

# Análise de mutações no gene da hemocromatose e ferritina sérica em pacientes com porfiria cutânea tardia

*Investigation of mutations in the gene of haemochromatosis and the serum levels of ferritine in patients with porphiria cutanea tarda*

R. Souto da Silva<sup>1</sup>, R. Curvo<sup>2</sup>, S. Carneiro<sup>3</sup>, O. Ferreira<sup>4</sup>, LC Porto<sup>5</sup>, JC Macedo Fonseca<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Dermatologia. Professor Substituto do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ). Rio de Janeiro (RJ). Brasil.

<sup>2</sup>Doutorando em Biologia Humana Experimental. Pesquisador do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação (UERJ). Rio de Janeiro (RJ). Brasil.

<sup>3</sup>Doutora em Dermatologia. Professor Associada de Dermatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ). Rio de Janeiro (RJ). Brasil.

<sup>4</sup>Doutor em Ciências Biológicas Biofísica-UFRJ. Professor do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>5</sup>Doutor em Biologie Humaine. Univ. Claude Bernard. França. Professor Titular da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

<sup>6</sup>Doutor em Dermatologia. Professor Associado de Dermatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ). Rio de Janeiro (RJ). Brasil.

## Correspondencia:

R. Souto da Silva

e-mail: rs\_souto@yahoo.com.br

Recibido: 22/3/2012

Aceptado: 4/2/2013

## Resumo

A porfiria cutânea tardia (PCT) é uma doença que gera fotossensibilidade pelo acúmulo de porfirinas decorrente do metabolismo de ferro alterado. O reflexo desse erro é observado bioquimicamente através das porfirinas urinárias, ferritina sérica entre outros parâmetros. Mutações no gene HFE1 são associadas tanto ao prognóstico quanto ao desencadeamento da PCT. No presente trabalho analisamos em 11 pacientes, acompanhados no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), os genótipos do gene HFE1 para as mutações H63D, S65C e C282Y e os níveis de ferritina sérica.

**Material e métodos:** Foram convidados 11 pacientes diagnosticados com PCT no ambulatório de dermatologia do HUPE mediante TCLE e coletados urina e sangue para determinação bioquímica de uroporfirinas e níveis de ferro/ferritina sérica respectivamente. A amostra de sangue também foi utilizada para detecção das mutações H63D, S65C e C282Y por PCR tempo real e sequenciamento.

**Resultados e comentários:** Em oito (72%) pacientes do estudo observamos elevada ferritina sérica, sendo seis pacientes carreadores de pelo menos um alelo da mutação D63 (54%), cinco pacientes heterozigotos (45%) e um homozigoto (9%). Não foi observada a presença das mutações S65C e C282Y em nenhum dos pacientes. Mutações do gene HFE1 tem se mostrado pertinentes ao prognóstico da PCT em diversos estudos internacionais. Entretanto, não foi possível determinar a mesma importância neste trabalho, provavelmente, devido ao reduzido número de pacientes. Contudo, o estudo demonstra que a dinâmica das mutações do gene HFE1 e sua relevância na população do Rio de Janeiro diferem de outras populações acometidas pela PCT.

**Palavras-chave:** ferritina, gene HFE1, mutações C282Y e H63D, porfiria cutânea tardia.

(R. Souto da Silva, R. Curvo, S. Carneiro, O. Ferreira, LC Porto, JC Macedo Fonseca. Análise de mutações no gene da hemocromatose e ferritina sérica em pacientes com porfiria cutânea tardia. Med Cutan Iber Lat Am 2013;41(2):56-59)

## Summary

The Porphyria Cutanea Tarda (PCT) is a disease that generates photosensitivity by the accumulation of porphyrins due to the metabolism of the overload of iron amount. The consequences of such mistake can be biochemically observed through the urinary porphyrins, serum ferritin, among other parameters. Mutations in the gene HFE1 have been associated not only to the prognosis, but also to the development of the PCT. In this study we had analyzed in 11 patients, assisted at the dermatological outpatient clinic of the Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), the genotypes of the gene HFE1 to the mutations H63D, S65C, and C28Y, as well as the levels of serum ferritin.

**Material and methods:** We performed our study in 11 patients diagnosed with PCT at the dermatological outpatient clinic at the HUPE, who have agreed to the Terms of Consent (TC) for the study. It had been collected both urine and blood samples to the biochemical analysis of urine-porphyrins, as well as the levels of iron/serum ferritin respectively. The blood sample had also been utilized to detect mutations H63D, S65C, and C282Y by PCR in real timing, and sequencing.

