

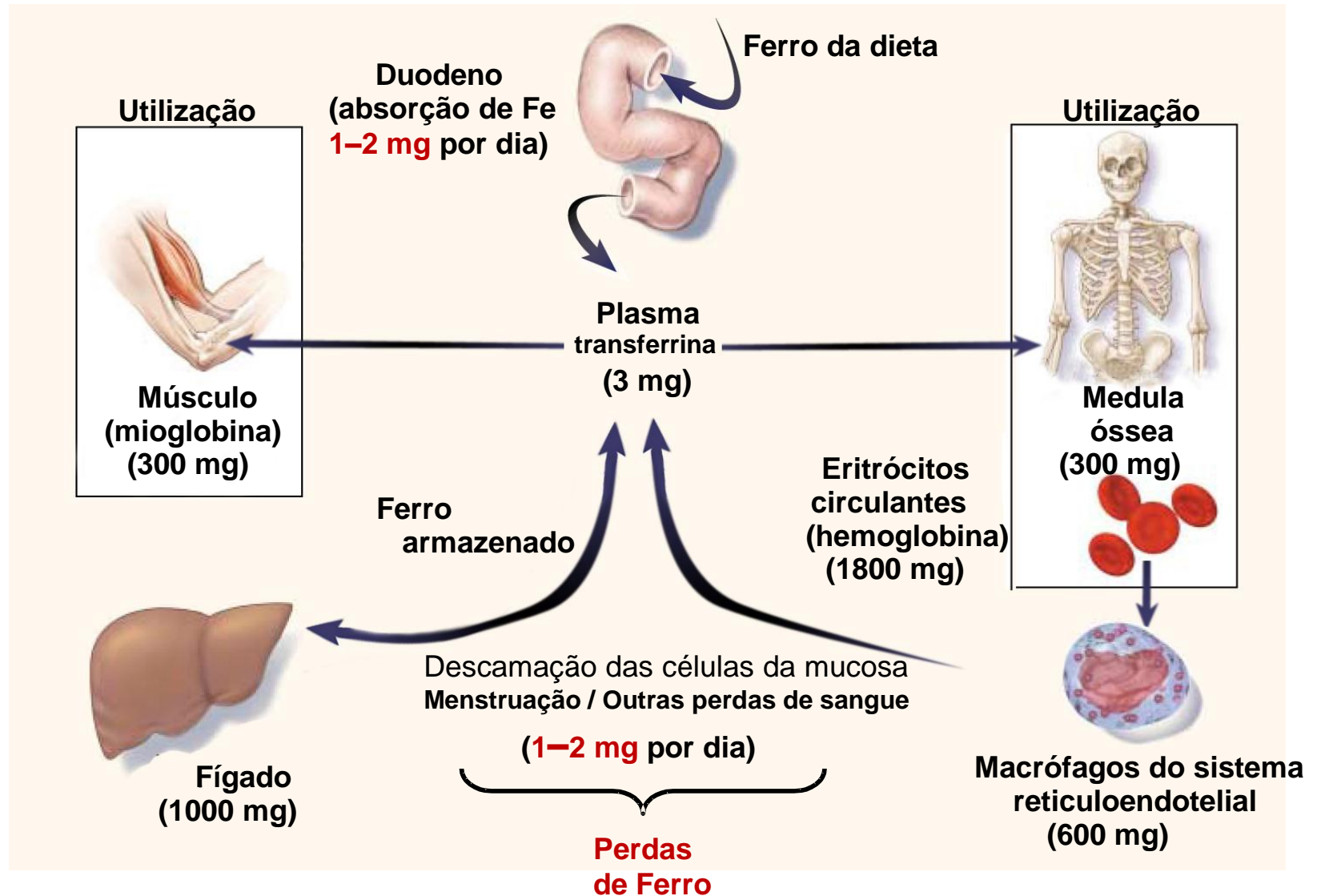
Mestrado em Biologia Humana e Ambiente,
FCUL, 30 de março de 2016

A desregulação da homeostase do ferro: base molecular e patologias associadas

Paula Faustino, PhD
Unidade de Investigação e Desenvolvimento
Departamento de Genética Humana

paula.faustino@insa.min-saude.pt

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. ácido 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 este **oxidado** pela **hefastina** (na membrana) ou pela **ceruloplasmina** (no plasma), entrando na circulação na forma férrica (Fe^{3+}) ligado à transferrina.

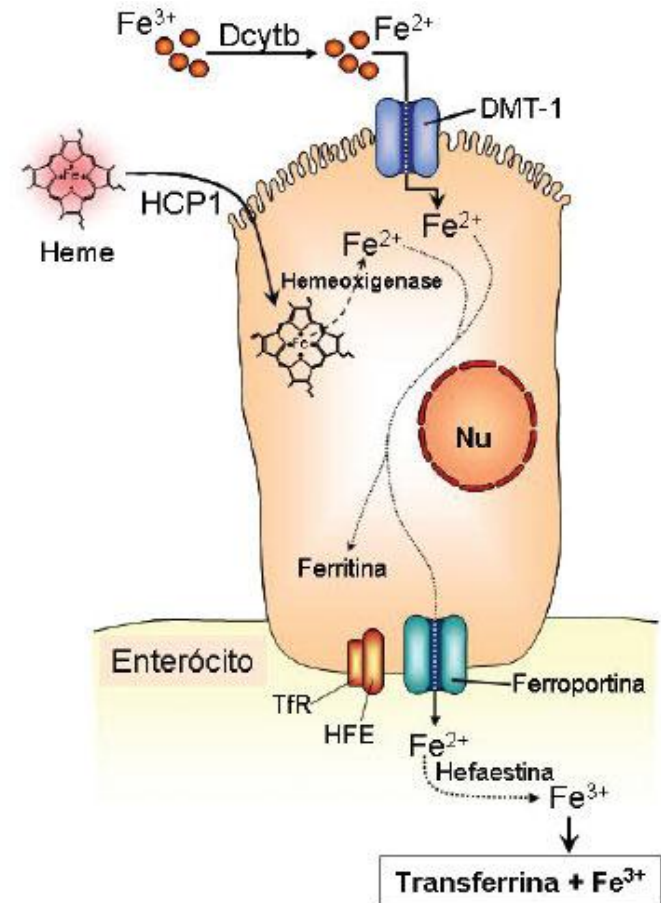
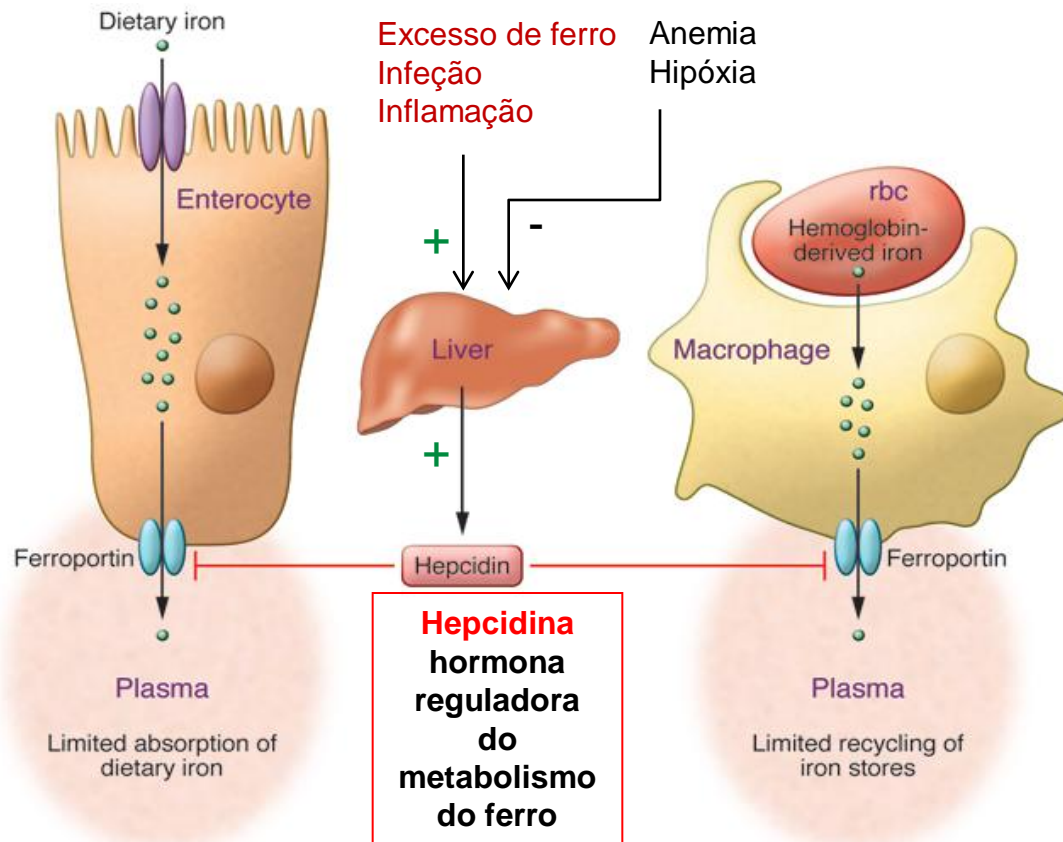


Figura 1. O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TFR: receptor da transferrina

A regulação da absorção do ferro ao nível do duodeno e da sua 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).

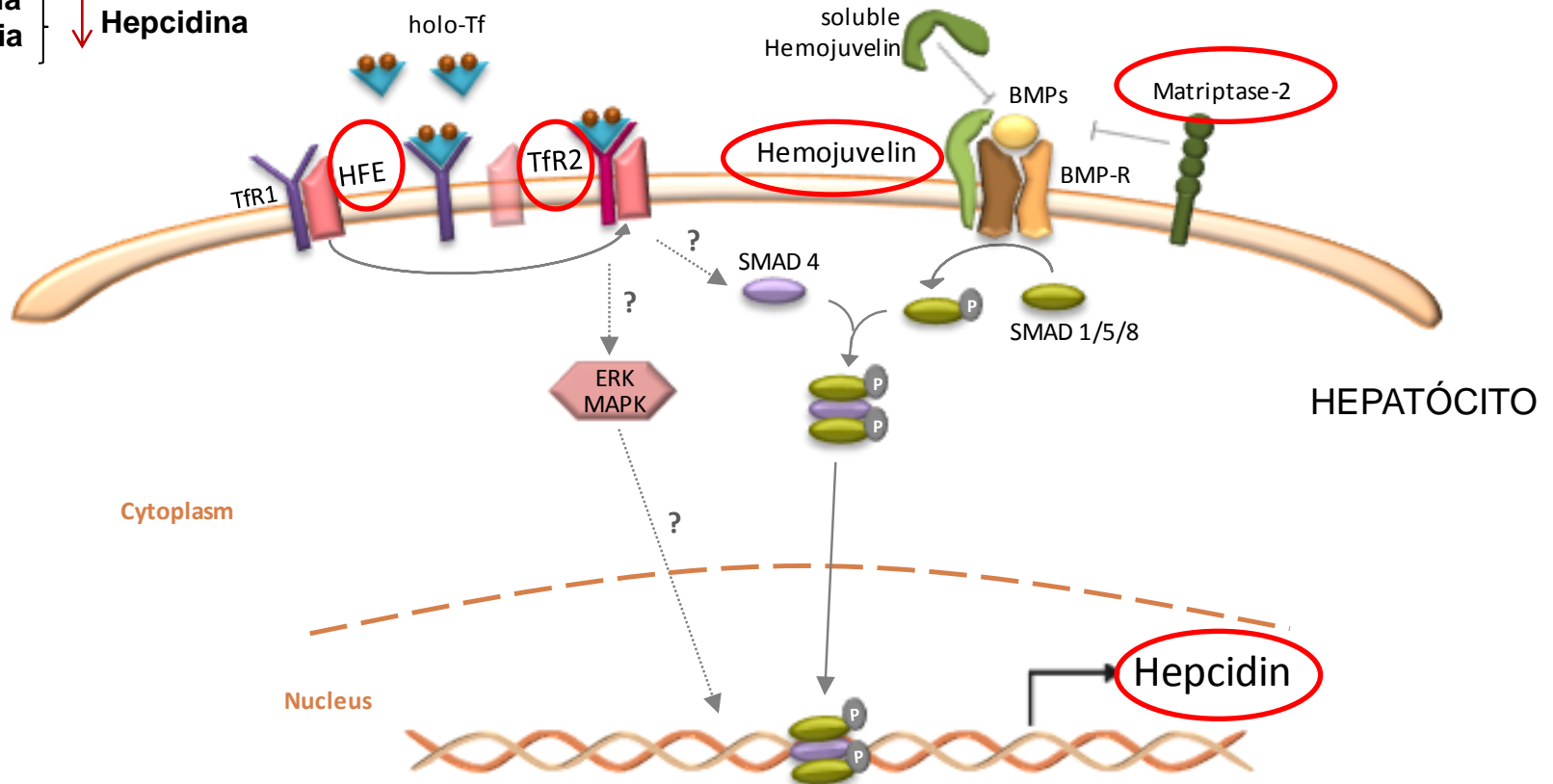
Regulação da expressão do gene da hepcidina

