

Unidade Curricular Genética Molecular, Universidade do Algarve
8 de junho de 2022

Doenças hereditárias associadas a distúrbios no homeostase do ferro - do excesso ao défice

Paula Faustino, PhD

¹ Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA)
² Instituto de Saúde Ambiental (ISAMB), Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

A homeostase do ferro

O nosso organismo não possui a capacidade de excretar ferro, por isso a quantidade de ferro que existe no organismo é o resultado de um equilíbrio entre:

- **Absorção do ferro da alimentação** ao nível intestinal (no duodeno) que deverá colmatar as **perdas diárias** (por descamação das células do intestino, da pele, perdas sanguíneas, suor, etc.).
- **Reciclagem do ferro pelos macrófagos** (do sistema reticuloendotelial existentes sobretudo no baço) do ferro contido dos **Glóbulos Vermelhos senescentes**. O ferro que se encontrava ligado à hemoglobina fica novamente disponível para a formação de novos glóbulos vermelhos na eritropoiese.

Distribuição e armazenamento do ferro

Absorção do ferro pelos enterócitos no duodeno

Transporte do ferro do lúmen intestinal para os enterócitos:

- O transporte do Fe na forma hémica é realizado por intermédio da proteína transportadora dos grupos heme (HCP1).
- O transporte do Fe não-hémico (forma férrica Fe^{3+}) depende de um passo inicial de redução à forma ferrosa Fe^{2+} . Essa redução é feita por intermédio da proteína citocromo b duodenal (DCYTB), ou por outros agentes redutores ex. ác ascórbico. O Fe^{2+} é transportado para o interior dos enterócitos, via DMT1.
- O efluxo do Fe através da membrana baso-lateral para a corrente sanguínea é mediado pelo transportador **ferroportina-1 (FNP-1)** sendo o Fe^{2+} oxidado pela **hefastina** (na membrana) ou pela **ceruloplasmina** (no plasma), entrando na circulação na forma férrica (Fe^{3+}) ligado à **transferrina** (holotransferrina).

Figura 1. O enterócito e as células envolvidas na absorção do ferro. DCYTB: citocromo b; HCP1: proteína transportadora de grupos heme; HFE: proteína da hemocromatose; TR: receptor de transferrina.

Reciclagem do ferro pelos macrófagos

A fagocitose e degradação dos GV senescentes representam uma fonte importante de reciclagem do ferro (de 25 a 30 mg/dia).

- Os **macrófagos do baço e da medula óssea e as células de Kúpffer do fígado** reconhecem as modificações bioquímicas na membrana dos GVs senescentes (velhos). Essas alterações sinalizam para que o macrófago elimine essas células por **fagocitose**.
- A parte proteica da molécula de hemoglobina (as cadeias globínicas) vão sofrer reciclagem dos aminoácidos que vão ser aproveitados na síntese de novas proteínas.
- O catabolismo intracelular do **heme** envolve várias enzimas, como a **NADPH-citocromo C redutase**, a **hemoxigenase** e a **biliverdina redutase** e tem como produtos: a **bilirrubina**, o **ferro** e o **monóxido de carbono**.
- O Fe^{2+} (na forma ferrosa) pode ser armazenado no próprio macrófago na **ferritina** (proteína de armazenamento) ou ser exportado pela **ferroportina (FNP)**. Se acontecer a exportação, então o Fe^{2+} será oxidado pela ceruloplasmina a Fe^{3+} . Este é transportado pela **transferrina** até os locais onde será reutilizado, predominantemente medula óssea, onde participará da hemoglobinizacão de novos eritrócitos.

A hepcidina e a ferroportina

O controle da absorção do ferro nos enterócitos, da sua libertação pelos macrófagos, e da sua libertação dos depósitos nos **hepatócitos** é realizado pela hormona **hepcidina** - principal elemento regulador sistémico da homeostase do ferro.

A Hepcidina atua por ligação à **ferroportina FNP-1** (exportador de Fe) e promove a sua internalização e degradação.

Hepcidina - regulação da absorção do ferro ao nível do duodeno e reciclagem pelos macrófagos

A **hepcidina** é uma hormona sintetizada no fígado que regula (negativamente) os níveis de ferro no organismo. Liga-se à **ferroportina** (único exportador de Fe conhecido) e promove a sua internalização e degradação e, consequentemente, impede a entrada de ferro para a circulação proveniente da absorção (no enterócito) ou da reciclagem (nos macrófagos).

