



Variantes genéticas da hormona hepcidina contribuem para aumentar os níveis da ferritina sérica em indivíduos suscetíveis de desenvolverem sobrecarga em ferro

Bruno Silva, Lina Pita, Susana Gomes, Pedro Loureiro,
João Gonçalves, Paula Faustino

paula.faustino@insa-min-saude.pt

Departamento de Genética Humana, INSA.

_Introdução

Uma das principais causas da acumulação progressiva e patológica de ferro no organismo tem base genética e é devida a um excesso de absorção, ao nível do duodeno, do ferro proveniente da alimentação e ao aumento da sua libertação pelos macrófagos. Esta patologia, denominada hemocromatose hereditária (HH), está normalmente associada à presença, em homozigotia, da mutação C282Y (c.845G>A) no gene *HFE*. Existem ainda variantes comuns deste gene, como a H63D (c.187C>G), cuja frequência alélica na população portuguesa é de 15 a 20% (1), que também podem ser encontradas em casos de sobrecarga em ferro (2).

A HH é uma doença de baixa penetrância e expressividade variável. Para a grande variabilidade do fenótipo contribuem fatores ambientais (tais como o álcool, a hepatite, etc.) e fatores genéticos, nomeadamente a presença de variantes genéticas em genes relacionados com o metabolismo do ferro. É o caso da hepcidina (codificada pelo gene *HAMP*), uma hormona hepática que desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do ferro pois, consoante as necessidades do organismo, modula a absorção de ferro pelo intestino assim como a sua libertação pelos macrófagos e células de armazenamento. Os níveis baixos desta hormona são reconhecidos como a principal causa da sobrecarga de ferro observada na HH. Assim, foi sugerido que fatores genéticos que levem à diminuição da expressão do gene *HAMP* poderão contribuir para o agravamento dos fenótipos de sobrecarga em ferro (3,4,5).

_Objetivo

Sendo a hepcidina a principal hormona reguladora da homeostase do ferro, pretendeu-se, neste trabalho, investigar se variantes comuns na região regulatória do gene *HAMP* (promotor), podem influenciar os níveis de ferritina sérica nos indivíduos que possuem a variante H63D no gene *HFE*.

_Materiais e métodos

Participantes: 100 indivíduos com níveis de ferritina sérica (sFt) <300 µg/L e sem alterações no gene *HFE* (Tabela 1, grupo controlo); 91 indivíduos com níveis de sFt <300 µg/L e portadores da variante H63D no gene *HFE* em heterozigotia (HD) ou em homozigotia (DD) (Tabela 1, grupo 1); 218 indivíduos com um perfil de sobrecarga em ferro, em particular com níveis de sFt ≥300 µg/L e portadores da variante H63D no gene *HFE* (HD ou DD) (Tabela 1, grupo 2). De acordo com os critérios clínicos estabelecidos, nenhum indivíduo possuía consumo de álcool em excesso nem infeção pelo vírus da hepatite C. Foi obtido o consentimento informado dos participantes.

Genotipagem: a região proximal (1,14 kb) do promotor do gene *HAMP* foi genotipada para todos os 409 indivíduos, por metodologia de PCR convencional seguida de sequenciação automática.

Análise de dados: Os dados foram testados para a normalidade e variância. A análise envolvendo os valores de sFt foi efetuada após transformação logarítmica. A análise ANCOVA foi efetuada utilizando a idade e o género como co-variáveis. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

_Resultados

A pesquisa de alterações no promotor do gene *HAMP* levou à identificação de duas variantes, nc.-1010C>T (rs10414846) e nc.-582A>G (rs10421768), que já haviam sido previamente descritas. Dado que nas amostras em estudo estas variantes foram encontradas em associação (desequilíbrio de *linkage*), apresentando preferencialmente as combinações CA e TG no genoma, as análises subsequentes foram tratadas de acordo com estes haplótipos. Foi determinada a frequência destes haplótipos e a sua possível relação com o nível de sFt, na presença ou ausência da variante H63D no gene *HFE* (Tabela 2). Foi observado que a frequência do