Excesso de ferro no organismo
Inflamação
Infeção

↑ Heparidina

Anemia
Hipóxia

↓ Heparidina



Patologias associadas a sobrecarga em ferro por excesso na absorção

- ***A hemocromatose hereditária***

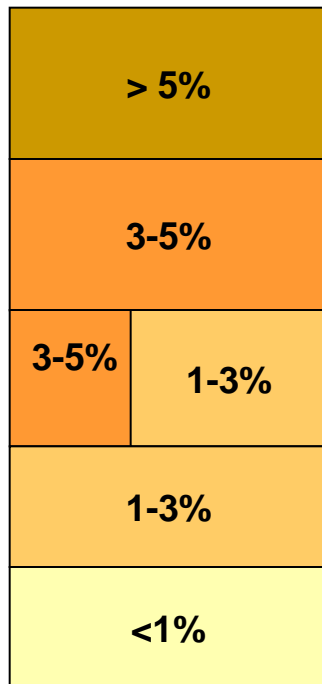
Hemocromatose Hereditária – características da doença

- A doença caracteriza-se por um **aumento da absorção a nível intestinal do ferro ingerido na alimentação**, com consequente acumulação em vários órgãos, especialmente **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.
- Problemas ao nível hepático - **hepatomegália, cirrose e carcinoma hepatocelular**
- Problemas ao nível cardíaco - **cardiomiopatis 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**.

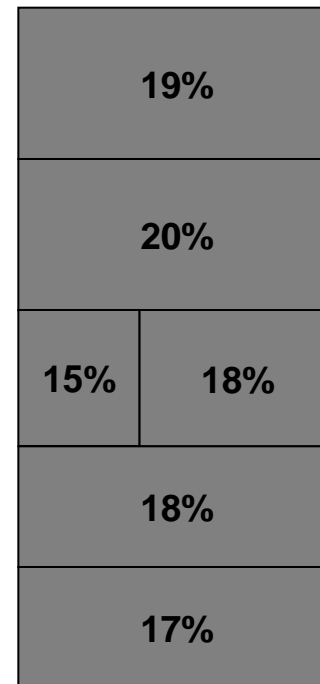
A Hemocromatose Hereditária tipo 1 (clássica) - base molecular

- A HH clássica é uma das doença genéticas mais comuns em caucasianos com ascendência norte Europeia.
- Apresenta transmissão autossômica recessiva e penetrância incompleta.
- Foi verificado que a grande maioria (cerca de 90%) dos doentes HH apresenta homozigotia para uma mutação no gene **HFE**: c.845G>A, p.C282Y
- Mais raramente, são reportados doentes com HH devido a heterozigotia composta para a mutação p.C282Y e uma outra mutação também no gene **HFE** c.187C>G; p.H63D

Distribuição geográfica em Portugal das frequências alélicas de p.C282Y e p.H63D em *HFE*



A frequência alélica da p.**C282Y** é dependente da região analisada



A frequência alélica da p.**H63D** é independente da região analisada

O diagnóstico clínico e bioquímico 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%**

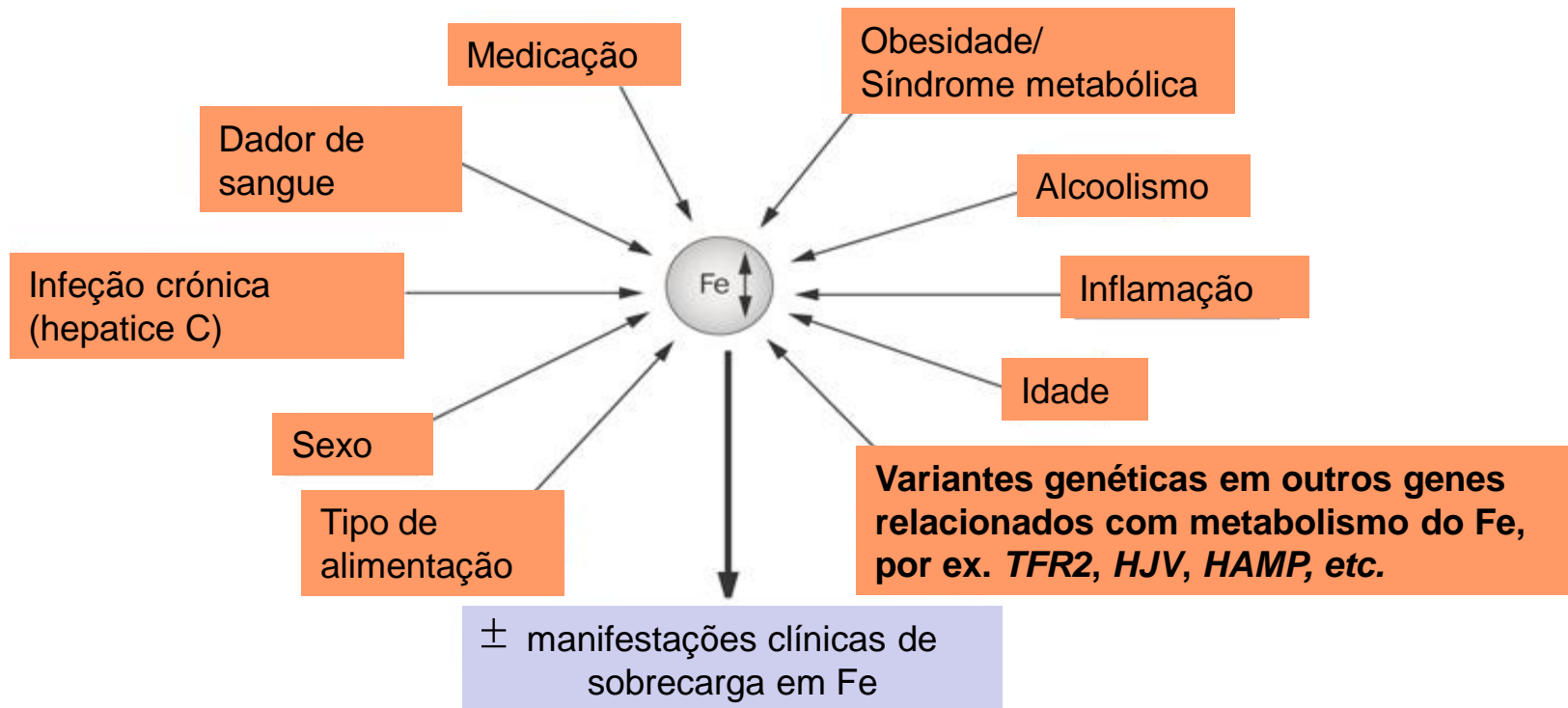
[ST= Fe sérico/capacidade total de ligação ao Fe) x100]

2) 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 há sobrecarga em ferro não associada ao genótipo de risco em *HFE*?

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**.

Tipos de Hemocromatose Hereditária

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

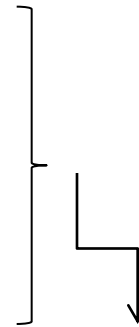
Estudo da Hemocromatose Hereditária não-clássica em Portugal

- **Screening de mutações** em quatro genes relacionados com o metabolismo do ferro (*HFE*, *TFR2*, *HAMP*, *HJV*) em doentes com hemocromatose, sem os genótipos de risco em *HFE* (homozigotia para C282Y ou heterozigotia composta com H63D) e sem fatores de risco ambiental (alcoolismo e hepatite).

Metodologias:

1ª fase (215 doentes)

- *Single-Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP)
- *Denaturing High- Performance Liquid Chromatography* (dHPLC)
- Sequenciação de Sanger



2ª fase (88 doentes)

- **Next-generation sequencing**
- Validação das variantes por sequenciação de Sanger

Ann Hematol
DOI 10.1007/s00277-008-0572-y

ORIGINAL ARTICLE

Non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal: novel mutations identified in iron metabolism-related genes

Ana Isabel Mendes • Ana Ferro • Rute Martins •
Isabel Picanço • Susana Gomes • Rute Cerqueira •
Manuel Correia • António Robalo Nunes •
Jorge Esteves • Rita Fleming • Paula Faustino

Estudo da Hemocromatose Hereditária não-clássica em Portugal

No total dos 303 doentes analisados identificaram-se **69 variantes genéticas diferentes**, algumas delas novas:

29 *missense*,

8 sinónimas,

5 localizadas em regiões de *splicing*,

1 que origina um codão de stop prematuro,

1 que origina um codão de iniciação da tradução prematuro,

2 localizadas num elemento de resposta ao ferro (*Iron-Responsive Element*),

23 aparentemente neutras.

Estudo da Hemocromatose Hereditária não-clássica em Portugal

Mutações novas, ou muito raras, detetadas no 1º estudo:

No gene *HFE* : S65C, **E277K**, **V295A**, L46W, D129N, Y138X e Y230F

No gene *TFR2*: I238M, IVS5-9T>A; F280L

No gene *HAMP*: 5'UTR -25G>A

No gene *HJV*: A310G, E275E, IVS2+395C>G, **P142L (em curso)**

bjh research paper

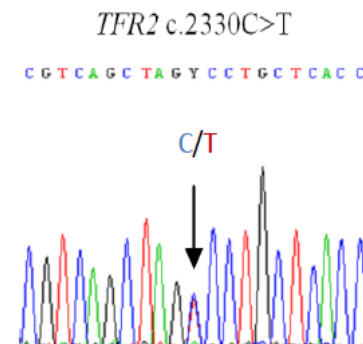
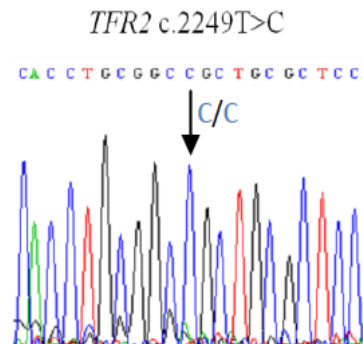
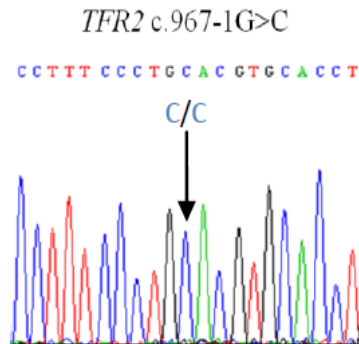
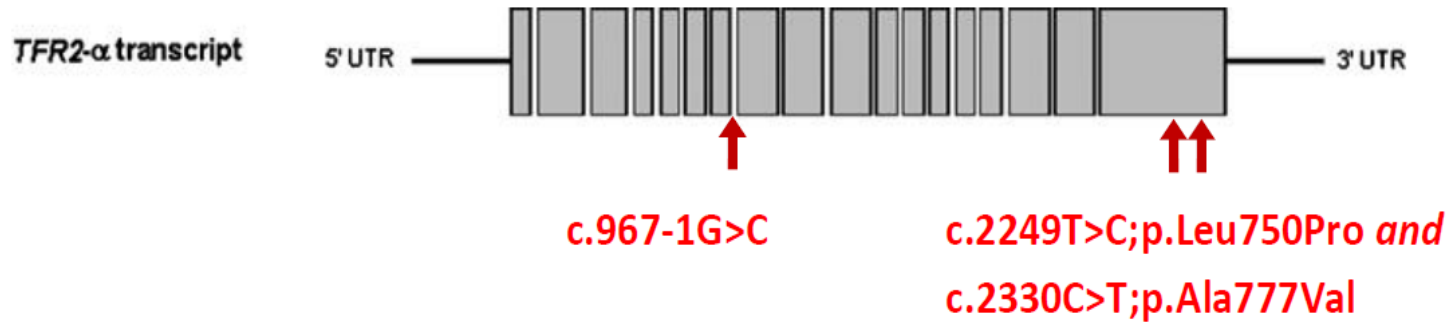
• **Estudos funcionais** de novas mutações

