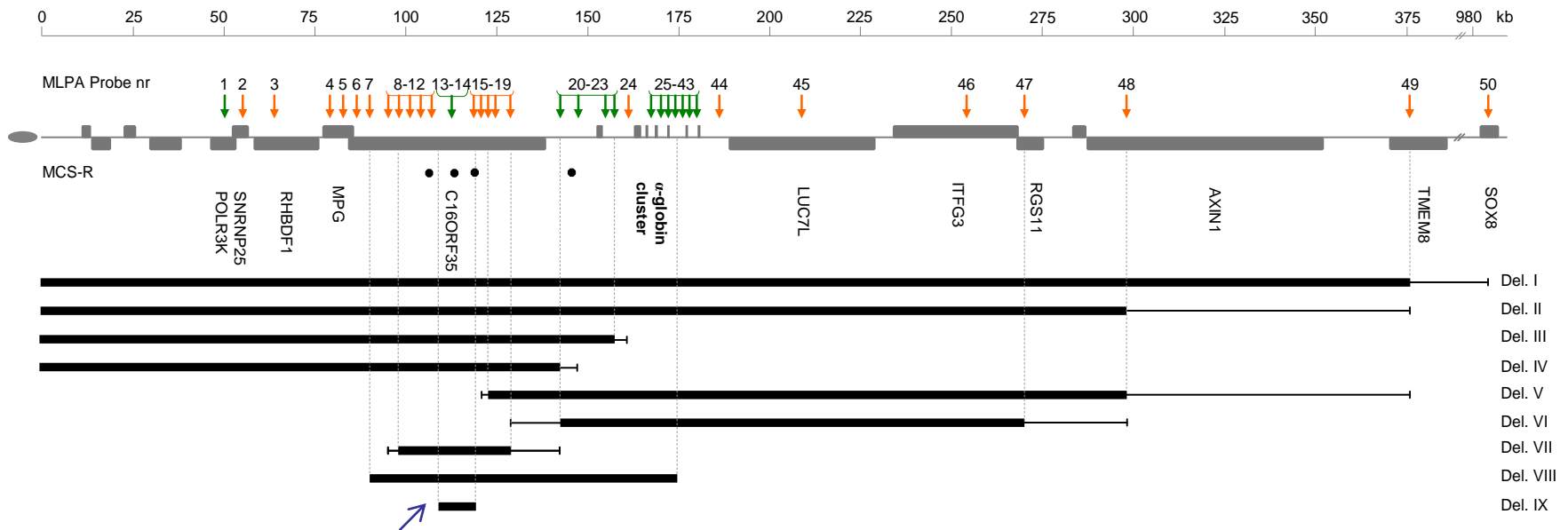
O nº de doentes talassémicos graves é aproximadamente de 40.

Frequência relativa das mutações β -talassémicas em Portugal



Pesquisa de grandes deleções nos agrupamento génicos globínicos

por *multiplex ligation probe dependent amplification (MLPA)*

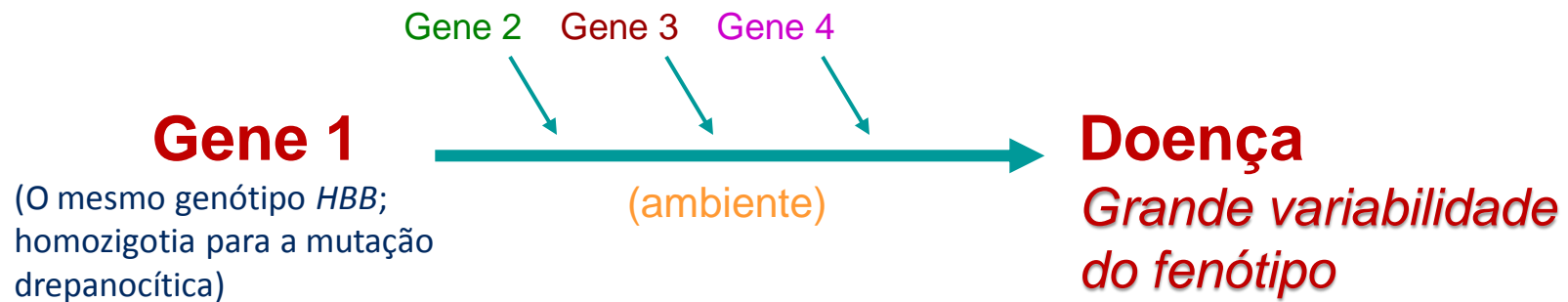


- Pesquisa de grandes deleções/inserções
- Caracterização funcional das novas lesões

Exemplo:

Descoberta um nova deleção de 3,3 kb (em homozigotia) que remove uma região regulatória distal a qual se pensava ser crucial e imprescindível para a expressão dos genes a jusante e para a regulação da expressão diferencial destes genes ao longo do desenvolvimento → estudos funcionais → aumento do conhecimento sobre a **fisiopatologia** da doença.

