



Hemocromatose hereditária associada ao gene *HFE*: resultados do diagnóstico molecular, correlação genótipo-fenótipo e importância da qualidade laboratorial

Hereditary hemochromatosis associated with the HFE gene: results of the molecular diagnosis, genotype-phenotype correlations, and importance of laboratory quality

Pedro Fonseca¹, Pedro Loureiro¹, Susana Gomes¹, Paula Faustino^{2,3}, João Gonçalves^{1,4}

joao.goncalves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina de Lisboa. Universidade de Lisboa, Lisboa Portugal

(4) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A hemocromatose hereditária (HH) associada ao gene *HFE*, dado ser uma doença autossómica recessiva com penetrância incompleta, deve obedecer a uma estratégia de análise molecular que compreenda, em primeiro lugar, a pesquisa das alterações moleculares que ocorrem mais frequentemente no referido gene (p.H63D e p.C282Y). Deve dar-se prioridade à pesquisa da alteração p.C282Y já que esta, quando presente em homozigotia, não havendo outros fatores de risco associados, permite confirmar a doença em indivíduos com fenótipo clínico sugestivo de HH e/ou apresentam biomarcadores séricos indicadores de sobrecarga em ferro, nomeadamente saturação da transferrina e ferritina elevadas. Neste trabalho, o estudo molecular de 1838 doentes com parâmetros clínicos e/ou bioquímicos relacionados com HH, revelou a presença de homozigotia para a alteração p.C282Y em 4% dos indivíduos analisados, valor muito acima do estimado para a população em geral (~0,09%) enquanto que a homozigotia para p.H63D foi de 7,9%, o qual corresponde a duas vezes o valor previsto para a população em geral (~4%). Ou seja, estes resultados, sustentam que a referida pesquisa, antecedida de aconselhamento genético, deverá ser realizada para confirmar (em indivíduos com índices bioquímicos de sobrecarga em ferro) a suspeita de HH. O diagnóstico molecular antecedido da ocorrência dos sintomas graves da HH, permite antecipar a vigilância clínica, prevenindo a progressão da doença para as manifestações mais graves que incluem, por exemplo, cirrose e carcinoma hepatocelular. Complementarmente, valoriza-se também a importância da participação dos laboratórios em ensaios de avaliação externa da qualidade, o que permite melhorar o desempenho dos mesmos no âmbito da genotipagem, interpretação de resultados e qualidade dos relatórios.

_Abstract

Hereditary hemochromatosis (HH) associated with the HFE gene is an autosomal recessive disease with incomplete penetrance, should follow a molecular strategy analysis that includes, in a first stage, the screening of the molecular alterations that occur more frequently in that gene (p.H63D and p.C282Y). Priority should be given to p.C282Y alteration since this, when present in homozygosity, with no other associated risk factors, allows the disease confirmation in individuals with a clinical phenotype suggestive of HH and/or with serum biomarkers of iron overload, namely transferrin and ferritin saturation indices above normal. In

this work, the molecular study of 1838 patients with clinical and/or biochemical parameters related to HH, revealed the presence of homozygosity for p.C282Y in 4% of the analysed individuals, a value well above the estimated for the general population (~ 0.09%), while the homozygosity for p.H63D was 7.9%, which is twice the expected value for the general population (~ 4%). These results support that the strategy of analysis mentioned above, preceded by genetic counselling, should be carried out to confirm (in individuals with biochemical indexes of iron overload) the suspicion of HH. The molecular diagnosis performed before the occurrence of severe symptoms of HH, allows the anticipation of the patient's clinical surveillance, preventing the progression of the disease to the most severe manifestations that include, for example, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Additionally, the participation of laboratories in external quality assessment schemes is important and highly recommended, which allows them to improve their performance in terms of genotyping, results interpretation, and reports quality.

