

## Base molecular da hemocromatose hereditária não-clássica em Portugal

### Molecular basis of the non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal

Ricardo Faria<sup>1</sup>, Bruno Silva<sup>1</sup>, Catarina Silva<sup>1</sup>, Pedro Loureiro<sup>1</sup>, Ana Queiroz<sup>2</sup>, Jorge Esteves<sup>3</sup>, Diana Mendes<sup>4</sup>, Rita Fleming<sup>5</sup>, Luís Vieira<sup>1</sup>, João Gonçalves<sup>1</sup>, João Lavinha<sup>1,6</sup>, Paula Faustino<sup>1,7</sup>

[paula.faustino@insa.min-saude.pt](mailto:paula.faustino@insa.min-saude.pt)

(1) Departamento de Genética Humana, INSA. (2) Serviço de Pediatria, Hospital Garcia de Orta, Almada. (3) Serviço de Gastrenterologia, Hospital de Santo António dos Capuchos, Centro Hospitalar Lisboa Central, Lisboa. (4) Serviço de Medicina Transfusional, Hospital São Francisco Xavier, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa.

(5) Serviço de Imuno-Hemoterapia, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa. (6) BiolSI, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

(7) Instituto de Saúde Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

#### \_Resumo

A Hemocromatose Hereditária (HH) é uma doença autossómica recessiva caracterizada pela absorção excessiva de ferro a nível intestinal e sua acumulação em órgãos vitais, podendo originar cardiomiopatia, cirrose e carcinoma hepatocelular. O correspondente diagnóstico molecular é obtido pela associação com genótipos específicos no gene *HFE* (homozigotia para p.Cys282Tyr ou heterozigotia composta p.Cys282Tyr/p.His63Asp). Contudo, nos países do sul da Europa, cerca de um terço dos doentes com diagnóstico clínico de HH não apresenta os referidos genótipos. Para identificar a base molecular da HH não-clássica em Portugal usaram-se metodologias de pesquisa geral de variantes genéticas (SSCP e dHPLC), *Next-Generation Sequencing* (NGS) e sequenciação de Sanger, cobrindo seis genes relacionados com o metabolismo do ferro em 303 doentes. Identificaram-se 69 variantes diferentes e de vários tipos, por ex. *missense*, *nonsense*, de *splicing*, que perturbam a transcrição do gene ou a regulação da tradução do mRNA. Seguidamente, realizaram-se estudos *in silico* e *in vitro* para esclarecer o significado etiológico de algumas das novas variantes. Concluiu-se que a base molecular desta patologia é bastante heterogénea e que a NGS é uma ferramenta adequada para efetuar a análise simultânea dos vários genes num grande número de amostras. Contudo, o estabelecimento da relevância clínica de algumas variantes requer a realização de estudos funcionais.

#### \_Abstract

*Hereditary Hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder characterized by excessive intestinal iron absorption and deposition in vital organs leading to cardiac failure, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Molecular diagnosis of common HH is made by the presence of specific genotypes in HFE gene (p.Cys282Tyr homozygosity or p.Cys282Tyr/p.His63Asp compound heterozygosity). However, in Southern European countries up to one third of the patients with a clinical diagnosis of HH do not have these genotypes. In order to identify the molecular basis of the non-classical HH in Portugal, we used genetic screening methods for the detection of unknown mutations (SSCP and dHPLC), Next-Generation Sequencing (NGS) and/or Sanger sequencing in six HH-related genes in 303 patients. Sixty-nine different variants were identified, including missense, nonsense and splicing variants, and variants that impair gene transcription or mRNA translation regulation. In silico and in vitro studies were performed to know the likely etiologic significance of some of the novel variants found. We can conclude that*

*the molecular basis of the non-classical HH in Portuguese population is largely heterogeneous. NGS revealed to be an appropriate tool for fast analysis of the HH-related genes in a large number of samples. However, establishing the clinical relevance of some novel variants requires further functional studies.*

#### \_Introdução

A Hemocromatose Hereditária (HH) clássica (HH-tipo 1; OMIM#235200) é uma doença genética autossómica recessiva, comum em Caucasianos, caracterizada por absorção aumentada de ferro a nível intestinal e consequente acumulação em vários órgãos, podendo originar cirrose hepática, carcinoma hepatocelular, cardiomiopatias, etc. É uma patologia de manifestação tardia cujo gene associado é o *HFE* (*High Fe*). No norte da Europa, a grande maioria dos doentes com HH tem a variante *HFE:c.845G>A,p.Cys282Tyr* em homozigotia. Uma segunda variante neste gene, a *c.187C>G,p.His63Asp*, tem também sido implicada no desenvolvimento da doença quando em heterozigotia composta com a anterior (1). Pelo contrário, nos países do sul da Europa cerca de um terço dos doentes com HH não apresenta os genótipos acima referidos (1,2). Nestes casos poderão estar envolvidos outros genes relacionados com o metabolismo do ferro e, então, estaremos em presença de uma doença rara, a HH não-clássica, que se classifica em vários tipos (revisto em (3)).