The functional significance of E277K and V295A *HFE* mutations

Bruno Silva,¹ Rute Martins,¹ Daniela Proença,¹ Rita Fleming² and Paula Faustino¹

¹Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge and ²Serviço de Imuno-hemoterapia, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal

Mutações novas, ou muito raras, detetadas no 2º estudo:
HH tipo 3 – Novas mutações no gene *TFR2* detetadas por next generation sequencing



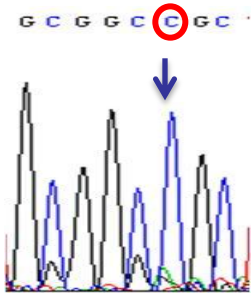
Mutação *missense* - TFR2:c.2249T>C, p.Leu750Pro

- Indivíduo ♂, 56 anos:
 - Ferritina: 2961 ng/ml
 - Saturação de transferrina: 84%

Resultados NGS

Gene	#CHROM	QUAL	FILTER	GT	AD (allelic depth)	DP (read depth)	GQ (genotype quality)	VF (variant frequency)	ID
TFR2	chr7	4960.62	PASS	homoz	4;215	219	99	0,982	p.L750P

Confirmação por Sanger

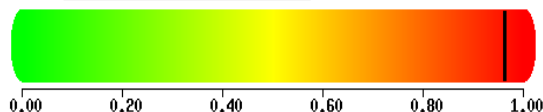


Alinhamento Múltiplo

QUERY	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHLR	L	LRS
sp UPI0001561254#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRS
sp G1TTY5#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHLR	L	LRA
sp UPI00021053A1#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGHGDHTLGCALLDHVR	L	LRS
sp E2RCW0#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRS
sp UPI00005A0F00#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRS
sp F6SI27#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRS
sp F1MF47#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRA
sp D5KB40#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRA
sp UPI0002236773#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHLR	L	LRK
sp G3TI10#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHLR	L	LRK
sp G1SDP0#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHLR	L	LRA
sp D2HX08#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRS
sp G1M8J2#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRS
sp G3R8Z9#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHLR	L	LRS
sp UPI0001DEC3FE#1	VEFYFLSQYVSEADSEFRHIFLGRGDHTLGCALLDHVR	L	LRS

- Estudos *in silico*
 - Polyphen

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **0.963** (sensitivity: 0.78; specificity: 0.95)



Estudos *in vitro*

Mutação de *splicing* - TFR2:c.967-1G>C

- Indivíduo ♂, 69 anos:
 - Ferritina: 1930 ng/ml
 - Saturação de transferrina: 100%

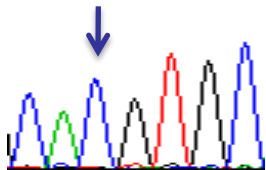
Resultados da NGS

Gene	#CHROM	QUAL	FILTER	GT (genotype)	AD (allelic depth)	DP (read depth)	GQ (genotype quality)	VF (variant frequency)	ID
TFR2	chr7	10655,17	PASS	homoz.	0;453	435	99	1.000	c.973-1G>C

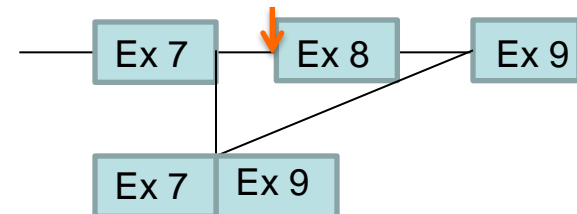
1) Estudos *in silico* - Human Splicing Finder

Confirmação por Sanger:

C A C G T G C



Sinais de <i>Splicing</i>	Score da sequência nativa (1-100)	Score da sequência alterada (1-100)	Variação (%)
Local aceitador de <i>Splicing</i>	98,12	69,18	-29,5

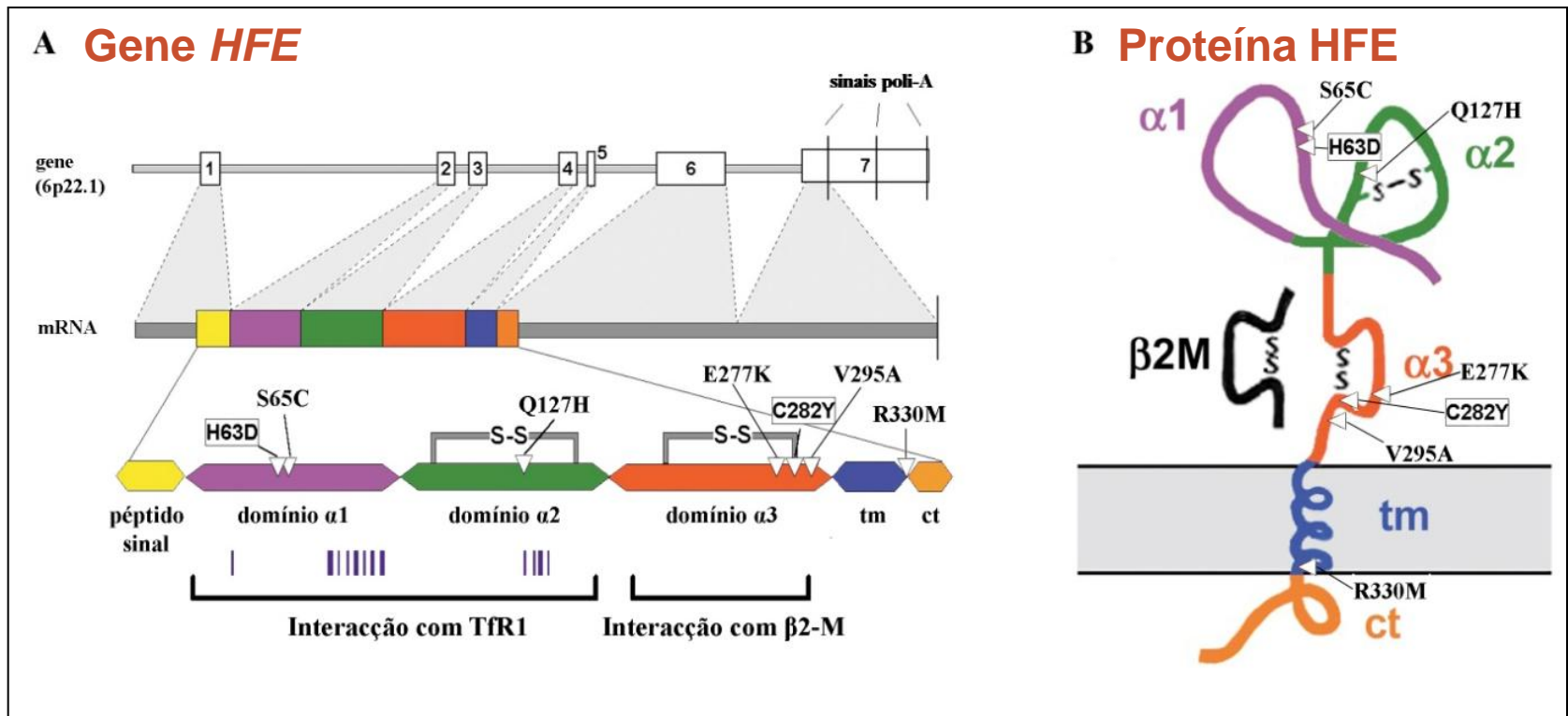


2) Estudos *ex-vivo*: procura dos transcritos anómalos no doente

Determinação da patogenicidade de mutações novas:

- Estudos funcionais de mutações *missense*
o exemplo da HFE p.E277k e V295E

HFE – estrutura do gene e proteína



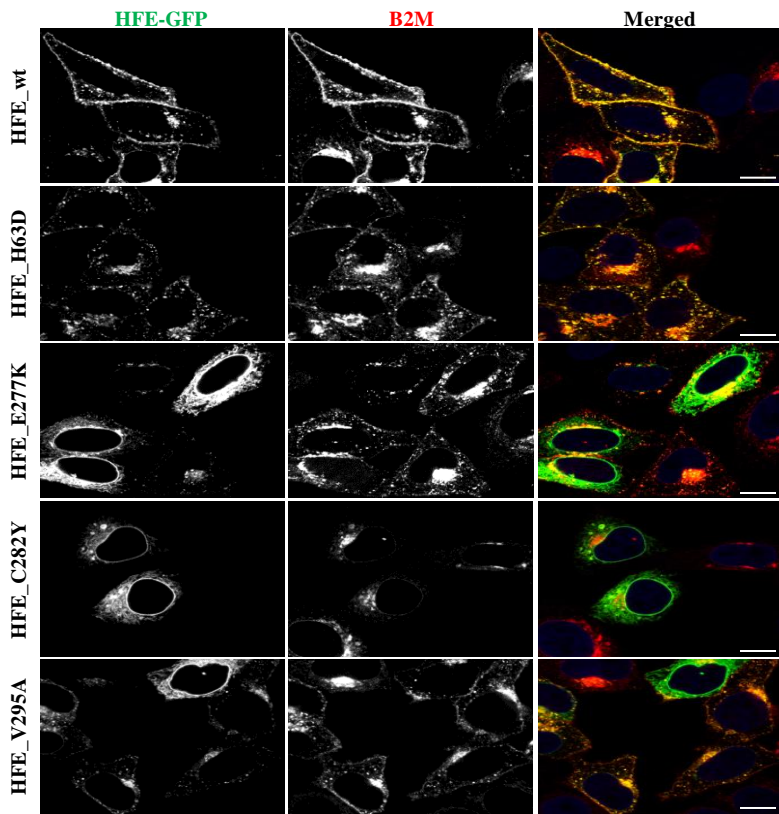
A proteína **HFE** encontra-se associada à **beta2-microglobulina** (pelo seu domínio $\alpha 3$) ancorada à superfície celular, sobretudo dos enterócitos, hepatócitos e monócitos.

Compete com a Transferrina ligada ao ferro (Fe_3Tf) para o seu recetor (TfR1).

Liga-se ao TfR1 pelos seus domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$.

Estudo da patogenezidade de variantes *missense* exemplo: p.Glu277Lys (E277K)

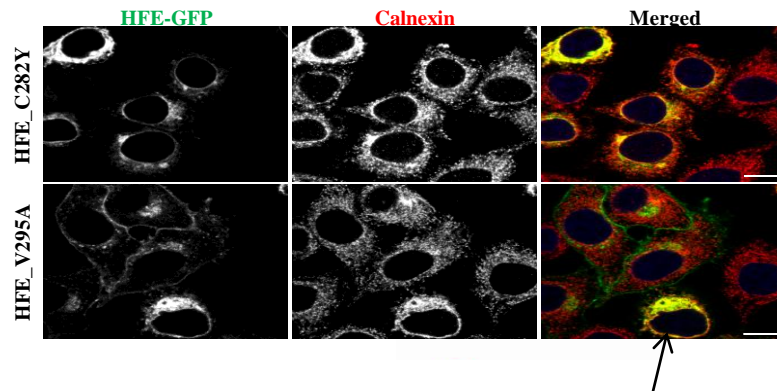
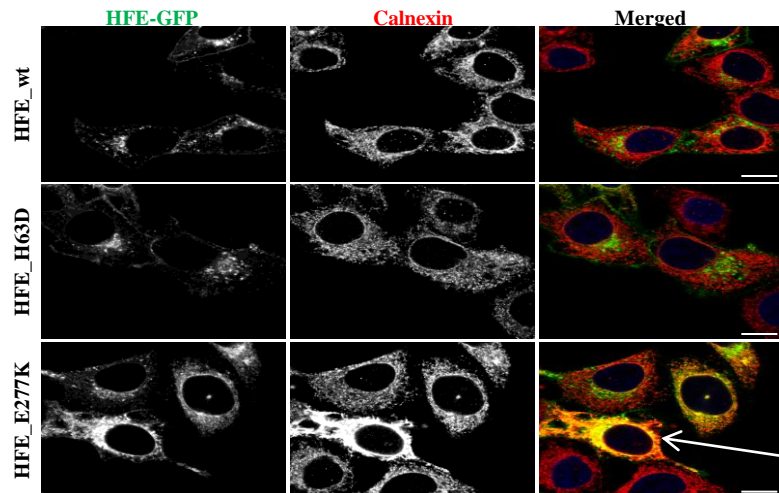
- **Segregação** na família associada a fenótipo?
- **Frequência** na população superior a 1% (polimorfismo)?
- **Estudos *in silico*:**
 - Glu277 é conservado entre espécies?
 - Diferença entre os aa – perturbação na estrutura e função da proteína. Ex: Glu (carga negativa) > Lys (carga positiva)
- **A localização** no domínio $\alpha 3$ da proteína HFE poderá afetar a ligação ao *chaperone* $\beta 2M$ e assim impedir o processamento e transporte para a superfície da membrana. > **estudos de expressão *in vitro*** (linhas celulares)



Padrão de localização celular das proteínas HFE mutadas - Ensaios de imunofluorescência

- pEGFP-N1 + cDNA de HFE (*green fluorescent protein*)
- Mutagênese dirigida – introdução das mutações E277K, V295A e os controles H63D e C282Y.
- Expressão em linhas celulares (HeLa).
- Incubação com anticorpos anti- β 2M e Calnexina (RE).
- Microscopia confocal.