_Introdução

Designa-se por Hemocromatose Hereditária (HH) um conjunto de doenças genéticas, de desenvolvimento tardio no adulto, as quais são caracterizadas pela acumulação de ferro em órgãos parenquimatosos, sobretudo no fígado ⁽¹⁾. Na ausência de tratamento, a patologia poderá originar a falência do órgão, passando por uma evolução degenerativa de fibrose, cirrose até ao carcinoma hepatocelular. A forma mais prevalente é a HH do tipo 1 (OMIM#235200) associada à alteração c.845G>A, p.Cys282Tyr em homozigotia no gene *HFE* (HGNC#4886) ⁽²⁾ e apresenta uma transmissão autossómica recessiva. A penetrância da doença é incompleta, 75% a 85% dos indivíduos que possuem a referida alteração



em homozigotia não desenvolvem manifestações clínicas graves, embora possam apresentar alterações quantitativas nos biomarcadores séricos associados ao metabolismo do ferro (3-5). A alteração c.187C>G, p.His63Asp, também no gene *HFE*, pode estar associada a ligeira sobrecarga em ferro quando presente em heterozigotia composta com a alteração c.845G>A, p.Cys282Tyr, ou eventualmente associada a sobrecarga moderada, quando em homozigotia, contudo para estes genótipos as manifestações fenotípicas graves são raras. De acordo com as *guidelines* mais recentes da *European Association for the Study of the Liver* (EASL), esta alteração, só por si, não é considerada causadora de HH associada ao gene *HFE* (6).

_Objetivo

O presente trabalho visou avaliar os resultados genotípicos da pesquisa das duas alterações que ocorrem mais frequentemente no gene *HFE*, associadas a hemocromatose hereditária (HH) em doentes com suspeita clínica de HH ou com parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro elevados.

_Materiais e métodos

Estudaram-se 1838 doentes, no período compreendido entre janeiro de 2009 e outubro de 2020, no âmbito do diagnóstico molecular de HH tipo 1 com base em critérios clínicos

(doença hepática crónica, doença metabólica, porfiria cutânea tarda, diabetes *mellitus*), e/ou bioquímicos (alteração das provas hepáticas, Ferritina Sérica (FS) elevada, ferro sérico elevado, índice de Saturação da Transferrina (ST) elevada). As alterações *HFE*: c.187C>G, p.(His63Asp) e c.845G>A, p.(Cys282Tyr) foram pesquisadas recorrendo à amplificação das regiões de interesse, respetivamente exões 2 e 4, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida de hidrólise enzimática dos respetivos fragmentos, com as endonucleases Mbo I e Rsa I.

_Resultados e discussão

A amostra analisada demonstra (tabela 1), de acordo com o previsto face às características da doença, que o grupo de doentes é constituído predominantemente por indivíduos do sexo masculino: 1366 homens (74,3%) e 472 mulheres (25,7%). A predominância do sexo masculino é justificada pela HH, ou a sobrecarga em ferro, ser mais frequente em homens do que em mulheres pré-menopausa. Atendendo à alteração molecular mais relevante associada à doença em causa, ou que confere risco significativo para HH, a homozigotia para c.845G>A, p.Cys282Tyr (adiante designada por YY), foi detetada em 4% dos indivíduos analisados (74, independentemente do sexo). Este valor é similar ao reportado na literatura, ou seja, ~1/3 dos laboratórios participan-

Tabela 1: ▾ Genótipos *HFE* para as alterações p.His63Asp e p.Cys282Tyr detetados nos 1838 indivíduos analisados.

Sexo masculino						
Genótipo	HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HHYY	HDCY
Nº de casos	639	430	117	76	47	57
Percentagem	46,8%	31,5%	8,6%	5,6%	3,4%	4,2%
Total	100% (n=1366)					
Sexo feminino						
Genótipo	HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HHYY	HDCY
Nº de casos	224	130	29	43	27	19
Percentagem	47,5%	27,5%	6,1%	9,1%	5,7%	4,0%
Total	100% (n=472)					

Representação simplificada dos genótipos a nível da sequência na proteína. Cada aminoácido está representado por uma única letra de acordo com a nomenclatura internacional: H(Histidina), D(Ácido aspártico), C(Cisteína) e Y(Tirosina). HH ou DD – homozigotia para, respetivamente, histidina ou ácido aspártico na posição 63; CC ou YY – homozigotia para, respetivamente, cisteína ou tirosina na posição 282; HD e CY – heterozigotias, e HDCY – heterozigotia composta para as duas alterações em causa.



tes num inquérito europeu revelaram que a taxa de deteção da referida homozigotia é inferior a 5%, enquanto que cerca de 50% dos referidos laboratórios, a taxa em causa situa-se entre ~5-20% (1).