Adaptado de Finberg, 2013

Regulação da expressão do gene da hepcidina

Excesso de ferro no organismo ↑ Hepcidina
 Inflamação ↑ Hepcidina
 Infecção ↑ Hepcidina
 Anemia ↓ Hepcidina
 Hipóxia ↓ Hepcidina

HEPATÓCITO

A regulação na expressão da hepcidina pelos níveis de ferro no organismo – situação normal

O excesso de Fe em circulação origina um aumento da síntese da Hepcidina no fígado, através da estimulação da HFE, TFR2 e HJV na superfície dos hepatócitos. O aumento da Hepcidina em circulação origina, ao nível dos enterócitos, macrófagos e hepatócitos a internalização da ferroportina e impede assim o fluxo de mais ferro para a circulação.

(Adaptado de Olynyk et al., 2008)

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

Situações que levam à ausência de resposta de HAMP aos elevados níveis de Fe em circulação:

- mutações em HFE, TFR2 ou HJV
- mutações no gene HAMP
- mutações na FPN-1

(Adaptado de Olynyk et al., 2008)

Patologias devidas a sobrecarga em ferro

Como se diagnostica a sobrecarga em ferro?

Os testes bioquímicos de rastreio:

- 1-dosagem de **ferritina sérica**.
- 2-determinação do índice de **saturação de transferrina**

Suspeita bioquímica de Hemocromatose:

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

cálculo da saturação da transferrina= [Fe sérico (µg/dL) / CTF (µg/dL)] x 100

Outras análises complementares:

Outros biomarcadores séricos: **Ferro sérico**, **Capacidade Total de Fixação do Ferro**, **Transferrina**

Doseamento das enzimas hepáticas

Biópsia hepática (mostrará depósitos de ferro)

Métodos de Imagem (ressonância magnética T2*)

CAUSA? Adquirida ou Genética!

1) Hemocromatose adquirida

- É secundária a outras patologias ou condições

Na **hemocromatose adquirida ou secundária**, as principais causas são as patologias onde ocorre **eritropoiese ineficaz (exemplo da beta-talassémia)**. Nestes casos ocorre **destruição crónica dos Glóbulos Vermelhos**, ocorrendo a liberação de hemoglobina rica em ferro na corrente sanguínea.

Outras causas de excesso de ferro no organismo:

- ✓ Transfusões crónicas
- ✓ Alcoolismo crónico
- ✓ Hemodiálise prolongada
- ✓ Hepatites virais
- ✓ Hepatite alcoólica
- ✓ Esteato-hepatite não alcoólica
- ✓ Porfíria cutânea tarda
- ✓ Síndrome da sobrecarga de ferro dismetabólica
- ✓ Sobrecarga dietética de ferro (África)
- ✓ Sobrecarga de ferro neonatal

2) Hemocromatose Hereditária (HH)

Classificação das hemocromatoses	Mutações nos genes:	Tipo de Hemocromatose Hereditária	
Hemocromatose primária (hereditária)	Associada ao gene HFE (clássica)	HH tipo 1	
	Não associada ao gene HFE (não clássica)	Hepcidina (HAMP) Hemojuvelina (HJV)	Hemocromatose juvenil HH tipo 2
		Recetor 2 da transferrina (TFR2)	HH tipo 3
	Ferroportina (SLC40A1)	HH tipo 4 ou doença da ferroportina)	

Hemocromatose Hereditária clássica (tipo I) – características da doença

- A doença caracteriza-se por um **aumento da absorção (a nível intestinal) do ferro ingerido na alimentação**, com consequente acumulação em vários órgãos, especialmente **figado, 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 afeta mais os homens do que as mulheres.
- Problemas a nível hepático - **hepatomegália, cirrose e carcinoma hepatocelular**
- Problemas a nível cardíaco - **cardiomiopatias e arritmias**
- Frequentemente surge acompanhada de doenças endócrinas como **diabetes, hipogonadismo hipogonadotrófico, hipotensão**.
- A doença se não for tratada (**flebotomias**) pode levar à **morte**.

A Hemocromatose Hereditária (HH tipo 1)

- Apesar do **excesso de ferro** no organismo os doentes com HH do tipo I têm **níveis baixos de hepcidina**, devido ao **defeito da proteína sinalizadora HFE**.
- Transmissão autossómica recessiva** (o gene **HFE** localiza-se no cromossoma 6).

- O que confirma a doença HH-tipo I?