↘ **Não co-localiza com β 2M**



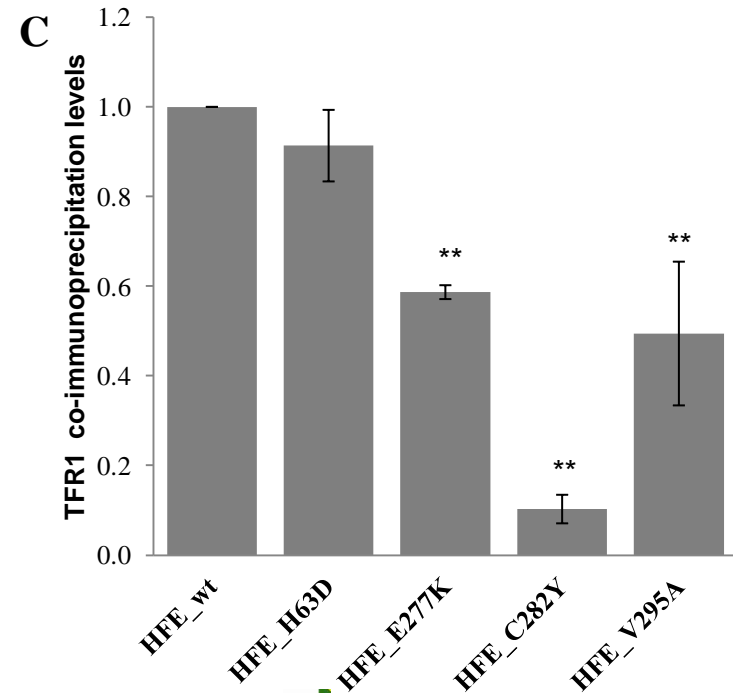
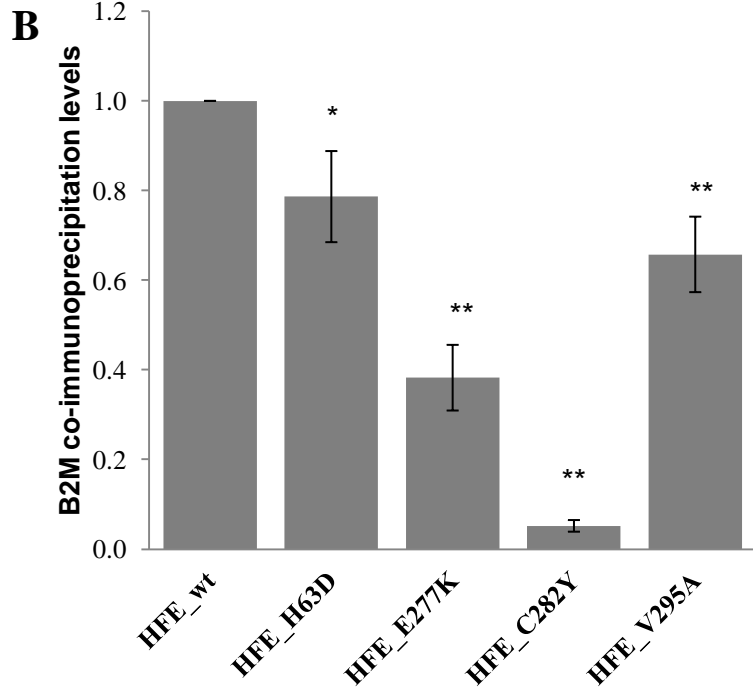
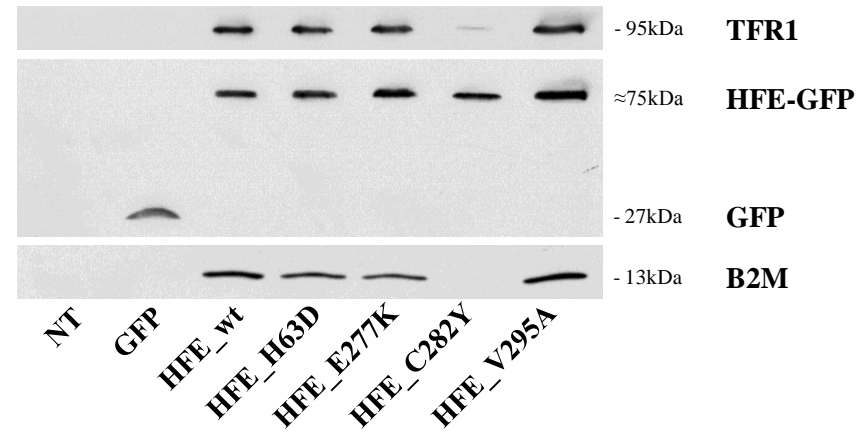
Co-localiza com calnexina (RE)

Ensaio de imunoprecipitação das variantes proteicas da HFE

- Os ensaios anteriores permitem visualizar por microscopia de fluorescência a **localização** das proteínas mutantes no interior das células.
- Seguidamente pretendeu-se **ensaios de imunoprecipitação** que permitem as **associações físicas com outras proteínas** (neste caso a β 2M e TfR1)
- Linha celular HeLa
- Transfeção com as construções :
pEGFP+HFE_wt, pEGFP+HFE_H63D , pEGFP+HFE_C282Y,
pEGFP+HFE_E277K e pEGFP+HFE_V295A
- Incubação com anticorpo anti-GFP
- *Western blotting*

Western blotting

A- Imunoprecipitação com a.c. anti-GFP



B e C - Ensaios de co-imunoprecipitação com β 2M e TFR1 para as variantes de HFE

Estudos funcionais de uma variante de HFE resultante de *splicing alternativo*

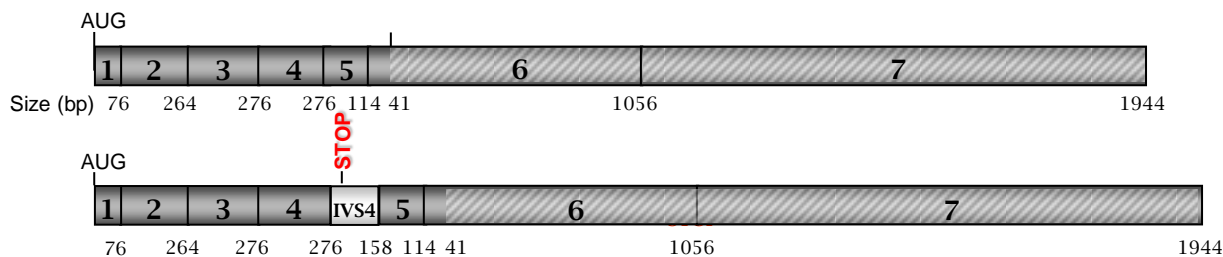
Estudo da função fisiológica da isoforma solúvel da HFE

O transcrito principal do gene *HFE* (mRNA *full length*) tem 4,2 kb.

Existem, adicionalmente, vários outros transcritos *HFE* resultantes de processos de ***splicing* alternativo**.

Uma vez que **identificámos um novo transcrito *HFE* devido à inserção do intrão 4**, pretendeu-se investigar:

- o seu nível de expressão em diferentes tecidos,
- a correspondente estrutura da proteína e localização celular
- o seu possível papel fisiológico .



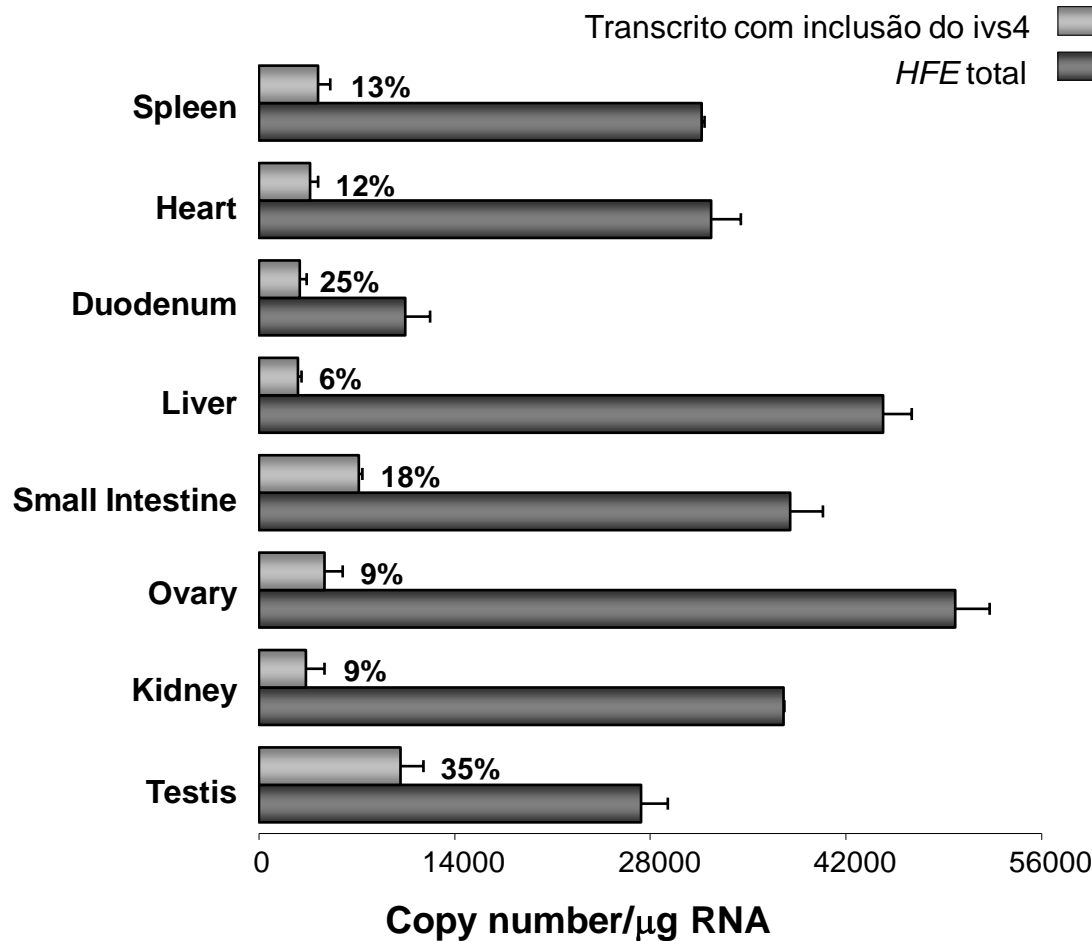
Transcrito *HFE* full length

Novo transcrito *HFE* devido a ***splicing* alternativo** (inclusão do intrão 4; *HFE_ivs4*)

Transcrito *HFE* full length e transcrito alternativo devido à inclusão do intrão 4 (contém um codão de **STOP** prematuro)

- Exão
- Intrão
- ▨ Região não codificante

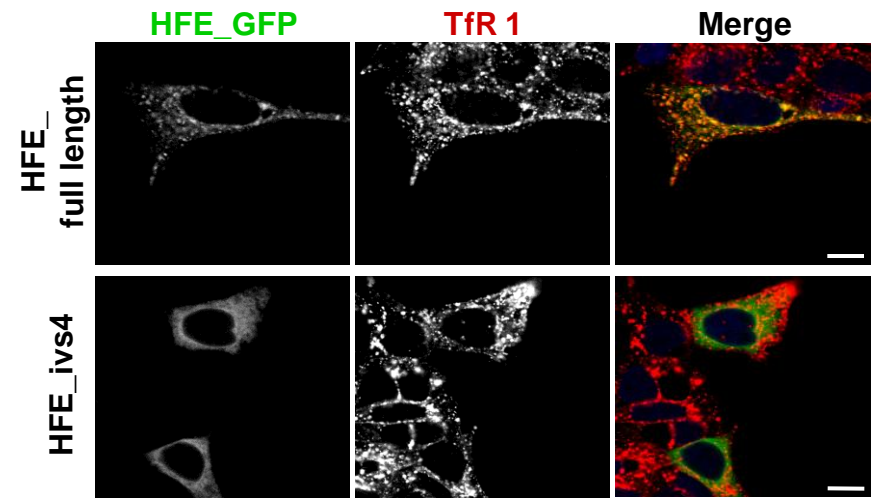
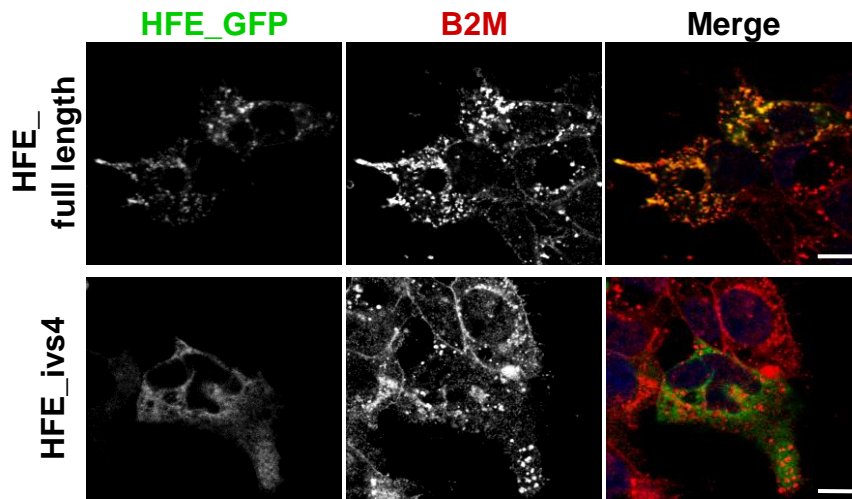
1) Expressão do transcrito “*HFE_ivs4*” em diferentes tecidos humanos



PCR quantitativo em tempo –real (RT-qPCR)

✓ O transcrito “*HFE_ivs4*” tem uma expressão **ubiquitária**.