Os resultados também revelam que na amostra analisada, a homozigotia YY ocorre mais frequentemente em mulheres (5,7%) do que em homens (3,4%), o que sugere que o diagnóstico clínico/bioquímico nas mulheres é mais eficaz do que o realizado em homens, relativamente ao genótipo patogénico obtido. Quanto ao genótipo DY (heterozigotia composta) foi também detetado em ~4% dos indivíduos analisados, o que sustenta a associação do mesmo a sobrecarga em ferro ou às respetivas manifestações clínicas. Nesta análise o genótipo DD está particularmente representado na amostra analisada (8,6% em homens e 6,1% em mulheres). Embora a maioria dos autores considere que a alteração H63D não constitui uma alteração genética que isoladamente cause HH, o genótipo DD deverá ser considerado como um fator de risco sempre que ocorra em indivíduos que também possuam outros fatores a contribuir para a sobrecarga em ferro, por exemplo, doença hepática crónica, doença metabólica ou hábitos alcoólicos.

Atendendo aos diversos genótipos que podem conferir risco acrescido de sobrecarga em ferro (YY, DY e DD, embora o risco não seja o mesmo para cada um), verificamos que os mesmos foram detetados em 16,1% dos doentes analisados (296/1838), revelando assim, que os parâmetros clínicos e bioquímicos usados para a seleção dos doentes permitem identificar os que, em idade mais avançada, estarão em maior risco de vir a desenvolver sintomatologia mais grave associada à sobrecarga em ferro e consequentemente carecem de vigilância clínica mais regular. Complementarmente ao diagnóstico molecular em indivíduos que possuam as características clínicas ou bioquímicas anteriormente indicadas, o aconselhamento genético prévio dos mesmos e dos seus familiares diretos é essencial para a realização dos testes genéticos preditivos em causa.

Os presentes resultados também revelam que a grande maioria dos doentes (~84%) não possui as alterações que ocorrem mais frequentemente no gene *HFE*. Esta evidên-

cia é sugestiva que os doentes que manifestem inequivocamente HH, possuindo FS e ST consistentemente elevados, e nos quais seja comprovada a sobrecarga em ferro no fígado e não possuindo outros fatores de risco para a doença em causa, poderão ter indicação tanto para a pesquisa de alterações raras no gene *HFE*, como para o estudo molecular dos restantes genes associados a HH não clássica, nomeadamente *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1*. A análise molecular por sequenciação de nova geração (NGS, na sigla em inglês) de um painel contendo estes genes foi recentemente implementada na Unidade de Genética Molecular do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Esta nova abordagem metodológica permite (comparativamente à análise sequencial dos referidos genes por sequenciação de Sanger) com elevada rapidez, com um custo inferior e em função da informação clínica, identificar outros tipos raros de HH não-clássica causada por alterações moleculares nestes genes.

Evidencia-se, ainda, a importância da participação em ensaios de avaliação externa da qualidade (AEQ), nomeadamente os programas que avaliam, para além da genotipagem, a interpretação dos resultados, a clareza e formato dos relatórios. Neste aspeto, a participação da Unidade de Genética Molecular em AEQ para a HH, a qual ocorre desde 2005 no programa organizado pela EMQN (*European Molecular Genetics Quality Network*), obteve sempre resultados acima da média, ou a pontuação máxima, relativamente aos restantes laboratórios participantes, conforme representado no [gráfico 1](#) (relativa à genotipagem) e no [gráfico 2](#) (relativa à interpretação dos resultados). A participação em AEQ e a acreditação que obtivemos em 2014, no âmbito da norma portuguesa ISO 15189:2014 (11), são dois requisitos essenciais que demonstram credibilidade e competência, permitindo assegurar um diagnóstico de qualidade a diversos níveis. Cumprindo os rigorosos requisitos de gestão e técnicos da Qualidade, contribui-se também para cumprir o exigente regulamento relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* (Regulamento (UE) 2017/746) (12), já em vigor e com aplicação obrigatória a partir de 26 maio



Gráfico 1: Resultados da participação da Unidade de Genética Molecular (UMO) no programa de avaliação externa da qualidade em Hemocromatose Hereditária da EMQN, para o parâmetro "Genotipagem". Intervalo da classificação 0(zero) a 2.