Drepanocitose – doença monogénica sob controlo poligénico

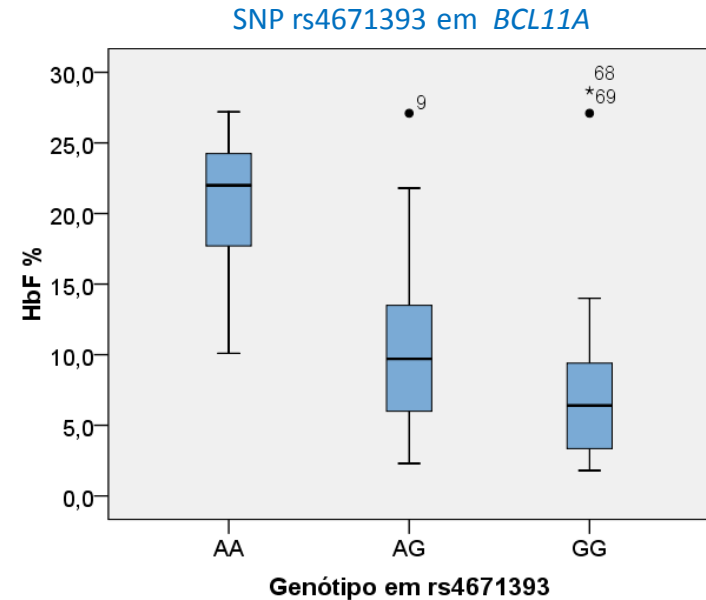
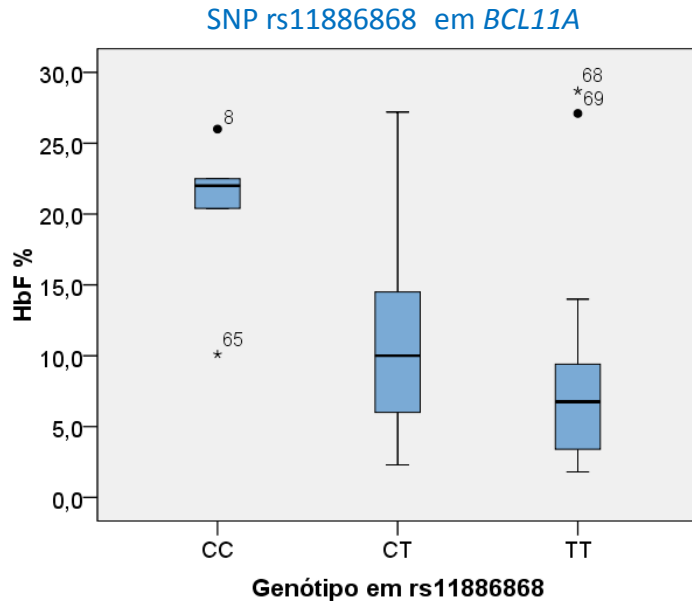


Objectivos:

- Identificar modificadores genéticos e caracterizar o seu modo de ação
- Identificar riscos de desenvolver certos endofenótipos
- Identificar novos marcadores de prognóstico

Fatores modificadores do fenótipo da drepanocitose

Níveis elevados de Hb Fetal



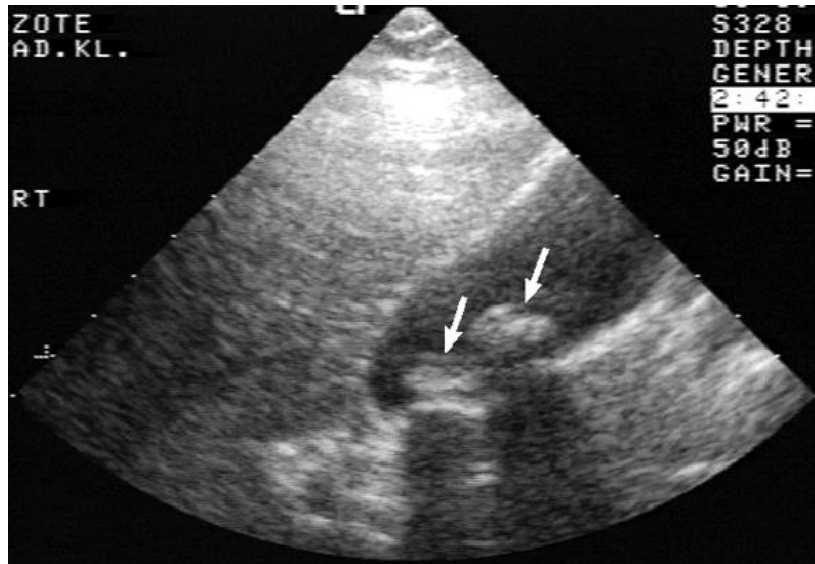
Estudámos vários genes possíveis moduladores da expressão da Hb F (*HBG2*, *HBG1*, *BCL11A*, *HBS1L-MYB*). Foi encontrada associação positiva entre os alelos C do SNP rs11886868 e o alelo A do SNP rs4671393 no gene *BCL11A* e o nível elevado de Hb F.

Co-herança de níveis elevados de Hb F com drepanocitose

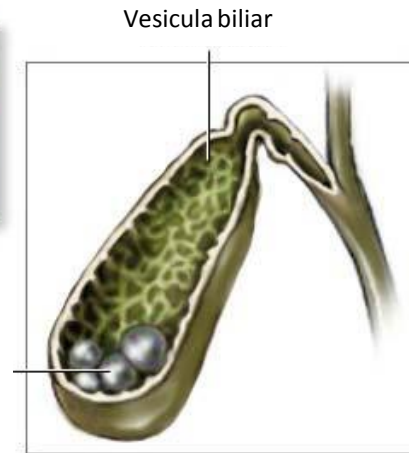
>>> O principal agente modificador da doença

- Menor morbidade e mortalidade
- Este conhecimento foi usado para o **tratamento** da doença (O medicamento **Hidroxiureia** >> aumento de Hb F >> melhoria dos sintomas, maior sobrevivência)

Efeito do polimorfismo de repetição (TA)₅₋₈ no promotor do gene *UGT1A1* na modulação do fenótipo drepanocítico



Cálculos biliares



Concluimos que o polimorfismo de repetição (TA)₅₋₈ no promotor do gene *UGT1A1* é um importante modificador do fenótipo da drepanocitose, **aumentando o risco de hemólise, hiperbilirrubinémia,** tendência a desenvolver **colecistite** e a realizar **colecistectomia**.