Testes genéticos: pesquisa das mutações comuns no gene **HFE**: c.845G>A; p.C282Y e c.187C>G; p.H63D

Os genótipos de risco: **C282Y/C282Y** ou **C282Y/H63D** confirmam o diagnóstico

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

Região	C282Y	H63D
Norte	>0,05	0,19
Nordeste	0,03-0,05	0,20
Centro	0,03-0,05	0,15
Sul	0,03-0,01	0,18
Sudoeste	<0,01	0,17

A frequência alélica da C282Y é dependente da região analisada

A frequência alélica da H63D é independente da região analisada

Cardoso et al. Eur J Hum Genet 2001

O diagnóstico molecular

Extração de DNA de amostra de sangue periférico colhido em EDTA

Pesquisa das mutações H63D e C282Y no gene **HFE** por PCR-RFLP

PCR seguido de restrição com a endonuclease **Mbo I**

Fragmento A
400 pb
200 pb
100 pb

Fragmento B
300 pb
200 pb
100 pb

A mutação **H63D** anula um sítio de corte da enzima **Mbo I**

PCR seguido de restrição com a endonuclease **Rsa I**

Fragmento A
237 pb
138 pb
92 pb
57 pb

Fragmento B
283/281 pb
171 pb

CC
CY

A mutação **C282Y** cria um sítio de corte da enzima **Rsa I**

Penetrância da HH tipo I

- Na população caucasiana a prevalência do defeito molecular em heterozigotia é de **1:15** e na forma de homozigotia é de **1:200 a 1:300**
- Mas nem todos os indivíduos que apresentam o genótipo de risco desenvolvem a doença -> penetrância muito baixa: **1:1000 a 1:2000**
- A maior parte dos indivíduos com o genótipo de risco apresenta sintomas como fadiga, artrite, diabetes e doença cardíaca (comuns a muitas outras patologias)

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 TIPOS DE HH

Tipos de HH	Gene	Tipo de herança	Dados laboratoriais	Consequências funcionais
Tipo 1 ou clássica	HFE Mut. comuns C282Y e H63D	Autossômica recessiva	↑ Ferritina ↑ Sat. Transf	Níveis baixos de hepcidina
Tipo 2A	HJV Hemojuvelina	Autossômica recessiva HH juvenil	↑ Ferritina ↑ Sat. transf	Níveis baixos de hepcidina
Tipo 2B	HAMP Hepcidina	Autossômica recessiva HH juvenil	↑ Ferritina ↑ Sat. Transf	Níveis baixos de hepcidina
Tipo 3	TFR2 Receptor 2 da transferrina	Autossômica recessiva	↑ Ferritina ↑ Sat. Transf	Níveis baixos de hepcidina
Tipo 4	SLC40A1 (Ferroportina)	Autossômica dominante	↑ ↑ Ferritina ↑ Saturação da Transferrina - normal ou baixa	Níveis elevados de hepcidina

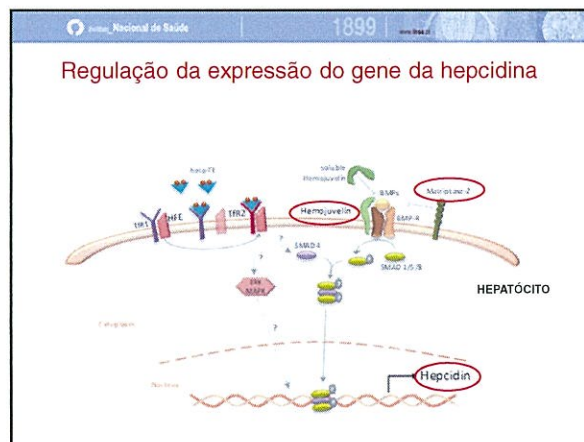
Casos clínicos de Hemocromatose Hereditária

Sexo	Idade	Fe (µg/dL)	Ferritina (ng/mL)	Sat. Transf (%)	Hb (g/dL)	VGM (fL)	HGM (pg)	Obs.	Genótipo
Ref*		H: 50-175 M: 35-140	H: 30-300 M: 15-150	20-50	H: >13 M: >12	>80	>27		
M	49	182	>1500	>60	15	100	35	Pele bronzeada	HFE C282Y/ C282Y
M	74	239	2534	100	14,9	96,1	32,3		HFE C282Y/ C282Y
F	49	164	>1000	66	13,5	91,5	-	Flebotomias desde 24 anos, Amenorreia aos 32 anos, Diabetes	HAMP 25G>A/ 25G>A
F	41	46,9	631,3	16	13,2	97,0	31,5	O pai realiza flebotomias	SLC40A1 p.G90S em heterozigotia

1) HH tipo I, ou clássica; 2) HH tipo I, ou clássica; 3) Hemocromatose tipo 2 ou juvenil; 4) Hemocromatose do tipo IV ou doença da ferroportina (autossômica dominante)

- Patologias associadas a carência em ferro**

Anemias relacionadas com o ferro:
Anemia ferropênica – bastante frequente, devida a carência de ferro na alimentação. Tem também uma componente genética?
IRIDA - Iron Refractory Iron Deficiency Anaemia
 Anemia rara, devida à incapacidade de absorver o ferro da alimentação.