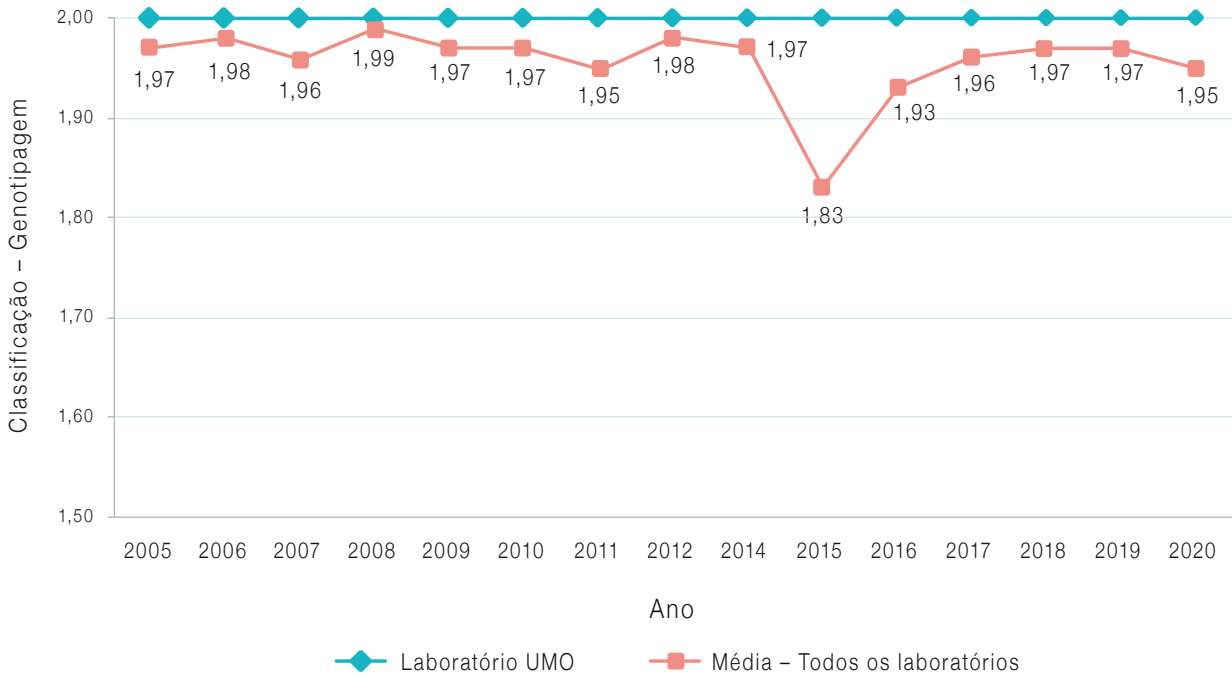
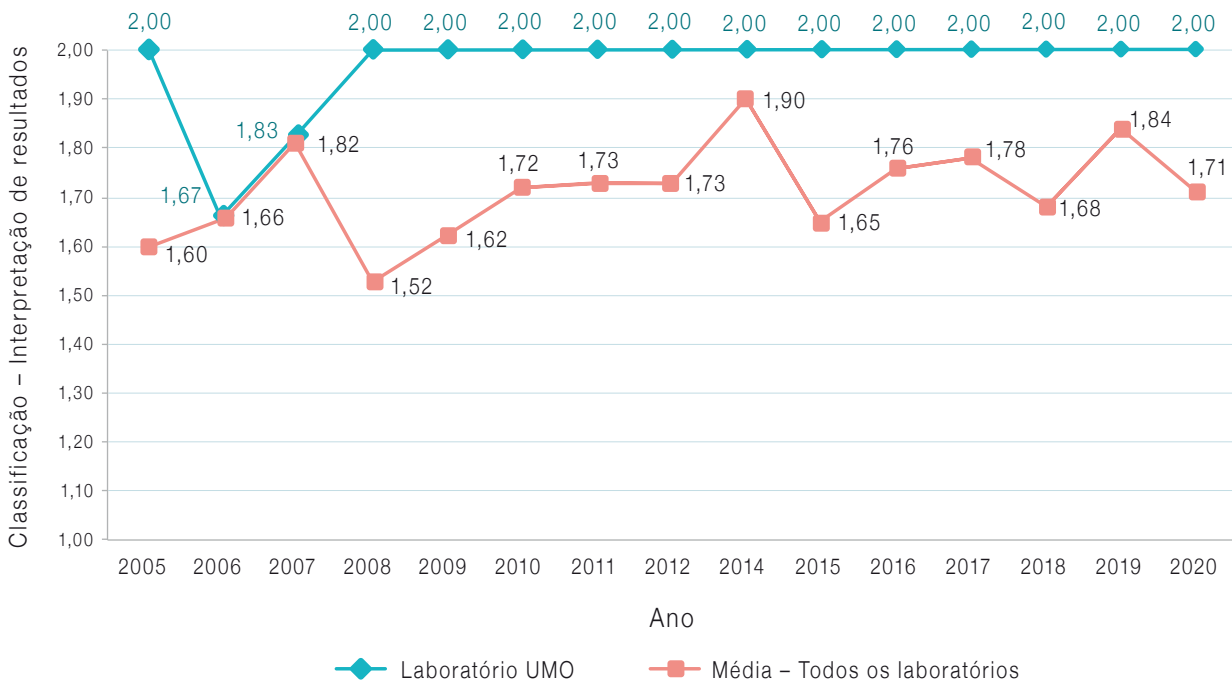