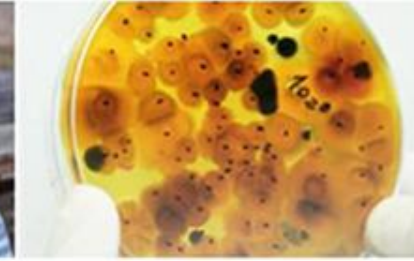
Investigação em Hemoglobinopatias / Saúde Pública

Permitiu conhecer a população em termos de epidemiologia molecular

Permitiu implementar um programa de prevenção

Permite:

- a identificação e caracterização de genótipos/fenótipos raros
- a realização de estudos funcionais o que aumenta o conhecimento sobre a fisiopatologia da doença
- identificar e compreender o modo de ação de fatores modificadores das manifestações clínicas
- identificar biomarcadores de prognóstico
- aplicar os conhecimentos para uma melhoria das estratégias terapêuticas e do diagnóstico



A Hemocromatose Hereditária e a Saúde Pública



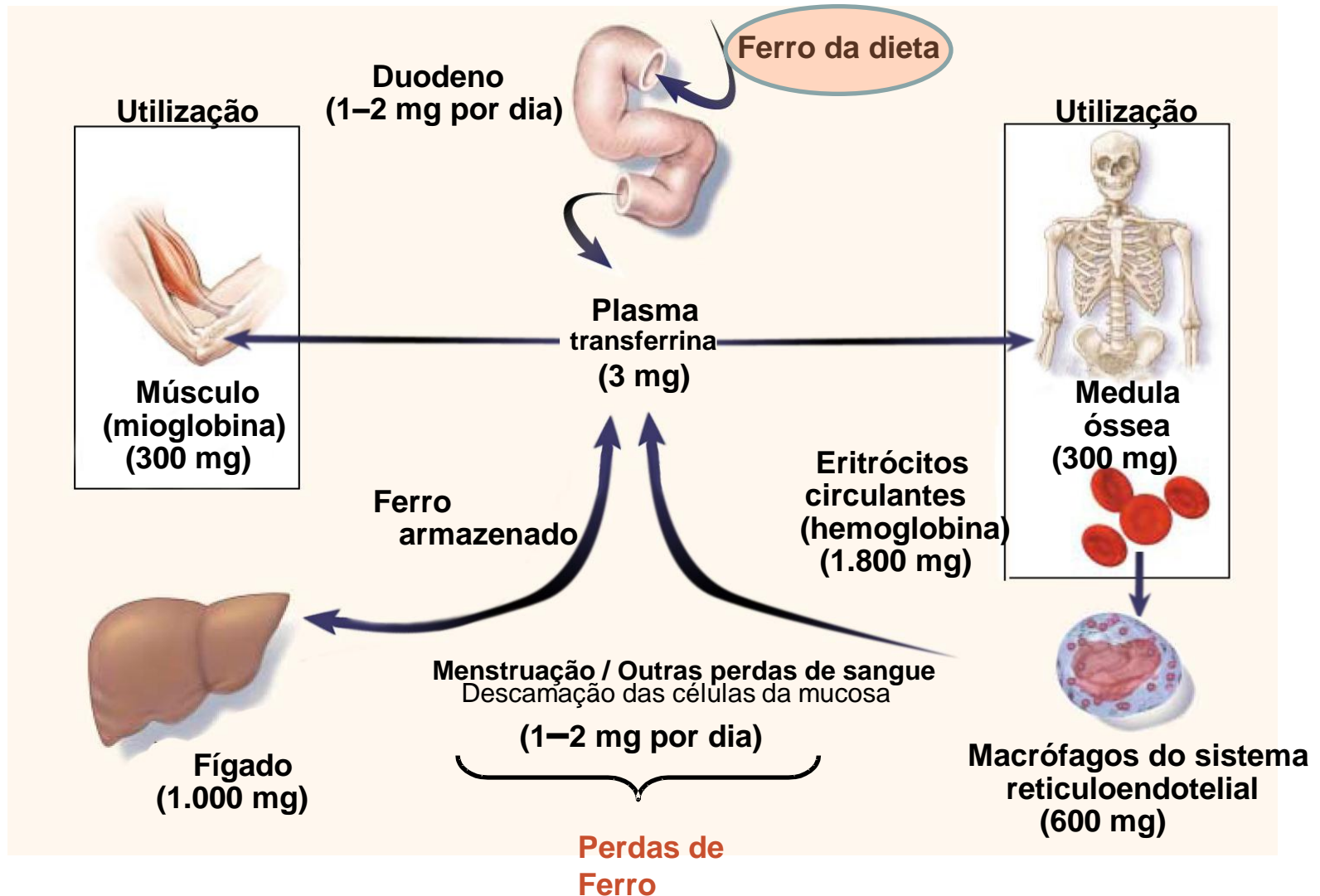
A Hemocromatose

- Patologia descrita no sec. XIX, à qual se deu o nome de “hemocromatose”. Apresentação do doente: diabetes, pigmentação bronze acinzentada da pele, cirrose. **Causa desconhecida.**
- Em 1935 tornou-se evidente que se tratava de uma doença devida a **depósitos de ferro** nos órgãos mas só mais tarde em 1970-80 foi reconhecida como uma **doença genética de transmissão autossómica recessiva** e foi denominada Hemocromatose Hereditária (HH).
- Em 1996 foi identificado o gene associado à patologia (**gene HFE**; *High Fe*; 6p21.3; Feder *et al*, 1996)
- Foi verificado que a grande maioria dos doentes HH apresentavam homozigotia para uma mutação no gene *HFE*: c.845G>A; **p.C282Y**
- Mais raramente eram descritos doentes HH devido a heterozigotia composta para a mutação C282Y e uma outra mutação também no gene *HFE* c.187C>G; **p.H63D**