A HH-tipo 2, também chamada de Hemocromatose Juvenil (HJ), é a forma mais grave da doença. Nesta, a sobrecarga em ferro instala-se a um ritmo mais acelerado e os indivíduos apresentam cardiomiopatia e problemas endócrinos ainda em

jovens. A HJ deve-se a alterações no gene da Hemojuvelina (*HJV*; HH-tipo 2a; OMIM#602390) ou da Hepsidina (*HAMP*; HH-tipo 2b; OMIM#613313). Por outro lado, na HH-tipo 3 (OMIM#604250) o gene envolvido é o do Receptor 2 da Transferrina (*TFR2*). Neste caso são observados sintomas clínicos semelhantes aos da HH-tipo 1 mas, por vezes, de manifestação mais precoce. Por último, a HH-tipo 4 (OMIM#606069) é causada por alterações no gene da ferroportina (*SLC40A1*), sendo por isso também designada de Doença da Ferroportina, e ao inverso das anteriores apresenta transmissão autossómica dominante.

### \_Objetivos

Neste trabalho pretendeu-se identificar a base molecular da HH não-clássica na população portuguesa, bem como avaliar a metodologia de genética molecular mais adequada para o seu diagnóstico.

### \_Materiais e métodos

Foram estudados 303 doentes selecionados pelos clínicos segundo os critérios: persistência de parâmetros aumentados do status do ferro (ferritina sérica >400 µg/L e saturação da transferrina >50 %), ausência de fatores de risco ambiental (alcoolismo e hepatite) e ausência dos genótipos de risco em *HFE*.

Numa primeira fase os métodos utilizados para a pesquisa geral de alterações genéticas foram o *Single-Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP) e a *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography* (dHPLC) (4). Numa segunda fase usou-se a *Next-Generation Sequencing* (NGS). Para tal, foi desenhado um painel com 97 amplicões, cobrindo as regiões codificantes, as junções exão/intrão e as regiões transcritas não traduzidas de seis genes relacionados com o metabolismo do ferro (*HFE*, *TFR2*, *HJV*, *HAMP*, *SLC40A1* e *FTL*, o gene da cadeia leve da ferritina) perfazendo uma sequência cumulativa de 12115 pb. As bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando o *kit TruSeq Custom Amplicon* (Illumina), sequenciadas no *MiSeq* (Illumina) e as sequências foram comparadas com o genoma humano de

referência hg19 no *software* MiSeqReporter. A sequenciação de Sanger foi realizada usando o *kit BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing* e o sequenciador 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems).

### \_Resultados

Em 215 doentes, com fenótipo clínico e bioquímico compatível com HH e que cumpriam os critérios acima mencionados, realizou-se uma pesquisa geral de alterações nos genes *HFE*, *TFR2*, *HJV* e *HAMP*, pelos métodos de SSCP ou dHPLC. Estas foram posteriormente identificadas por sequenciação de Sanger (4). Numa segunda fase analisaram-se mais 88 doentes pela metodologia de NGS (nos genes *HFE*, *TFR2*, *HJV*, *HAMP*, *SLC40A1* e *FTL*). As variantes novas (não descritas nas bases de dados públicas) ou muito raras foram validadas por sequenciação de Sanger.

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*) e 23 aparentemente neutras.

Na **tabela 1** apresentam-se as principais variantes identificadas nos genes *HFE*, *TFR2*, *HJV* e *HAMP*, as respetivas frequências alélicas e significado clínico [obtido por consulta das bases de dados e pelos estudos *in silico* e *in vitro* efetuados (4,5)]. Para além dessas, de entre as alterações detetadas nos genes *SLC40A1* e *FTL* são de referir duas variantes patogénicas com transmissão autossómica dominante: *SLC40A1:c.238G>A,p.Gly80Ser*, responsável pelo fenótipo de HH-tipo 4 onde ocorre uma sobrecarga intracelular de ferro (sobretudo nos macrófagos) e *FTL:c.-167C>A*, responsável pela síndrome de hiperferritinémia hereditária com cataratas congénitas (OMIM#600886).