Regulação da expressão de hepcidina pela HJV / Matriptase 2

A) A proteína **TMPRSS6** ou **Matriptase-2** é uma serina protease transmembranar (codificada pelo gene **TMPRSS6**) que interage com a hemojuvelina (HJV) e causa a sua fragmentação, controlando assim a via de transdução de sinal BMP/SMADS que culmina na **repressão** da expressão de **HAMP** (gene da hepcidina).

Consequências de alterações no gene **TMPRSS6**

A) A constante repressão da Matriptase-2 sobre a HJV – mantém baixa a estimulação da expressão do gene **HAMP** – baixo nível de hepcidina permite a absorção do ferro a nível intestinal.

B) Mutações patogénicas no gene **TMPRSS6** impedem a expressão da Matriptase-2 à superfície dos hepatócitos → deixa de haver repressão da expressão do gene **HAMP** → há aumento dos níveis de **Hepcidina** e consequente bloqueio na absorção do ferro pelos enterócitos do duodeno e da sua libertação pelo macrófagos.

Origina-se **IRIDA (Iron Refractory Iron Deficiency Anaemia)**.

Esquema do gene **TMPRSS6** e da estrutura da proteína matriptase-2

Variantes descritas no gene da matriptase-2

Mutações graves em homocigotia ou em heterocigotia composta causam **IRIDA** (doença muito rara).

Variantes polimórficas (frequentes, são modificadoras do status do ferro e são fatores de susceptibilidade para o desenvolvimento de **Anemia Ferropénica**)

Estudo de associação entre os parâmetros hematimétricos e do metabolismo do ferro e o genótipo de rs855791 T>C (p.Val736Ala) em mulheres portuguesas em idade fértil

Genótipo rs855791	Hb (g/dL)		VGM (fL)		HGM (pg)	
	média	p	média	p	média	p
CC	13.05		88.47		30.51	
CT	12.70	0,036*	87.09	0,194	29.55	0,091
TT	11.68		81.61		27.01	

Genótipo rs855791	Fe (µg/dL)		Ft (µg/L)		Sat Transf. (%)	
	média	p	média	p	média	p
CC	108.6		51,18		30.66	
CT	87.04	0,009*	39.26	0,124	23.94	0,015*
TT	61.89		25.25		17.03	

Testes estatísticos usados: Teste de Kruskal-Wallis ou teste One-Way ANOVA; *considerada significância para p<0.05
TT – genótipo de risco para desenvolver anemia ferropénica

Diferenças entre IRIDA e IDA

- IRIDA > mutações no gene **TMPRSS6****
Doença hereditária rara. É mais grave na infância quando as necessidades em ferro são maiores. Não responde ao tratamento com ferro oral. Resposta fraca ao ferro intravenoso.
Anemia microcítica e hipocrômica, ferro sérico baixo, ferritina normal ou baixa, saturação da transferrina muito baixa, **hepcidina elevada.**
- IDA**
Condição muito frequente (≈ 20% da população Portuguesa)
Adquirida - carência de ferro na alimentação.
Anemia microcítica e hipocrômica, ferritina baixa, ferro sérico baixo, saturação da transferrina baixa, **hepcidina baixa.**
- Componente genética de susceptibilidade à anemia (polimorfismos de risco no gene **TMPRSS6**)**

Iron Refractory Iron Deficiency Anemia in Dizygotic Twins Due to a Novel **TMPRSS6** Gene Mutation in Addition to Polymorphisms Associated With High Susceptibility to Develop Ferropenic Anemia

Caso clínico:
Duas irmãs gêmeas, dizigóticas, com 29 anos.

Anemia microcítica e hipocrômica detectada desde a infância, refractária ao tratamento oral com ferro.

O estudo genético revelou em ambas uma nova mutação no gene **TMPRSS6** intrão 11 (c.1396+4 A>T) + 3 polimorfismos anteriormente associados a alto risco para o desenvolvimento de anemia ferropénica (D521D, V736A, e Y739Y).

DIAGNOSTICO: IRIDA

Doseamento de hepcidina?

Centro Nacional de Saúde 1899

Agradecimentos

- Ao INSA   
- Departamento de Genética Humana