Hemocromatose Hereditária – características da doença

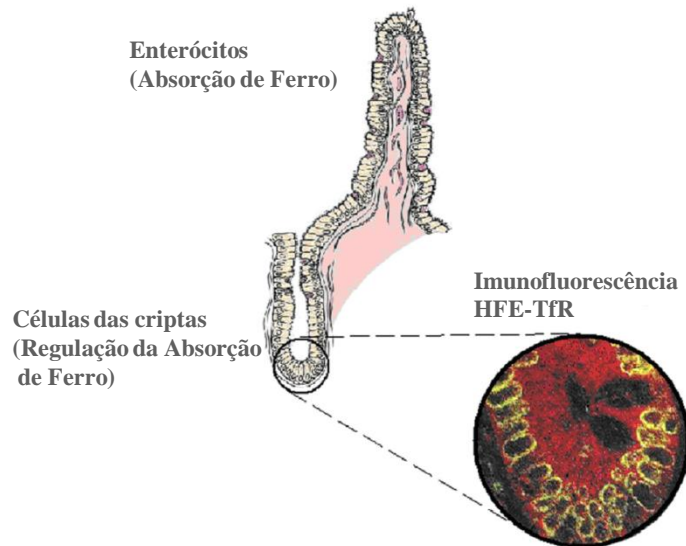
- A doença caracteriza-se por um **aumento da absorção a nível intestinal do ferro ingerido na alimentação**, com conseqüente acumulação em vários órgãos, especialmente **fígado, coração e pâncreas**.
- Os sintomas iniciam-se geralmente na meia idade (40-60 anos) e começam por consistir em sintomas gerais de fadiga e dores articulares.
- A doença hepática desenvolve-se mais tardiamente: **hepatomegália, cirrose e carcinoma hepatocelular**
- **Cardiomiopatias e arritmias**
- Frequentemente surge acompanhada de doenças endócrinas como **diabetes**, hipogonadismo hipogonadotrófico, impotência.
- A doença afeta mais homens que mulheres.
- A doença se não for tratada (flebotomias) pode levar à **morte**.

Distribuição e armazenamento do ferro no organismo



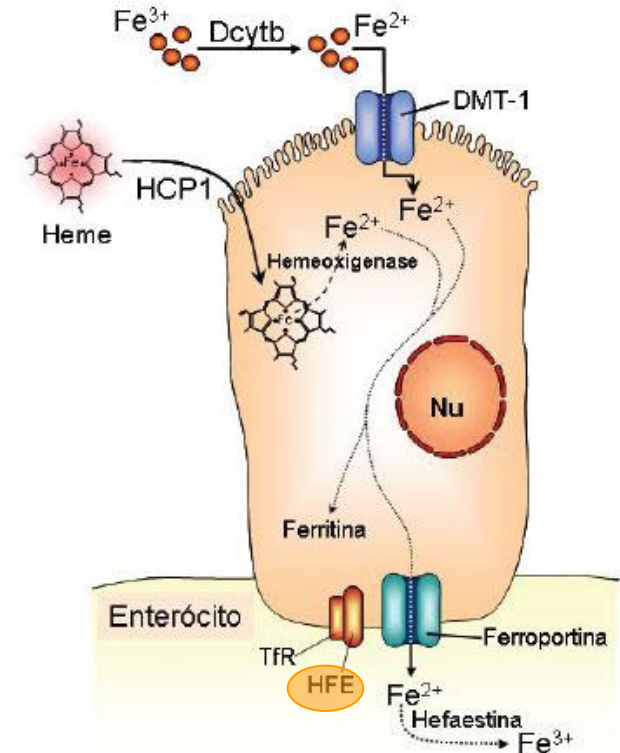
O papel da HFE na Homeostase do Fe

I) NO DUODENO - Papel modelador na absorção de ferro proveniente da alimentação



A **HFE wild-type** localiza-se no duodeno, nas células das criptas, co-localizando-se com o receptor da transferrina (TfR) e tem um papel modulador da absorção intestinal do ferro proveniente da alimentação.

Em caso de **HFE_C282Y** há uma absorção aumentada e desregulada do ferro proveniente da alimentação