2) Co-localização celular da variante proteica HFE_ivs4 em células hepáticas

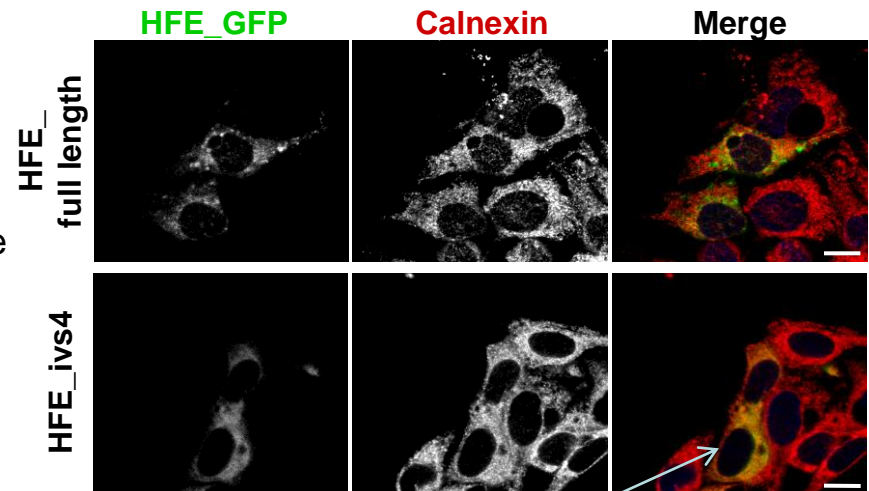


Imunofluorescência (HepG2)

Os cDNAs de *HFE* foram ligados a GFP no vetor pEGFP-N1. As construções foram usadas para transfetar células HepG2. A localização das respetivas proteínas foi efetuada usando anticorpos contra a β -2M, TfR1 e calnexina.

✓ A proteína “HFE_full length” co-localiza com a β -2M e com o TfR1, a maior parte dela à superfície celular. Não co-localiza com a calnexina (marcador do ER).

✓ A proteína “HFE_ivs4” co-localiza pouco com a β -2M, não co-localiza com o TfR1 e co-localiza com a calnexina.



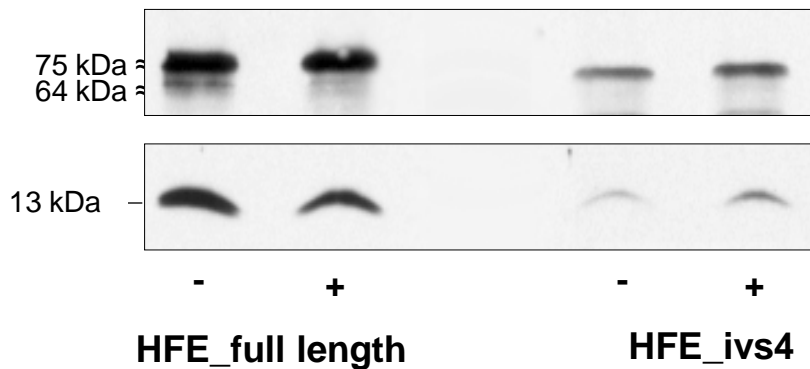
Co-localiza com a calnexina

Bar represents 10 μ m

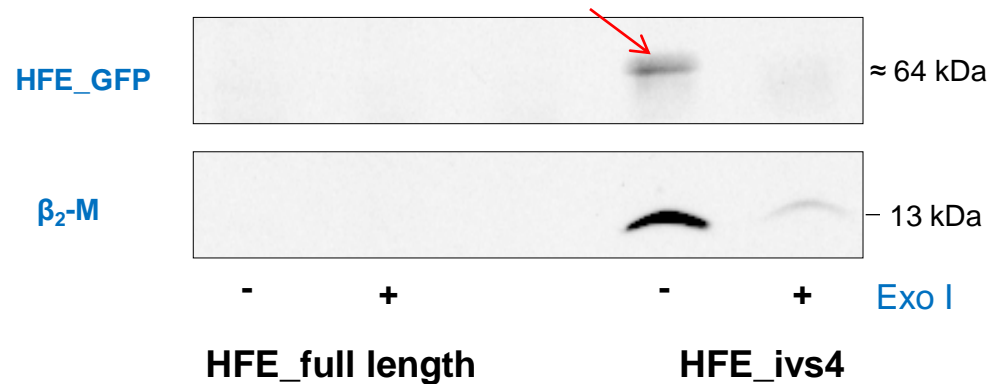
3) Secreção celular da proteína variante HFE_ivs4

Ensaio de Imunoprecipitação (HepG2; deteção com os anticorpos anti-GFP e β -2M)

Lisados celulares



Sobrenadante das culturas celulares



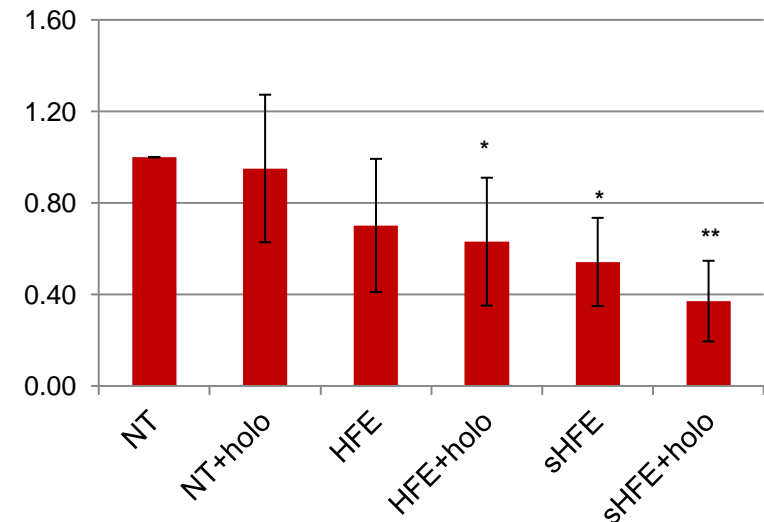
✓ As proteínas “*HFE_full length*” e “*HFE_ivs4*” encontram-se associadas à β 2M nos lisados celulares, contudo, **apenas a variante “*HFE_ivs4*” é encontrada no sobrenadante** das culturas celulares.

✓ **A proteína “*HFE_ivs4*” é uma variante truncada e solúvel (sHFE) da proteína HFE** que é segregada pelas células mantendo a sua interação com a β -2M.

4) Efeito da variante sHFE na expressão de genes relacionados com o metabolismo do ferro numa linha celular duodenal (HuTu-80)

- **Transfeção** de **células HuTu-80** com construções que expressam a **HFE** ou a **sHFE**, seguida, ou não, de estímulo com ferro (holotransferrina).
- **Quantificação da expressão** de vários genes relacionados com o metabolismo do ferro por PCR quantitativo em tempo real.
- A expressão do gene da **Hefastina (HEPH)** é **bastante inibida pela sobreexpressão da sHFE**.
- Estudos em **biópsias de duodeno humano** mostraram uma **correlação negativa** entre o nível dos transcritos da sHFE e o nível dos transcritos da hefastina - **corroborou os resultados obtidos in vitro**

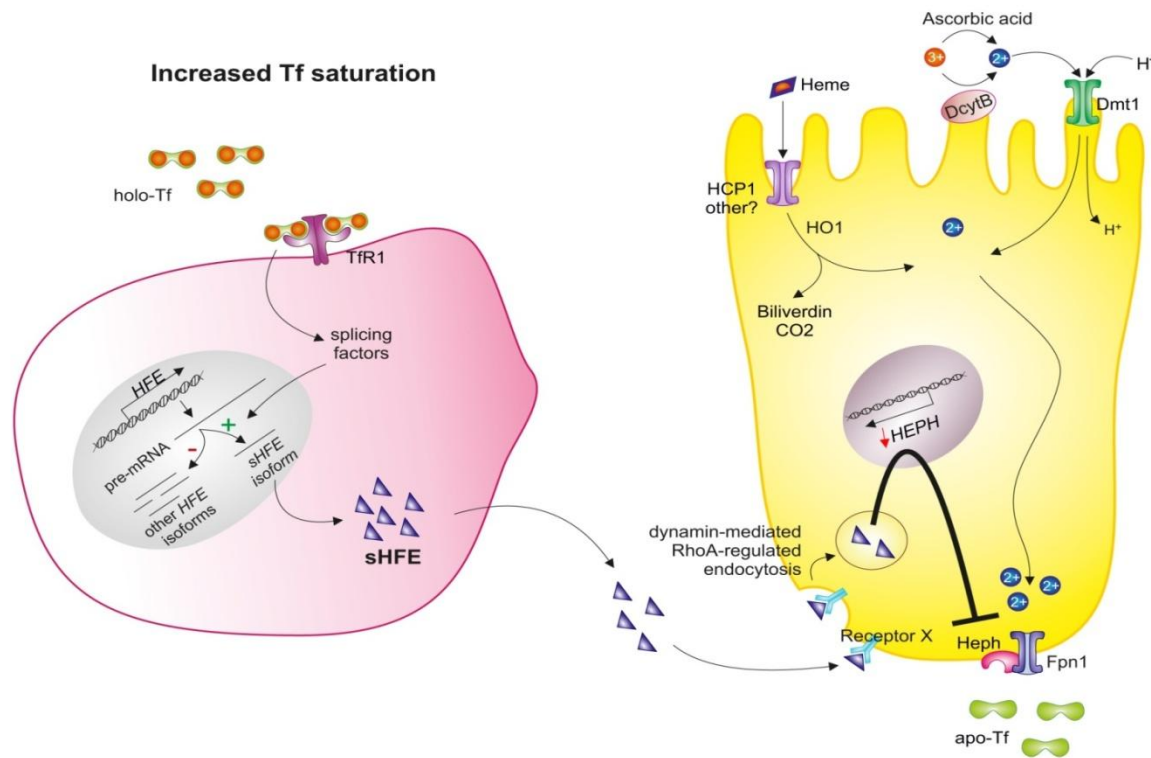
HEPH



NT – não transfetado

* p -value<0.05; ** p -value<0.01, uncaudal student's t-test

Mecanismo proposto de atuação da sHFE ao nível do duodeno



Pensamos que a sHFE é expressa em diversos tipos de células. **A sua expressão é aumentada por aumento de ferro** no organismo. É então lançada para a corrente sanguínea a atua, remotamente, no duodeno, **diminuindo a expressão da hefastina** o que diminui a absorção do Fe proveniente da alimentação.

Assim, a sHFE contraria a sobrecarga em ferro e contribui para a homeostase deste elemento no organismo.