Tabela 1: ↓ *Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro nos grupos de indivíduos estudados, divididos de acordo com a presença/ausência da variante H63D no gene HFE e com os diferentes níveis de ferritina sérica.*

Parâmetro	Grupo controlo	Grupo 1		Grupo 2	
	HFE_wt ^a [n=100]	HFE_HD ou DD ^b sFt ^c <300 µg/L [n=91]		HFE_HD ou DD ^b sFt ^c ≥300 µg/L [n=218]	
			<i>p</i> ^d		<i>p</i> ^d
Ferro sérico (µg/dL)	106,4 [100,1; 112,7]	124,1 [114,4; 133,8]	0,003	158,0 [148,8; 167,2]	<0,001
Ferritina sérica (µg/L)	82,2 [67,7; 96,7]	133,6 [114,0; 153,2]	0,001	970,4 [876,6; 1075,8]	<0,001
Saturação da transferrina (%)	30,8 [28,6; 33,1]	39,7 [36,2; 43,2]	<0,001	59,0 [55,9; 62,1]	<0,001

^a grupo controlo, sem a variante H63D no gene HFE e com valores normais dos parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro;

^b indivíduos com a variante H63D em heterozigotia (HD) ou em homozigotia (DD); ^c ferritina sérica; ^d teste-t [Ft foi testada como log(Ft)];

n = número de indivíduos; valores apresentados como: média [IC 95%]

Tabela 2: ↓ *Associação entre os haplótipos do promotor do gene HAMP, a variante H63D e diferentes níveis de ferritina sérica.*

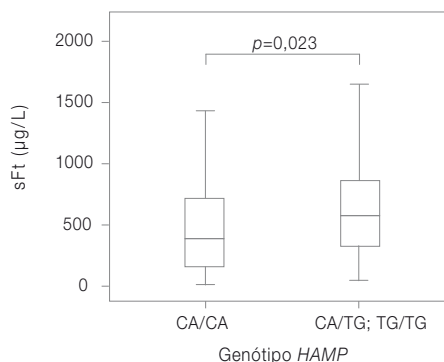
Variantes promotor HAMP c.-1010C>T; c.-582A>G		Grupo controlo	Grupo 1		Grupo 2	
		Frequência (%) [n]	Frequência (%) [n]	<i>p</i> [*]	Frequência (%) [n]	<i>p</i> [*]
Haplótipo	CA	78,5 [157]	78,0 [142]	0,903	69,5 [303]	0,029
	TG	21,5 [43]	22,0 [40]		30,5 [133]	
Genótipo	CA/CA	58,0 [58]	62,6 [57]	<0,001	47,7 [104]	<0,001
	CA/TG	41,0 [41]	30,8 [28]		43,6 [95]	
	TG/TG	1,0 [1]	6,6 [6]		8,7 [19]	

* teste χ^2 ; n = número de indivíduos ou alelos

haplótipo TG é significativamente superior ($p=0,029$) no grupo de indivíduos portadores da variante H63D no gene HFE e que têm valores de sFt ≥ 300 µg/L (30,5%, grupo 2) comparativamente com o grupo controlo (21,5%) e com o grupo de indivíduos portadores da variante H63D com sFt <300 µg/L (22,0%, grupo 1; $p=0,040$).

De modo a confirmar a associação observada, dividimos os 218 indivíduos portadores de H63D em 2 grupos, independentemente do seu nível de sFt. Assim, juntaram-se, por um lado os indivíduos com o genótipo CA/CA em HAMP e, por outro lado, os restantes indivíduos com os genótipos CA/TG e TG/TG (**Figura 1**). Observámos que neste segundo grupo de indivíduos os valores de sFt são significativamente superiores ($p=0,023$; ajustado para idade e género).