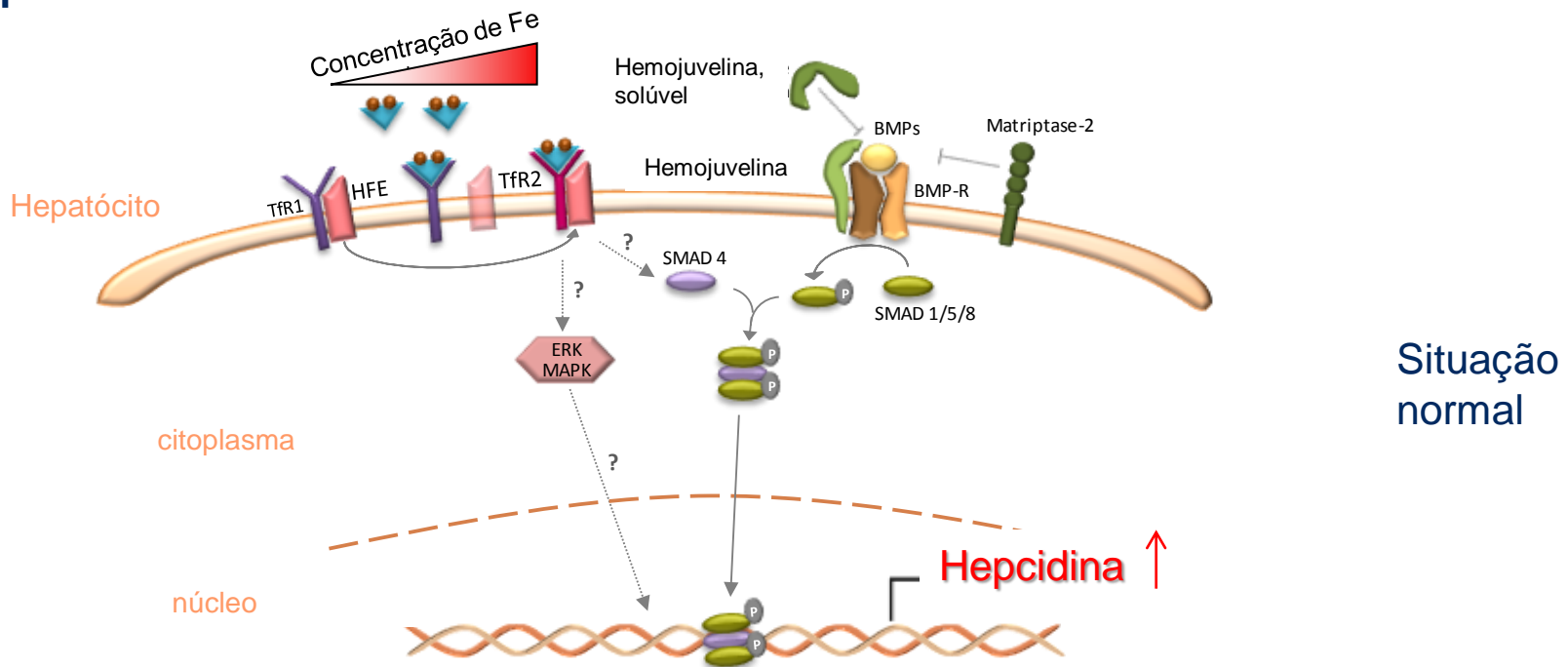


O papel da HFE na Homeostase do Fe

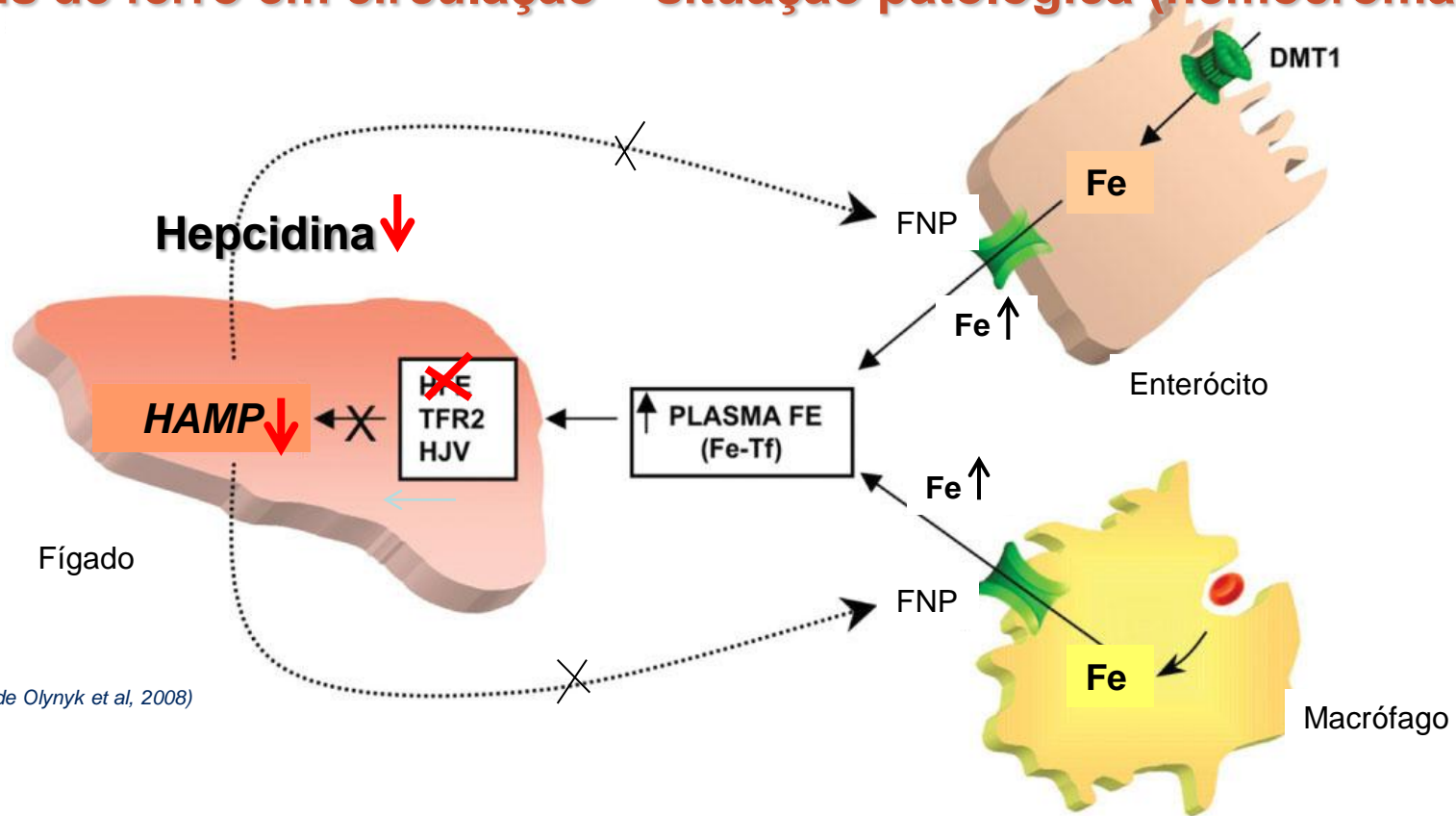
II) NO HEPATÓCITO DO FÍGADO - papel modelador da expressão da hepcidina

A **HFE *wild-type*** localiza-se à superfície dos hepatócitos e regula a síntese da hepcidina em função dos níveis de Fe no organismo

Em caso de **HFE_C282Y** não há apresentação da proteína à superfície do hepatócito e consequentemente não há estimulação do gene *HAMP* perante um aumento de Fe no organismo. Assim, **os indivíduos com hemocromatose hereditária apresentam níveis de hepcidina muito baixos.**



Consequência da ausência de resposta da hepcidina aos elevados níveis de ferro em circulação – situação patológica (hemocromatose)