- ***Patologias associadas a carência em ferro***

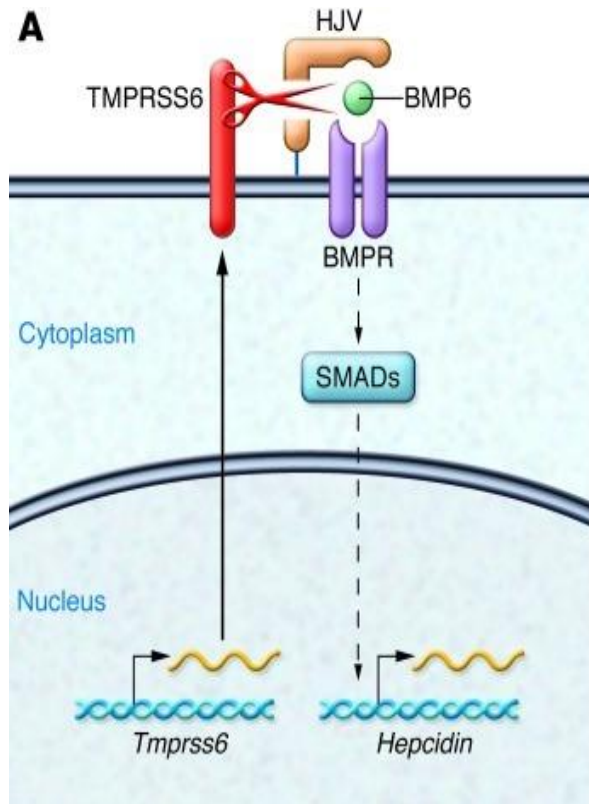
Anemias relacionadas com o ferro:

Anemia ferropénica – bastante frequente, devida a carência de ferro na alimentação. Tem também uma componente genética?

IRIDA - Iron Refractory Iron Deficiency Anaemia

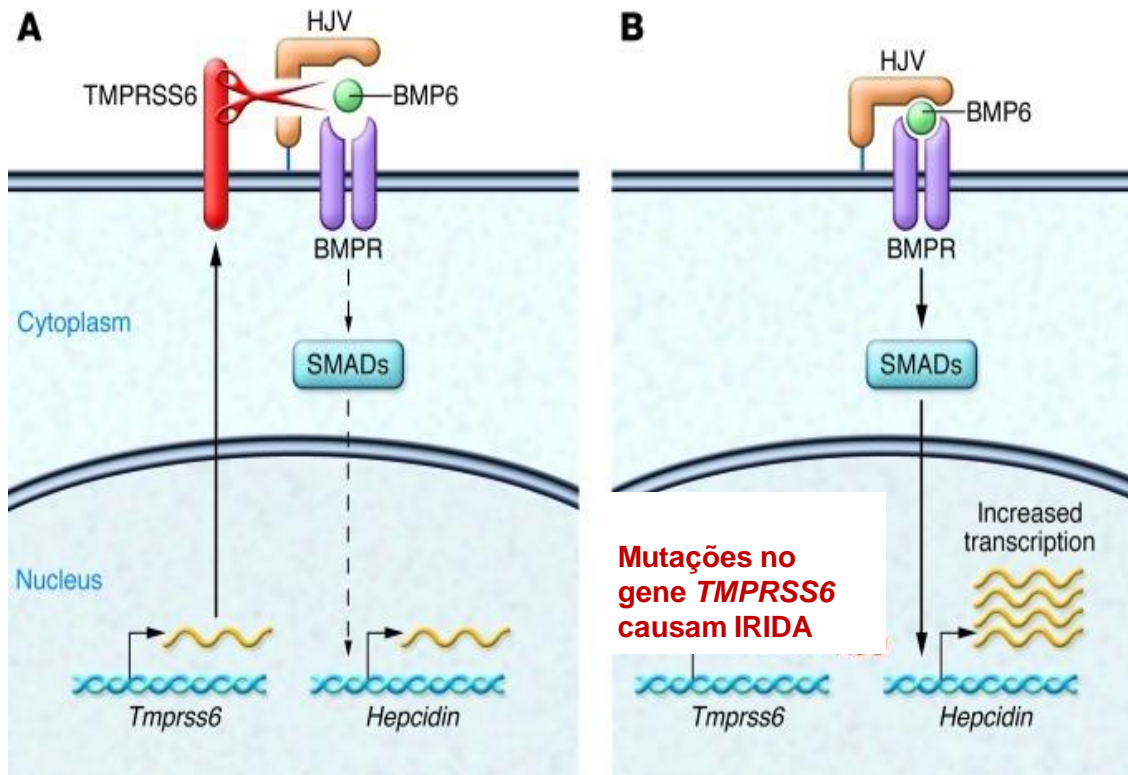
Anemia rara, devida à incapacidade de absorver o ferro da alimentação.

Regulação da expressão de hepcidina pela HJV / Matriptase 2



A 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 ativação da expressão de *HAMP* (gene da hepcidina).

Consequências de alterações no gene *TMPRSS6*



Situação fisiológica normal

Situação de IRIDA

Mutações no gene *TMPRSS6* causam a ineficiente atuação da Matriptase 2 sobre a HJV - consequentemente esta está continuamente a estimular a expressão de *HAMP*.

Níveis elevados de Hepcidina reprimem a absorção de ferro >>> anemia.

Mutações graves no gene *TMPRSS6* – causam **IRIDA** (*Iron deficiency iron refractory anaemia*).

Há um bloqueio na absorção do ferro pelos enterócitos do intestino devido aos **altos níveis da hormona hepcidina**.

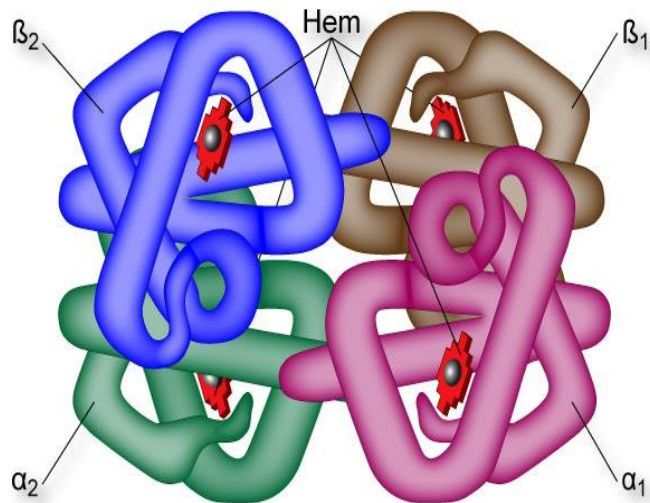
Trabalhos seguintes

- Implementação e aplicação da metodologia de ***next-generation sequencing*** para o estudo da base molecular da IRIDA e das **anemias ferropénicas hereditárias** graves em Portugal.
- Estudos funcionais das novas variantes nos genes relacionados com o metabolismo do ferro detetadas por NGS.

OUTRAS ANEMIAS HEREDITÁRIAS

- Outras causas genéticas de ANEMIA não relacionadas com o nível de ferro

A Hemoglobina e os glóbulos vermelhos



Molécula de Hb A = $\alpha_2\beta_2$



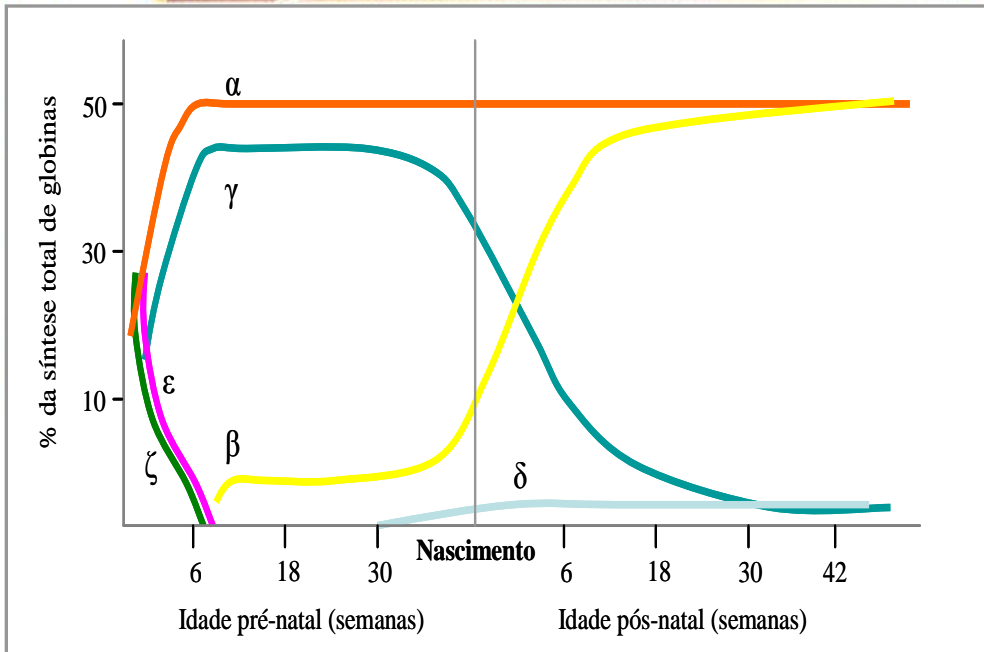
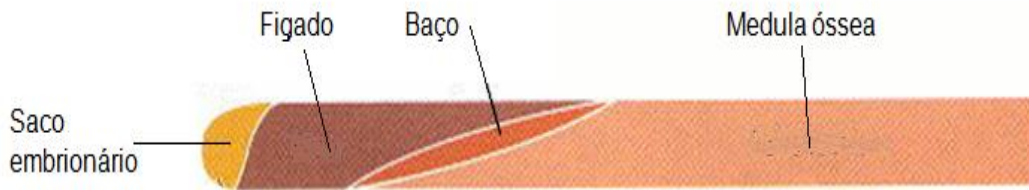
Glóbulos Vermelhos

A **Hemoglobina** é o principal constituinte dos GV do sangue, responsável por 90% do peso seco da célula madura.

A sua principal função é ligar e transportar o **oxigénio** proveniente do ar dos pulmões para os tecidos e aí libertá-lo.

As diferentes hemoglobinas ao longo do desenvolvimento

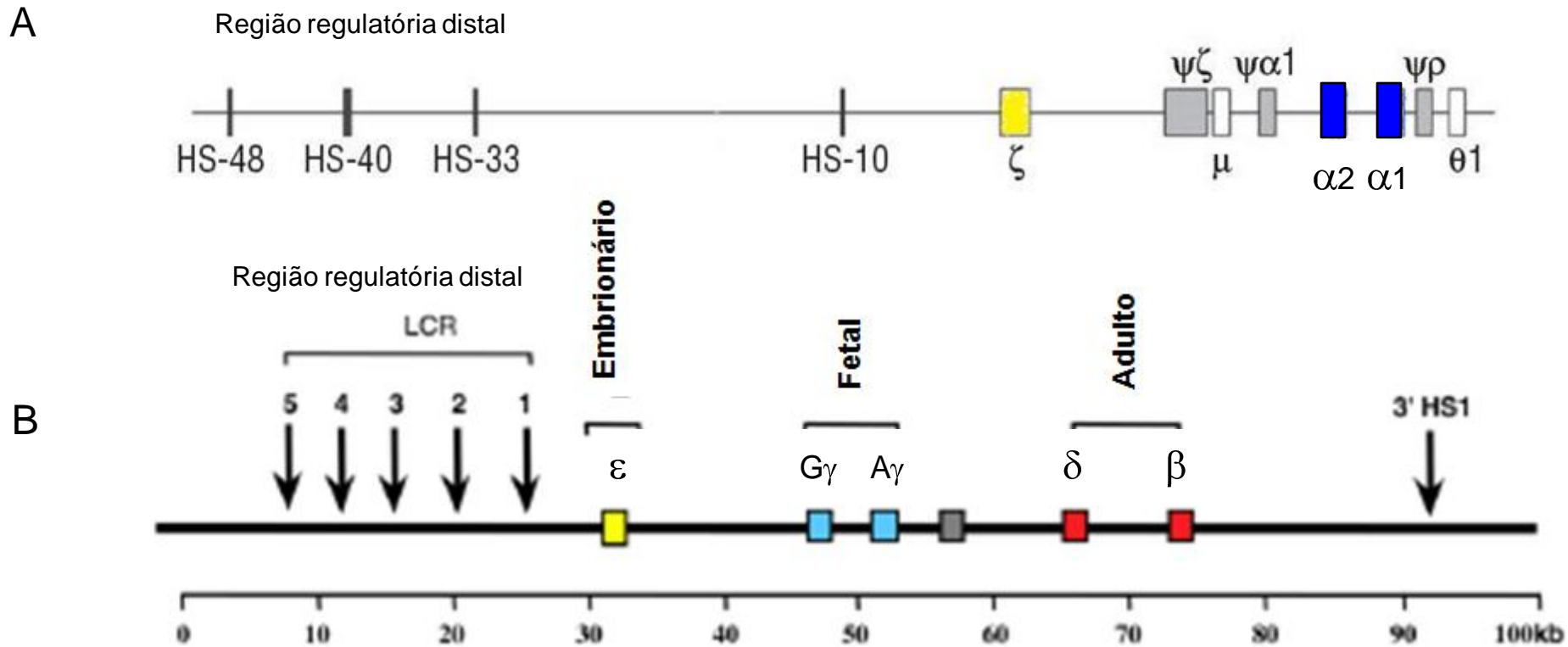
Local da eritropoiese



Período Embrionário	Período Fetal	Período Adulto
Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$)		HbA ($\alpha_2\beta_2$)
Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$)	HbF ($\alpha_2\gamma_2$)	HbA ₂ ($\alpha_2\delta_2$)
Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$)		