Tabela 1: ⚡ Variantes detetadas em genes relacionados com o metabolismo do ferro em doentes portugueses com fenótipo compatível com Hemocromatose Hereditária não-clássica.

Gene	Identificação da variante	Localização genómica (hg19)	Alteração de nucleótido	Tipo de variante	Frequência alélica (%)	Significado clínico da variante (Ensembl; ClinVar; PubMed)
HFE	rs149342416	6:g.26087458	c.18G>C	Missense; p.(Arg6Ser)	0,17	Desconhecido
	rs765114087	6:g.26090901	c.137T>C	Missense; p.(Leu46Trp)	0,17	Provavelmente patogénico (4)
	rs1799945	6:g.26090951	c.187C>G	Missense; p.(His63Asp)	19,32	Possivelmente patogénico/Fator de risco
	rs1800730	6:g.26090957	c.193A>T	Missense; p.(Ser65Cys)	1,01	Possivelmente patogénico/Fator de risco
	rs2071303	6:g.26091108	c.340+4T>C	Altera região dadora de <i>splicing</i>	0,17	Provavelmente benigno
	rs200706856	6:g.26091358	c.385G>A	Missense; p.(Asp129Asn)	0,17	Provavelmente patogénico (4)
	rs780563614	6:g.26091387	c.414C>T	Sinónima; p.(Tyr138=)	0,17	Provavelmente benigno (4)
	sem nº de ID	6:g.26091387	c.414C>G	Nonsense; p.(Tyr138*)	0,17	Patogénico (4)
	sem nº de ID	6:g.26092757	c.689A>T	Missense; p.(Tyr230Phe)	0,17	Provavelmente benigno (4)
	rs758663135	6:g.26092757	c.689A>G	Missense; p.(Tyr230Cyst)	0,17	Provavelmente patogénico*
	rs140080192	6:g.26092897	c.829G>A	Missense; p.(Glu277Lys)	0,17	Patogénico (5)
	rs1800562	6:g.26092913	c.845G>A	Missense; p.(Cys282Tyr)	2,82	Patogénico
rs143175221	6:g.26092952	c.884T>C	Missense; p.(Val295Ala)	0,17	Patogénico (5)	
TFR2	rs376955913	7:g.100640856	c.303C>T	Sinónima; p.(Tyr101=)	0,17	Provavelmente benigno
	rs148902192	7:g.100640678	c.473+8T>A	Altera região dadora de <i>splicing</i>	0,17	Provavelmente benigno
	rs34242818	7:g.100633241	c.714C>G	Missense; p.(Ile238Met)	0,34	Benigno
	rs151198873	7:g.100633010	c.840C>G	Missense; p.(Phe280Leu)	0,17	Provavelmente benigno
	sem nº de ID	7:g.100229569	c.967-1G>C	Altera região aceitadora de <i>splicing</i>	0,34	Patogénico*
	rs41303501	7:g.100629279	c.1364G>A	Missense; p.(Arg455Gln)	0,17	Não esclarecido; fator de risco
	rs80338885	7:g.100628294	c.1403G>A	Missense; p.(Arg468His)	0,17	Patogénico
	rs139178017	7:g.100628224	c.1473G>A	Sinónima; p.(Glu491=)	0,17	Patogénico (9)
	rs62625319	7:g.100627570	c.1767+7C>T	Altera região dadora de <i>splicing</i>	0,17	Provavelmente benigno
	rs2075674	7:g.100627408	c.1851C>T	Sinónima; p.(Arg617=)	0,34	Provavelmente benigno
	sem nº de ID	7:g.100218637	c.2249T>C	Missense; p.(Leu750Pro)	0,34	Patogénico*
	rs41295942	7:g.100621008	c.2255G>A	Missense; p.(Arg752His)	3,23	Benigno (10)
sem nº de ID	7:g.100218556	c.2330C>T	Missense; p.(Ala777Val)	0,34	Patogénico*	
HJV	rs56025621	1:g.146019740	c.98-6C>G	Altera região aceitadora de <i>splicing</i>	0,34	Desconhecido
	sem nº de ID	1:g.145415755	c.371C>T	Missense; p.(Pro124Leu)	0,17	Estudos funcionais em curso
	sem nº de ID	1:g.145415769	c.385T>C	Sinónima; p.(Asn129 =)	0,17	Provavelmente benigno
HAMP	sem nº de ID	19:g.35773456	c.-25G>A	Cria codão de iniciação da tradução	0,66	Patogénico (4,7,8)
	rs10489469	19:g.35284999	c.212G>A	Missense; p.(Gly71Asp)	0,17	Fator de risco

\* Resultado proveniente de estudos *in silico* e de associação genótipo/fenótipo.