Gráfico 2: Resultados da participação da Unidade de Genética Molecular (UMO) no programa de avaliação externa da qualidade em Hemocromatose Hereditária da EMQN, para o parâmetro "Interpretação de Resultados". Intervalo da classificação 0(zero) a 2.





de 2022.

_Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que os diferentes genótipos para as alterações pesquisadas associadas a sobrecarga em ferro, ocorrem com uma frequência que varia entre 3,4% e 8,6%. Contudo, dada a penetrância incompleta destes genótipos, é determinante considerar os outros fatores não genéticos que contribuem para a sobrecarga em ferro visando uma melhor caracterização da doença individualmente e a identificação da(s) sua(s) causa(s).

A seleção dos doentes para a caracterização molecular da HH, dada a inespecificidade das manifestações clínicas que lhe estão associadas, e na ausência de outras doenças hematológicas, deve ser sustentada por índices bioquímicos de sobrecarga em ferro, nomeadamente a ST e a ferritina consistentemente elevados. Os doentes que não possuam a homozigotia YY, demonstrando-se inequivocamente a sobrecarga em ferro (por ex. por ressonância magnética ou mesmo devido à necessidade de realização de flebotomias regulares), poderão realizar estudos moleculares noutros genes associados a HH, desde que outras causas de doença hepática ou hematológica tenham sido excluídas.

Esta seleção criteriosa dos doentes, permitirá aumentar a taxa de deteção de genótipos associados à doença, a qual se refletirá na vigilância clínica dos doentes e dos seus familiares, acompanhadas pelo adequando aconselhamento genético, contribuirão mais eficazmente para um diagnóstico mais precoce da HH.

Referências bibliográficas:

- (1) Porto G, Brissot P, Swinkels DW, et al. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). *Eur J Hum Genet.* 2016 Apr;24(4):479-95. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.128>
- (2) Faria R, Silva B, Silva C, et al. Next-generation sequencing of hereditary hemochromatosis-related genes: Novel likely pathogenic variants found in the Portuguese population. *Blood Cells Mol Dis.* 2016 Oct;61:10-5. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.07.004>
- (3) Mayr R, Janecke AR, Schranz M, et al. Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *J Hepatol.* 2010 Nov;53(5):941-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.05.016>
- (4) Waalen J, Beutler E. Beware of multiple comparisons: a study of symptoms associated with mutations of the HFE hemochromatosis gene. *Clin Chim Acta.* 2005 Nov;361(1-2):128-34. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.017>
- (5) Katsarou MS, Papanavva M, Latsi R, et al. Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. *Vitam Horm.* 2019;110:201-22. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.010>
- (6) European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol.* 2010 Jul;53(1):3-22. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.001>
- (7) Bryant J, Cooper K, Picot J, et al. A systematic review of the clinical validity and clinical utility of DNA testing for hereditary haemochromatosis type 1 in at-risk populations. *J Med Genet.* 2008 Aug;45(8):513-8. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.055806>
- (8) Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test.* 2000;4(2):183-98. <https://doi.org/10.1089/10906570050114902>
- (9) Swinkels DW, Jorna AT, Raymakers RA. Synopsis of the Dutch multidisciplinary guideline for the diagnosis and treatment of hereditary haemochromatosis. *Neth J Med.* 2007 Dec;65(11):452-5. <http://www.njmonline.nl/getpdf.php?id=606>
- (10) Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jul;1852(7):1347-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.03.011>
- (11) NP EN ISO 15189:2014. Laboratórios clínicos. Requisitos para a qualidade e competência.
- (12) Regulamento (EU) 2017/746 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de abril de 2017. Relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro e que revoga a Diretiva 98/79/CE e a Decisão 2010/227/UE da Comissão. JO 5.5.2017: L 117/176-332. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0746&from=EN>