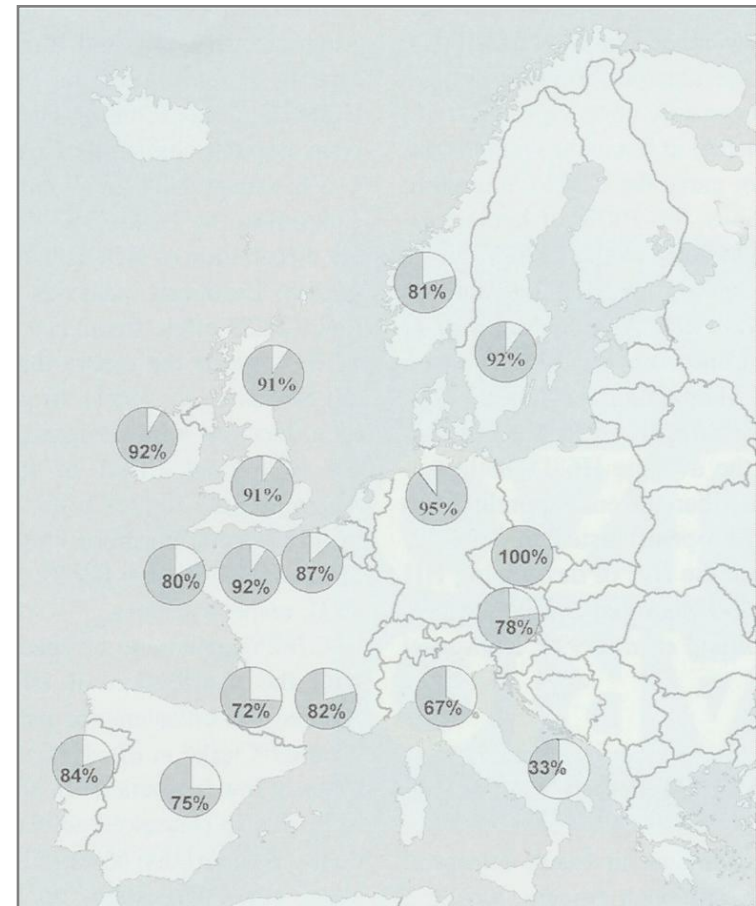
(Adaptado de Olynyk et al, 2008)

Perante um excesso de Fe em circulação a **HFE_C282Y** não estimula a síntese da hepcidina. A consequência da hepcidina baixa é a não degradação da ferroportina pelo que continua a haver mais entrada de ferro para a circulação, tanto proveniente da alimentação (via enterócitos) como da reciclagem dos GV senescentes pelos macrófagos.

Os doentes com HH apresentam níveis baixos de hepcidina, apesar de terem sobrecarga em ferro.

A Hemocromatose Hereditária na Europa

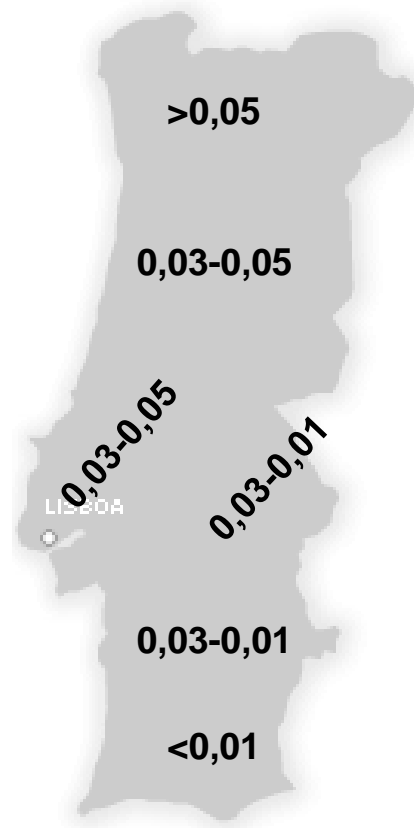
- A HH é uma das doenças genéticas mais comuns em caucasianos com ascendência norte Europeia.
- Cerca de **90%** dos doentes HH do norte da Europa possuem homozigotia para a mutação *HFE_C282Y*.
- Como resultado de uma meta-análise que envolveu 36 estudos efetuados em **vários países da Europa, USA e Austrália** e 127613 indivíduos foi determinada uma **frequência alélica da C282Y de 6,2%**.
(European association for the study of the liver. J Hepatol, 2010,doi 10.1016/j.jhep.2010.03.001)
- Na **Europa** a **frequência** do defeito em heterozigotia é de cerca de **1:15 (varia entre 1 e mais de 12%)** e a frequência genotípica estimada (homozigotia) é de **1:200 a 1:300**
- Nos **Estados Unidos da América** um rastreio (*Hemochromatosis and Iron Overload Screening, HEIRS*) realizado em 101168 participantes mostrou que **1 em 227** brancos eram homozigóticos para *HFE_C282Y*



Frequência da homozigotia para a mutação C282Y em doentes com HH;
Merrywether-Clarke et al, 2000

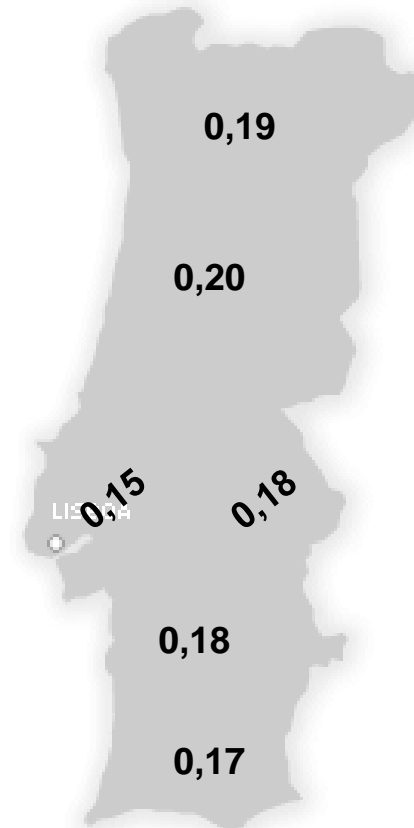
Distribuição geográfica em Portugal das frequências alélicas de C282Y e H63D no gene *HFE*

C282Y
(variação geográfica significativa)



A frequência alélica da **C282Y** é dependente da região analisada, **varia entre 1 e 5%**

H63D



A frequência alélica da **H63D** é independente da região analisada, **varia entre 15 e 20%**

Prevenção da HH – realizar *screening* geral à população?