Expressão diferencial das globinas ao longo do desenvolvimento

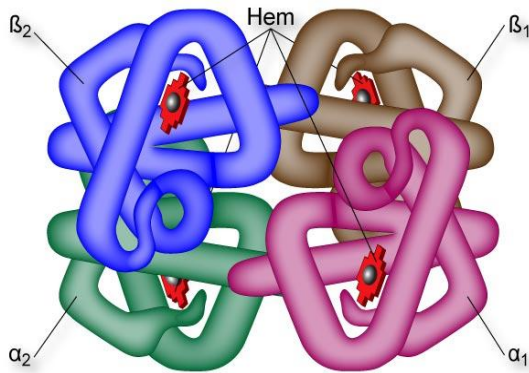
A estrutura dos agrupamentos génicos das globinas



A - Agrupamento génico da α -globina (cromossoma 16)

B - Agrupamento génico da β -globina (cromossoma 11)

A Hemoglobina e as Hemoglobinopatias



Molécula de Hb A = $\alpha_2\beta_2$

Hemoglobinopatias

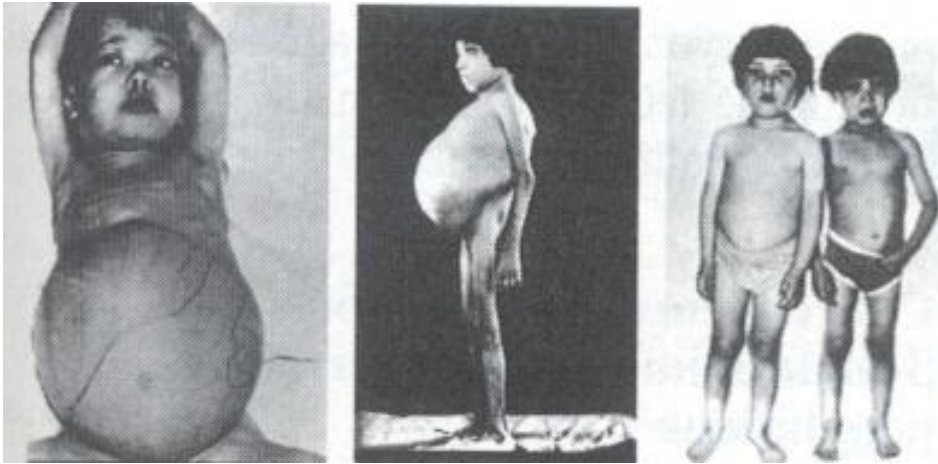
Quantitativas - Talassémias

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 homocigótico ou composto heterocigótico)
- 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. heterocigótico)

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

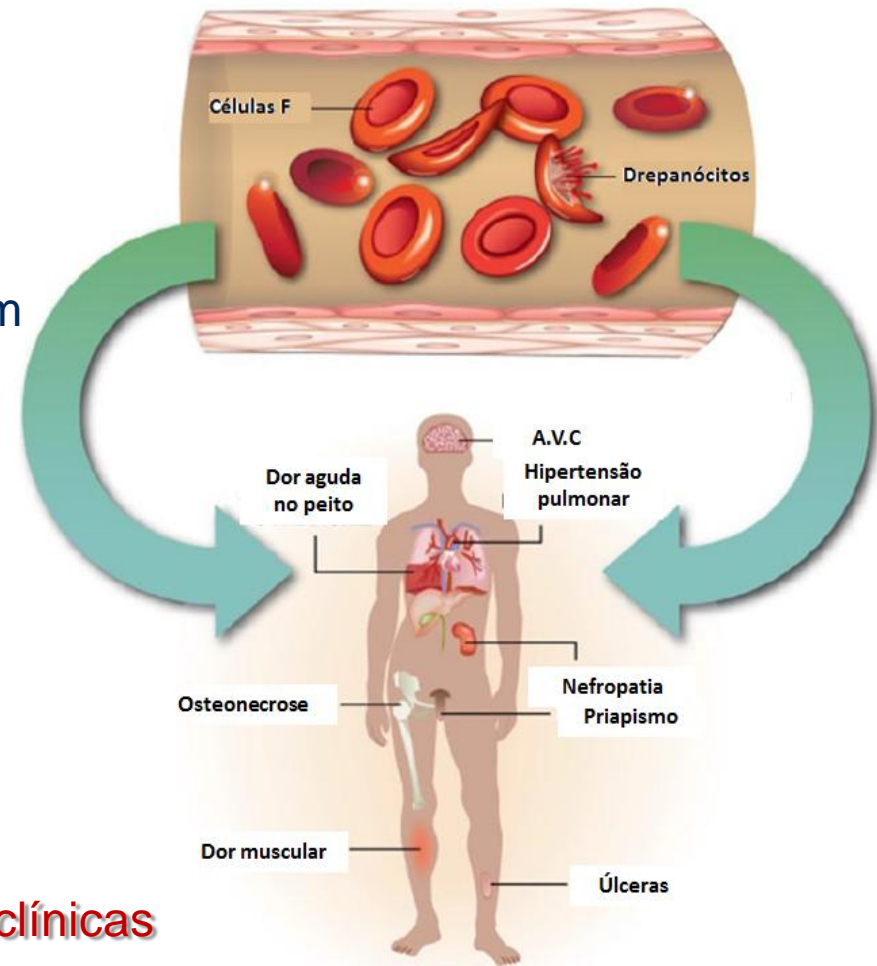
E sempre causada pela mesma mutação na beta-globina: Hb S
codão 6 $GAG > GTG$; *HBB*:c.20A>T (Ac. Glutâmico > Valina)

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

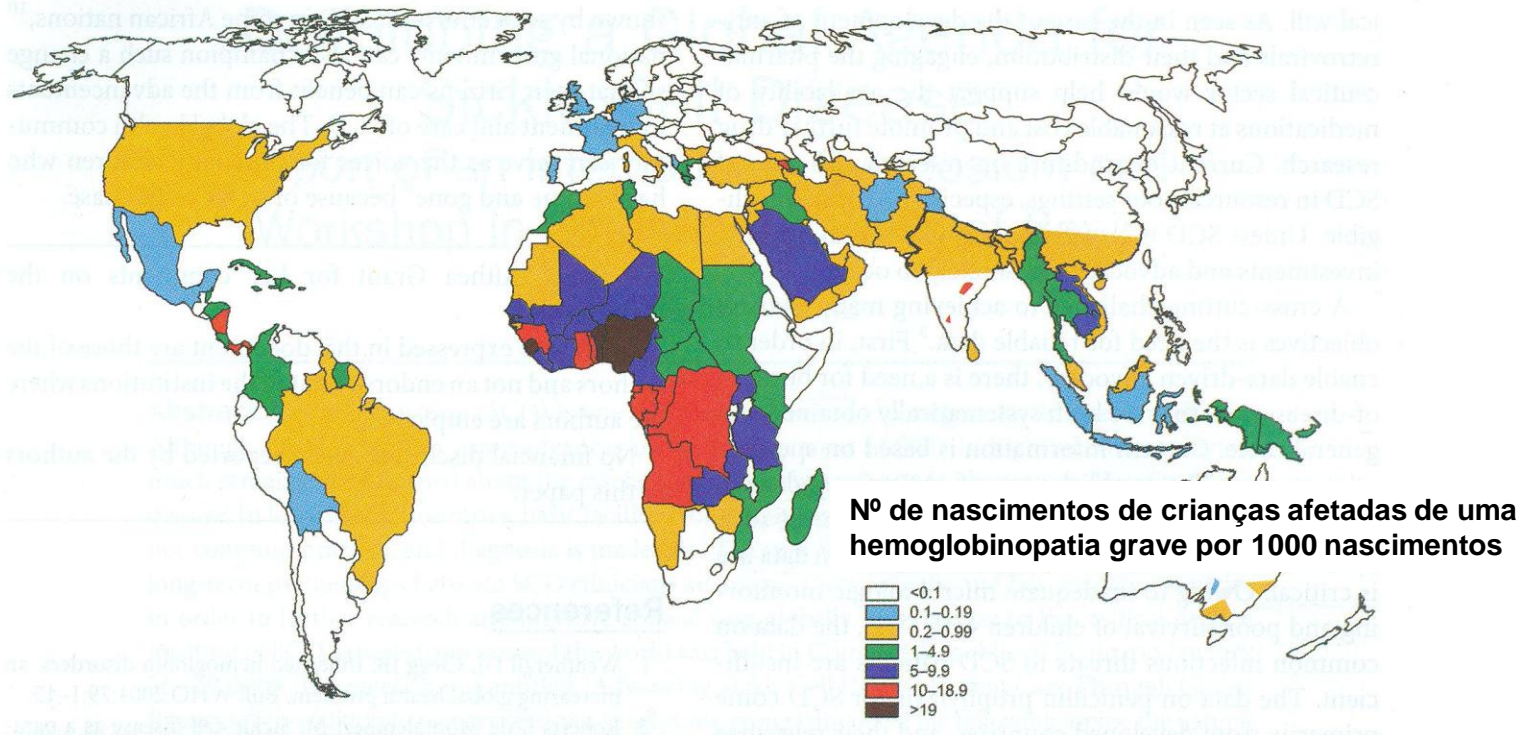
Formam-se grandes polímeros que deformam o GV em forma de foice = **drepanócitos**

- **Anemia hemolítica crônica** caracterizada por
 - hemólise crônica,
 - eventos recorrentes de vaso-oclusão,
 - infecções,
 - consequente 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.

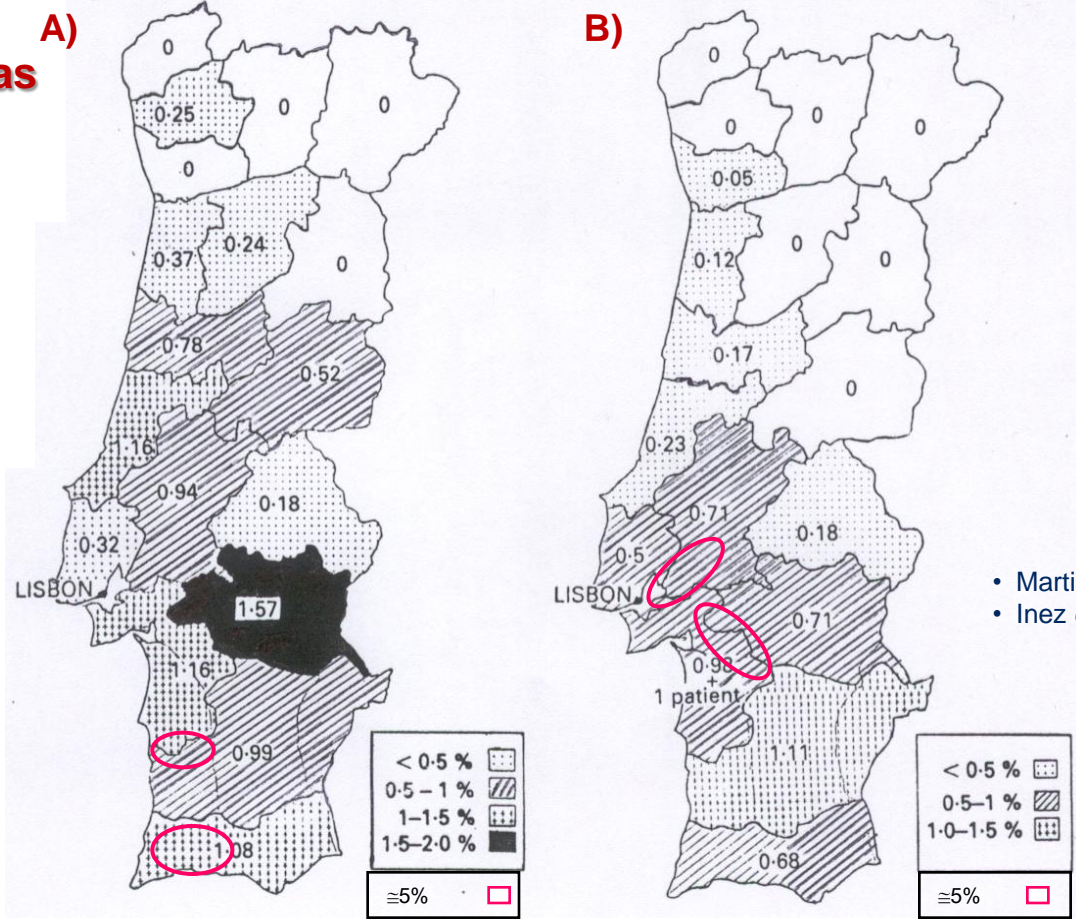
Investigação em Hemoglobinopatias em Portugal

Primeiros objetivos:

- Conhecer a dimensão do problema em Portugal
- Caracterizar a população em termos de **epidemiologia molecular**
- Implementar um programa de **prevenção** baseado
 - ✓ **no rastreio dos portadores,**
 - ✓ **no aconselhamento genético e**
 - ✓ **no diagnóstico pré-natal.**

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.