Figura 1: ↓ *Distribuição da ferritina sérica de acordo com os genótipos do promotor do gene HAMP em indivíduos com a variante H63D em HFE.*



As amostras foram testadas para a normalidade e os valores de *p* obtidos por análise ANCOVA ajustada para idade e género.



artigos breves_ n. 2

_Discussão

A presença, em homozigotia, da mutação C282Y no gene *HFE* é reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento de HH. O mesmo não se verifica para a variante H63D, cujo significado patológico continua por esclarecer. Neste estudo verificámos que o haplótipo TG no promotor do gene *HAMP* (definido pelas variantes nc.-1010T e nc.-582G) é mais frequente em indivíduos portadores da variante H63D no *HFE* que apresentam valores mais elevados de sFt. Do mesmo modo, a variante nc.-582A>G já tinha sido descrita em associação com fenótipos mais graves de sobrecarga em ferro em doentes com beta-talassémia major (6). Por outro lado, não foi observado nenhum efeito da mesma nos parâmetros periféricos do metabolismo do ferro em indivíduos saudáveis (7). Postulamos, então, que a variante nc.-582A>G no promotor de *HAMP* terá um efeito negligenciável em condições normais de homeostasia do ferro, sendo a sua contribuição apenas relevante em condições fisiopatológicas do metabolismo do ferro onde é necessária uma maior expressão de hepcidina.

_Conclusões

Os nossos resultados, juntamente com os obtidos por outros autores (6,7), permitem-nos concluir que as variantes genéticas localizadas no promotor do gene *HAMP*, em nc.-1010 e nc.-582, participam na regulação do metabolismo do ferro manifestando o seu efeito em indivíduos que apresentam concomitantemente outros fatores de risco (ambientais ou genéticos) para o desenvolvimento de sobrecarga em ferro. Deste modo, parece ser relevante a pesquisa destas variantes em *HAMP* no subgrupo de indivíduos que apresentam a variante H63D no gene *HFE* e um fenótipo de sobrecarga em ferro, nomeadamente com níveis de sFt ≥ 300 $\mu\text{g/L}$, de maneira a poder ser compreendida essa manifestação.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do INSA, pelo apoio técnico. Este estudo foi parcialmente financiado pela FCT: PEst-OE/SAU/UI0009/2011.

Referências bibliográficas:

- (1) Cardoso CS, Oliveira P, Porto G, et al. Comparative study of the two more frequent HFE mutations (C282Y and H63D): significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9(11):843-8. [LINK](#)
- (2) Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996;13(4): 399-408.
- (3) Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, et al. Digenic inheritance of mutations in *HAMP* and *HFE* results in different types of haemochromatosis. *Hum Mol Genet.* 2003;12(17):2241-7. [LINK](#)
- (4) Jacolot S, Le Gac G, Scotet V, et al. *HAMP* as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the *HFE* pC282Y homozygous genotype. *Blood.* 2004;103(7):2835-40. [LINK](#)
- (5) Aguilar-Martinez P, Giansily-Blaizot M, Bismuth M, et al. *HAMP* promoter mutation nc.-153C>T in non p.C282Y homozygous patients with iron overload. *Haematologica.* 2010; 95(4):687-8. [LINK](#)
- (6) Andreani M, Radio FC, Testi M, et al. Association of hepcidin promoter c.-582 A>G variant and iron overload in thalassemia major. *Haematologica.* 2009; 94(9):1293-6. [LINK](#)
- (7) Bruno F, Bonalumi S, Camaschella C, et al. The -582A>G variant of the *HAMP* promoter is not associated with high serum ferritin levels in normal subjects. *Haematologica.* 2010; 95(5):849-50. [LINK](#)

Adaptado do artigo publicado em *Ann Hematol.* 2014 jul 13.

doi: 10.1007/s00277-014-2160-7 [Epub ahead of print]