- O ***screening* populacional** da HH-HFE é **teoricamente muito atrativo** mas não é recomendado (*Guidelines - European association for the study of the liver*)

Prós:

- É uma patologia muito prevalente e potencialmente fatal se não for tratada
- Há tratamento seguro, efetivo, e relativamente barato (flebotomias)
- Pode ser detetada, de um modo simples e barato, pelo doseamento da saturação da transferrina e ferritina e ainda por testes genéticos (pesquisa de duas mutações no gene *HFE*)

Contras:

- Os benefícios que daí adviriam (tratamento precoce e maior sobrevivência dos HH) terão de ser “pesados” contra as potenciais **repercussões negativas do diagnóstico – psicológicas, sociais, e legais** – especialmente na ausência de doença no presente.
- Em geral, a **expressividade clínica dos homozigóticos é muito baixa (penetrância baixa)**

HH - Penetrância

- Todos os indivíduos que têm os genótipos de risco estão **geneticamente predispostos** a desenvolverem uma cadeia de eventos que podem culminar com doença e dano de múltiplos órgãos mas, atualmente, é **impossível prever se, quando e em que extensão** a mutação será fenotipicamente expressa

>>> PENETRÂNCIA MUITO BAIXA

Só uma parte dos indivíduos C282Y/C282Y desenvolverão fenótipo:

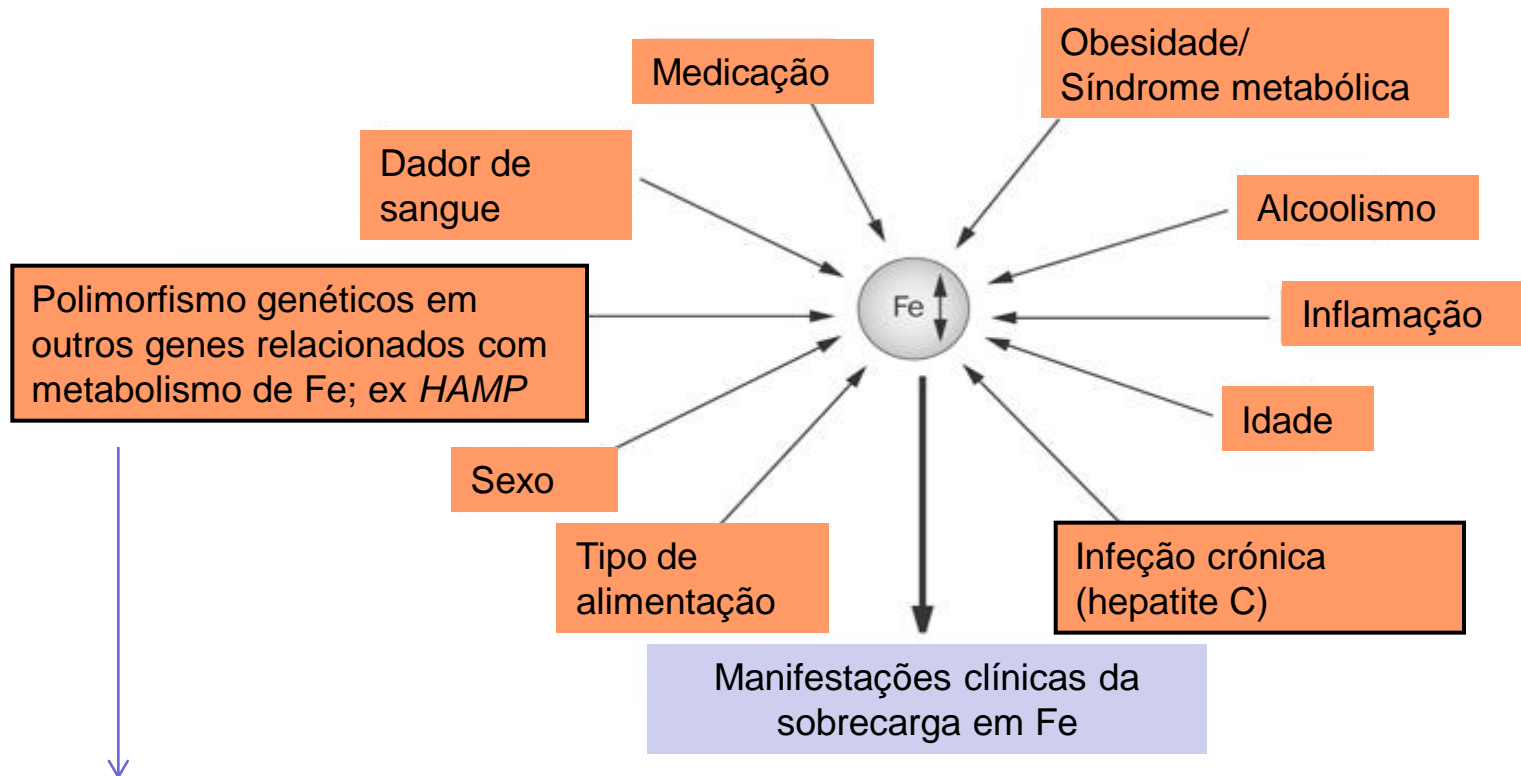
- **38 a 50 % desenvolverão sobrecarga em ferro** (observável pelos parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro)
- **10 a 33% desenvolverão doença** (esta irá desenvolver-se numa proporção muito maior de homens do que de mulheres).

E isto porquê?