Calcula-se 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.**



Investigação em Hemoglobinopatias / Saúde Pública

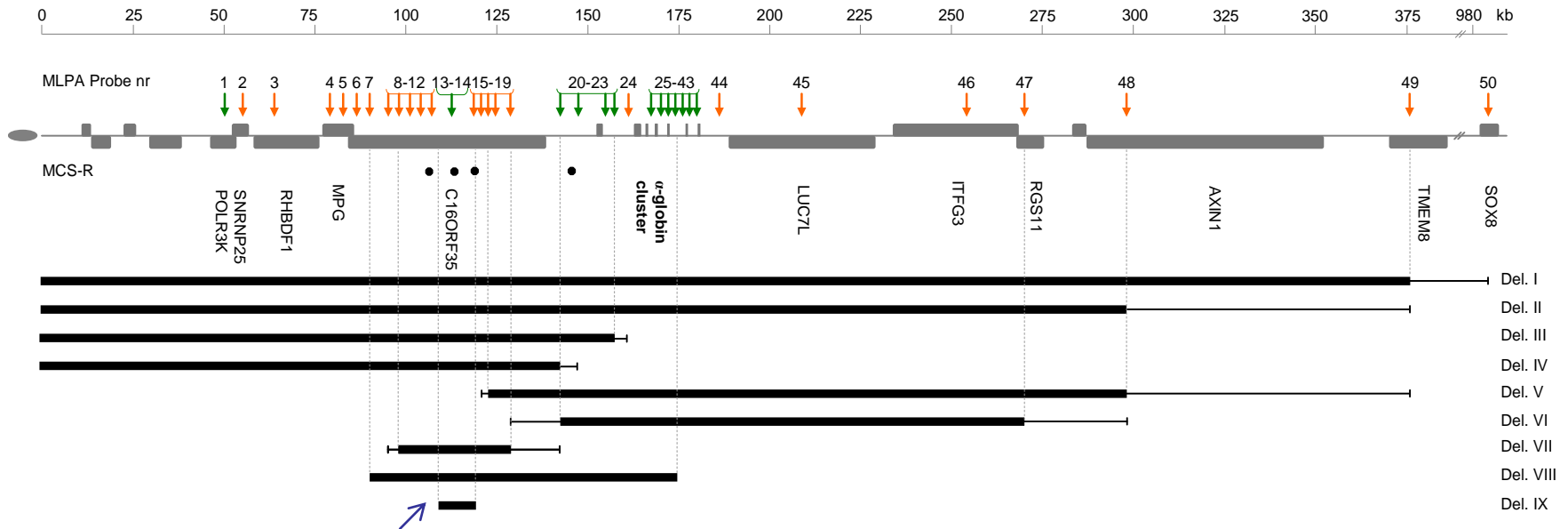
Objetivos atuais da investigação:

- a identificação e caracterização de novas associações genótipos/fenótipos
- a realização de estudos funcionais de novas mutações 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.

.....alguns exemplos:

Alfa-talassémia - pesquisa de grandes deleções nos agrupamento génicos globínicos e estudos dos mecanismos de regulação génica à distância

por multiplex ligation probe dependent amplification (MLPA)

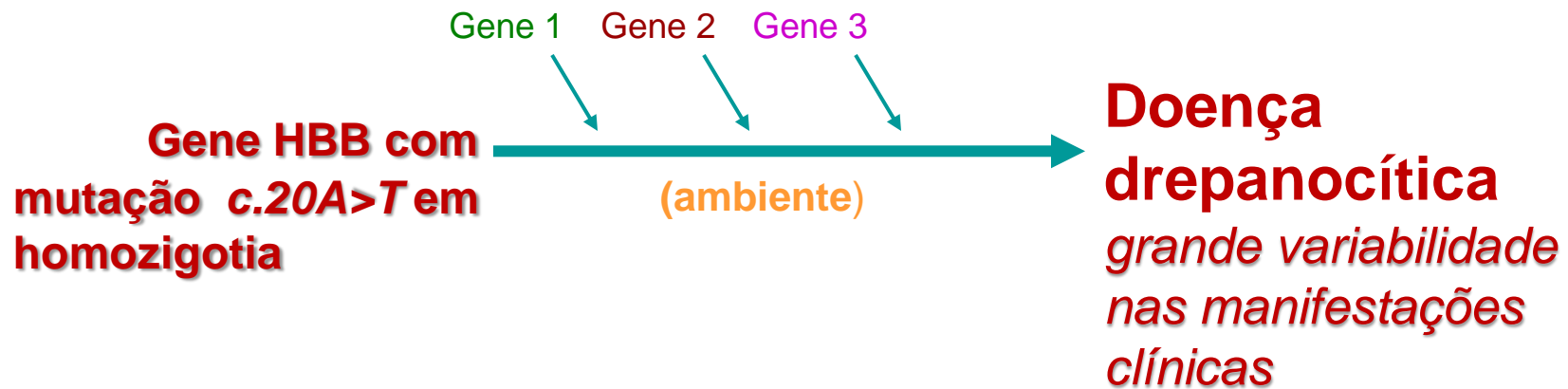


- Pesquisa de grandes deleções/inserções
- Caracterização funcional das novas lesões

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 dos mecanismos de regulação génica à distancia >>>> aumento do conhecimento sobre a **fisiopatologia** da doença.

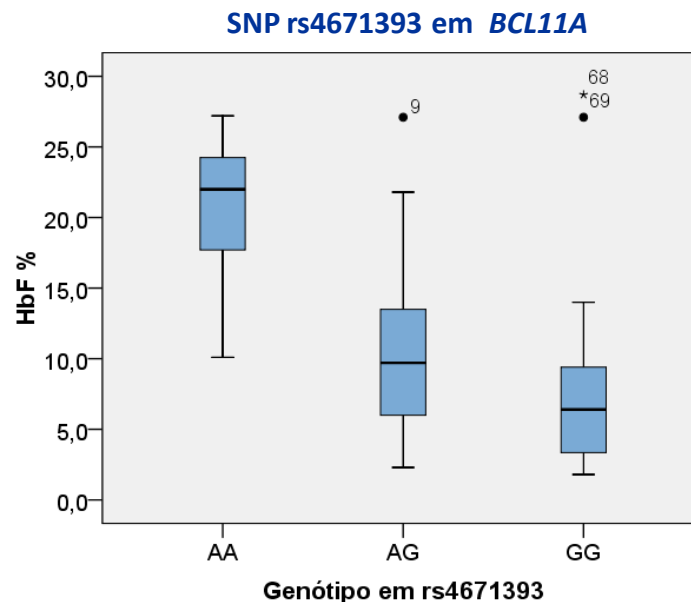
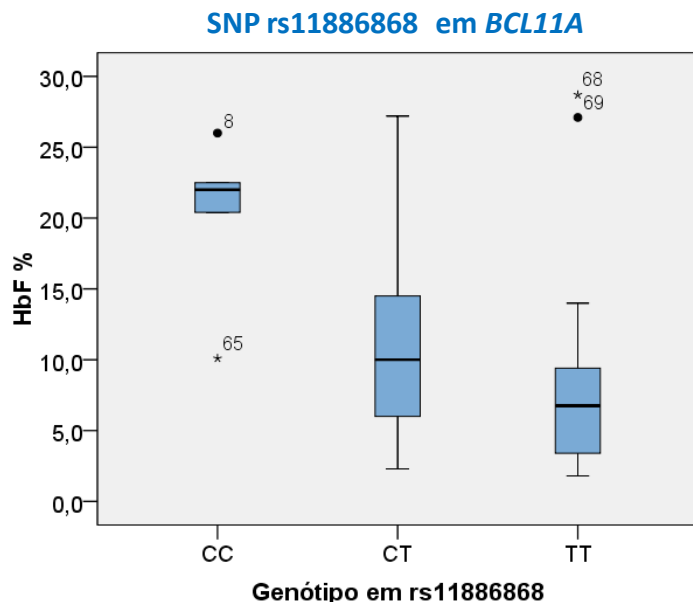
Anemia das Células Falciformes ou Drepanocitose – doença monogénica sob controlo poligénico



Objetivos:

- 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



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

A co-herança de níveis elevados de HbF com HbS resulta em menor morbidade e mortalidade.

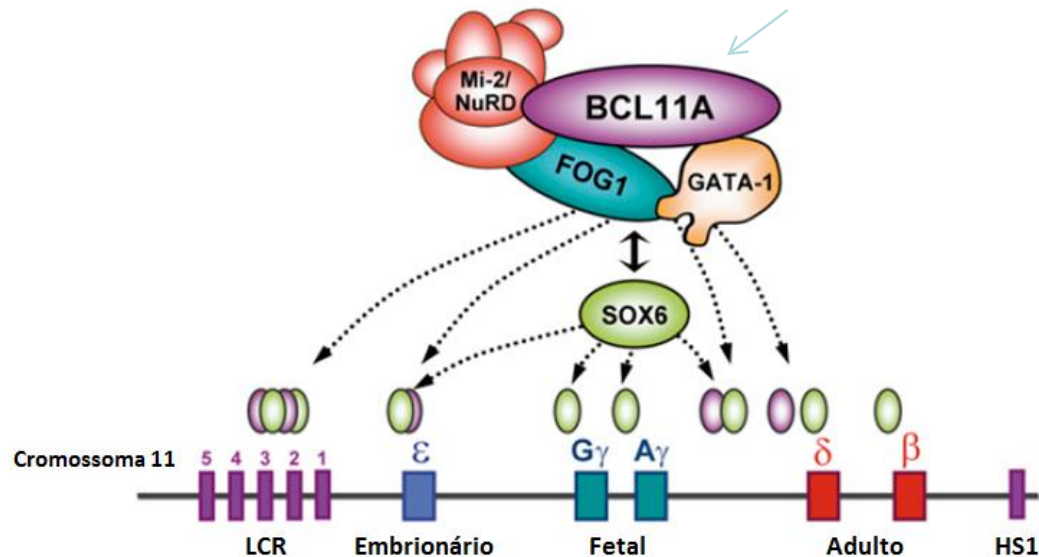
O nível elevado de Hb F é o principal agente modificador da doença.

Este conhecimento foi usado para o **tratamento farmacológico** da doença

(o medicamento **Hidroxiureia** >> aumento de Hb F >> melhoria dos sintomas, maior sobrevivência).

Relação entre *BCL11A* e os níveis de HbF e a terapia génica

Terapia génica



Adaptado de Xu *et al.* 2010

- O fator transcrricional BCL11A atua como um **repressor** da expressão dos genes globínicos fetais.
- A **diminuição dessa repressão** originará um aumento da expressão desses genes mesmo no período adulto determinando o **aumento da HbF ($\alpha_2\gamma_2$)**, que impede a polimerização da HbS, e consequentemente melhora o fenótipo e **diminui o número de internamentos hospitalares/ano**.

Agradecimentos



- INSA

Departamento de Genética Humana



- PTDC/SAU-GMG/64494/2006
- PEst-OE/SAU/UI0009/2011
- PIC/IC/83084/2007