## \_Discussão

A análise dos resultados revelou que a base molecular da HH-não clássica na população portuguesa é bastante heterogênea, envolvendo vários genes assim como vários tipos de mutações. Observa-se um predomínio de variantes nos genes *HFE* e *TFR2*, associadas à HH com fenótipo de aparecimento tardio e sintomas semelhantes à HH-tipo 1 (tabela 1). No grupo de doentes analisados as variantes com maior frequência alélica encontram-se no gene *HFE*: p.His63Asp=19,32% e p.Cys282Tyr=2,82%. Contudo estas frequências não diferem significativamente das descritas para a população portuguesa em geral [p.His63Asp=15-20% e p.Cys282Tyr=0,9-5,8%, dependendo da região do país (6)]. A terceira variante mais frequente é a p.Ser65Cys com frequência alélica de 1,01%. Não existindo dados sobre a frequência desta variante na população portuguesa consultou-se o *1000 Genomes Project - Iberian population in Spain*, onde a frequência do alelo T é de 1%, muito semelhante ao aqui encontrado. As restantes variantes detetadas neste gene apresentam frequências muito baixas, na ordem de 0,17%. Quanto às variantes patogénicas, ou possivelmente patogénicas, detetadas no gene *TFR2*, não foi observada nenhuma predominância mas sim diversas variantes raras com frequências na ordem de 0,34%.

A hepcidina é uma hormona sintetizada no fígado e é o principal regulador (de ação negativa) da absorção intestinal do ferro. De entre as variantes detetadas no seu gene destaca-se a HAMP:c.-25G>A (frequência = 0,66%). Esta já foi detetada em segregação em quatro famílias portuguesas naturais de diferentes regiões do país (4, 7, 8), este estudo). A variante origina um codão de iniciação da tradução prematuro, alteração da grelha de leitura, expressão muito baixa de hepcidina (7,8) e, conseqüentemente, sobrecarga de ferro na fase juvenil (HH- tipo 2b). Assim, esta parece ser a principal causa da HJ na nossa população (tabela 1).

## \_Conclusão

Nos doentes portugueses com fenótipo compatível com HH-não clássica foi detetada uma grande variedade de alterações moleculares cuja prevalência é, em geral, muito baixa. Isto indica que para o diagnóstico molecular desta patologia deverá ser utilizada uma metodologia de pesquisa/identificação geral de alterações genéticas como a NGS, que se revelou de execução rápida e de elevada sensibilidade e especificidade. No entanto, a conclusão sobre a relevância clínica das novas variantes encontradas é complexa e requer frequentemente a realização de estudos funcionais.

### Referências bibliográficas:

- (1) 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.
- (2) Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test.* 2000;4(2):183-98.
- (3) Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(7):1347-59.
- (4) Mendes AI, Ferro A, Martins R, et al. Non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal: novel mutations identified in iron metabolism-related genes. *Ann Hematol.* 2009;88(3):229-34. Epub 2008 Sep 2.
- (5) Silva B, Martins R, Proença D, et al. The functional significance of E277K and V295A HFE mutations. *Br J Haematol.* 2012;158(3):399-408.
- (6) 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. [www.nature.com/ejhg/journal/v9/n11/abs/5200723a.html](http://www.nature.com/ejhg/journal/v9/n11/abs/5200723a.html)
- (7) Porto G, Roetto A, Daraio F, et al. A Portuguese patient homozygous for the -25G>A mutation of the HAMP promoter shows evidence of steady-state transcription but fails to up-regulate hepcidin levels by iron. *Blood.* 2005;106(8):2922-3. [www.bloodjournal.org/content/106/8/2922.long?sso-checked=true](http://www.bloodjournal.org/content/106/8/2922.long?sso-checked=true)
- (8) Matthes T, Aguilar-Martinez P, Pizzi-Bosman L, et al. Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5'-UTR of the HAMP gene. *Blood.* 2004;104(7):2181-3. [www.bloodjournal.org/content/104/7/2181.long](http://www.bloodjournal.org/content/104/7/2181.long)
- (9) Del-Castillo-Rueda A, Moreno-Carralero MI, Cuadrado-Grande N, et al. Mutations in the HFE, TFR2, and SLC40A1 genes in patients with hemochromatosis. *Gene.* 2012;508(1):15-20.
- (10) Radio FC, Majore S, Binni F, et al. TFR2-related hereditary hemochromatosis as a frequent cause of primary iron overload in patients from Central-Southern Italy. *Blood Cells Mol Dis.* 2014;52(2-3):83-7. Epub 2013 Sep 20.