Penetrância da HH tipo I

Modificadores genéticos e ambientais

- A HH evolui lentamente e a sua progressão pode ser acelerada ou atenuada por vários fatores tanto ambientais como genéticos



Outros genes envolvidos >>> outros tipos de hemocromatoses

Hemocromatoses herdadas e adquiridas

Classificação das hemocromatoses		Mutações nos genes:	Tipo de Hemocromatose Hereditária
Hemocromatose primária (hereditária)	Associada ao gene <i>HFE</i>	HFE: C282Y/C282Y C282Y/H63D	Hemocromatose tipo 1
	Não associada ao gene HFE	Hepcidina	Hemocromatose juvenil tipo 2
		Hemojuvelina	
		TfR2	Hemocromatose tipo 3
		Ferroportina	Hemocromatose tipo 4
Hemocromatose secundária (adquirida)	(eritropoiese ineficaz / hemólise crónica / múltiplas transfusões)		
	Talassémia major		
	Anemias sideroblásticas		
	Anemias hemolíticas crónicas		

A Hemocromatose Hereditária não-clássica em Portugal

A investigação sobre a hemocromatose hereditária não clássica revelou apenas um pequeno número de **mutações novas, raras ou privadas de uma ou poucas famílias:**

- **HFE:** S65C, E277K, V295A, L46W, D129N, Y138X e Y230F
- **TfR2:** I238M, IVS5-9T>A; F280L, R752H
- **HAMP:** 5'UTR -25G>A
- **HJV:** A310G, E275E; IVS2+395C>G, P124L
- **SL40A1**

(Mendes *et al*, Ann Hematol, 2009)

Algumas dessas alterações (HFE_E277K, _V295A, _Y138X e HAMP_5'UTR-25G>A) foram sujeitas a estudos de expressão génica sendo consideradas causadoras de patologia.

(Martins e Silva *et al*, PLoS One, 2011;

Silva *et al*, BJH, 2012; doi:10.1111/j1365-2141.2012)

As suas frequências na população portuguesa são muito baixas >>>
não estão indicadas para serem pesquisadas no diagnóstico clássico de HH

O diagnóstico de HH

(Guidelines - European association for the study of the liver)

1) Os testes bioquímicos de rastreio:

Dosagem de **ferritina sérica**.

Determinação da **saturação de transferrina** .

Suspeita de Hemocromatose:

- **Ferritina > 400 ng/mL** (1ng/mL=10mg de Fe armazenado)
- **Índice de Saturação da Transferrina > 50%**

[ST= Fe sérico/capacidade total de ligação ao Fe) x100]

2) Descartar causas de hiperferritinemia como alcoolismo crónico, inflamação, necrose, tumores, doença metabólica, etc

Em caso de aumento notório, persistente e não explicável daqueles parâmetros ou pertencer a um certos grupo populacional (familiares de doentes HH, doença hepática crónica, carcinoma hepatocelular, diabéticos do tipo 1, porfiria cutânea tarda, condrocalcinose) avançar para os testes genéticos.

3) Prosseguir com exame clínico-laboratorial e **genético**

Doseamento das enzimas hepáticas ; Avaliação cardíaca ; Testes hormonais

Biópsia hepática (mostrará hemossiderose)

Métodos de Imagem (ressonância magnética T2*)

Confirmação do diagnóstico pelos testes genéticos: pesquisa das mutação C282Y e H63D no gene *HFE* >>> **Os genótipos C282Y/C282Y ou C282Y/H63D confirmam o diagnóstico de HH tipo 1**

...

E quando o genótipo *HFE* não é de risco?

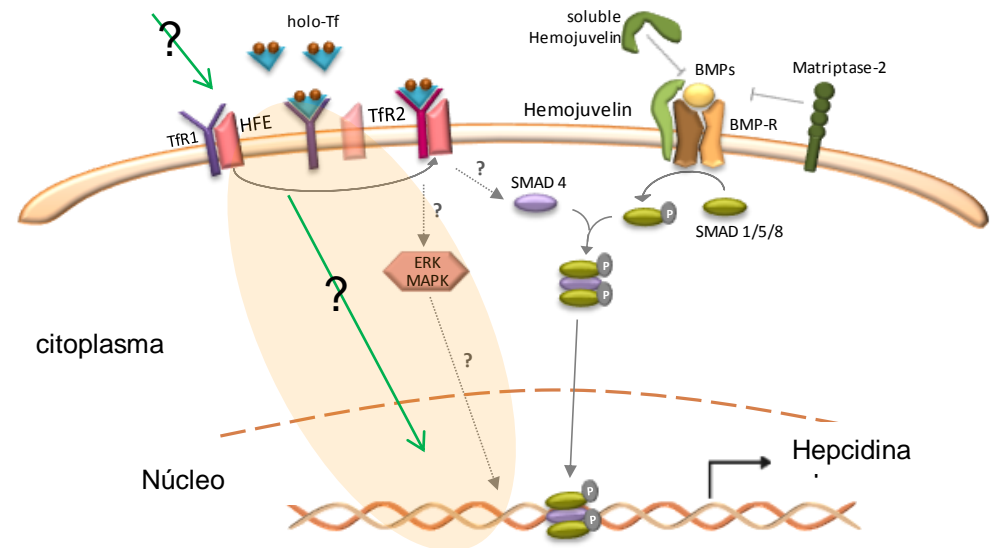
A investigação em HH / Saúde Pública

Permitiu conhecer **a prevalência das mutações comuns do gene *HFE*** na população portuguesa

Permitiu conhecer outras **causas de Hemocromatose Hereditária não clássica** na nossa população

A investigação em curso atualmente incide sobre os **mecanismos da doença** e poderá contribuir para a **melhoria do diagnóstico** e, eventualmente, permitir conceber novas estratégias terapêuticas.

Isoforma solúvel da HFE





Agradecimentos



Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

CIGMH e Pest-OE/SAU/UI0009/2011

PIC/IC/83084/2007

PTDC/SAU – GMG/64494/2006

IME/MGI/49853/2003