**Results and comments:** It had been observed in eight patients a high level of serum ferrite (72%); six patients had been identified as carriers of at least one focus of the mutation D63 (54%): five were heterozygous patients (45%); and one homozygous patient (9%). It had not been observed the presence of mutations S65C, and C282Y in any of the patients. Mutations of the gene HFE1 have been noticed relevant to the prognosis of the PCT in various international studies. Nevertheless, it has not been possible to determine the same relevance on our study probably due to the reduced number of patients. However, this study shows that the dynamics of the gene mutations HFE1 and its relevance in the population of shows differences among populations from other places affected by the PCT.

**Key words:** ferritin, gene HFE1, mutations C282Y and H63D, porphyria cutanea tarda.

As porfírias constituem um grupo de doenças metabólicas derivadas de deficiências de enzimas responsáveis por cada etapa da síntese do heme, gerando acúmulo excessivo de porfirinas e seus precursores[1]. A porfiria cutânea tarda (PCT) é a mais frequente das porfírias e pode se apresentar na forma adquirida ou hereditária. A doença é caracterizada por uma fotosensibilidade induzida por porfirinas que se depositam na pele e que geralmente manifestam erupções vesicobolhosas, fragilidade cutânea, cicatrizes atróficas, milia, hipertricose e hiperpigmentação. As alterações hepáticas incluem esteatose, fibrose portal, siderose, cirrose e hepatocarcinoma. Especula-se que a PCT tenha como fator primário a deficiência da enzima uroporfirinogênio-descarbixilase (UGD), contudo necessita de fatores desencadeantes como o etilismo, o estrogênio, hepatite C e sobrecarga de ferro para expressar clinicamente a doença[1, 2, 3]. Uma das formas de monitoramento da PCT é realizada através da análise periódica das porfirinas urinárias (uroporfirina e coproporfirina), da ferritina sérica, do ferro sérico e das transaminases hepáticas.

Recentemente também foi esclarecido que mutações do gene da hemocromatose (HFE1) podem contribuir como fator de risco relevante para esse acúmulo de ferro e consequentemente início da doença. Em uma meta-análise recente foi sugerido que o risco de PCT para mutações no HFE1 pode variar de 1,7 para homozigose D/D da posição 63 até 48 para a homozigose Y/Y da posição 282[4, 5]. Atualmente não há muitos registros na literatura em relação a população brasileira sobre as frequências de mutações do HFE e sua relação com a PCT[6, 7].

No presente trabalho introduzimos e validamos técnicas de discriminação alélica por PCR em tempo real para detecção das mutações C282Y, H63D e de sequenciamento para a mutação S65C do gene HFE1, também confrontamos os genótipos encontrados com os dados obtidos pela bioquímica, especialmente sua relação com a ferritina sérica e a sobrecarga de ferro. Paralelamente analisamos as frequências alélicas para averiguar se os dados estão em concordância com os demais dados internacionais[8, 9].

## Material e métodos

Foram selecionados para o estudo, pacientes que receberam o diagnóstico de PCT através de exame clínico, laboratorial e/ou histopatológico, atendidos no período de janeiro de 2009 à dezembro de 2011, no ambulatório de Dermatologia Geral do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). Os pacientes elegíveis acordaram com os *Termos de Consentimento Livre e Esclarecido* (TCLE) e foram submetidos à

análise clínica para a avaliação funcional. Para as avaliações da bioquímica e genética foram coletadas duas amostras de sangue em anticoagulante, além de amostras de urina de 24 horas para dosagem das porfirinas urinárias (uroporfirinas e coproporfirinas). Na amostra destinada a bioquímica foram avaliadas a ferritina sérica, ferro sérico (método colorimétrico ferrozine), aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP), gama glutamil transferase (GGT) (método IFFC s/piridoxil fosfato). A amostra de urina de 24 horas foi avaliada através de cromatografia líquida de alta resolução para mensuração da coproporfirina urinária e a uroporfirina através do método de cromatografia de troca iônica .

Para a pesquisa genética o sangue anticoagulado foi centrifugado a 1500rpm por 10 minutos para enriquecimento leucocitário e o mesmo aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur. O DNA foi extraído com kit *QIAamp DNA Blood mini kit* segundo informações do fabricante (Qiagen, Alemanha) . A análise qualitativa e quantitativa do extraído foi aferida em eletroforese de gel de agarose 0,8% (p/v) e visualizado com *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, EUA) em ultravioleta 500 nm.

Os ensaios para discriminação das mutações para as posições Aa282 e Aa63 do gene HFE1 foram realizadas por PCR em tempo real (QPCR) segundo as concentrações finais de; Sybrgreen 1x; Iniciadores 0,25 mM e DNA amosstral 2-10 ng/ul. Foram utilizados os iniciadores C282 a jusante 5 CCTGGATCAGCC CCTCATTG3 , Y282 a jusante 5 CCTGGATCAGCCCCCTCATT3 e C282Y a montante 5 GAC-TAGGGTGCCAGACGGTGAGG 3 para discriminação da posição Aa282; e H63 a jusante 5 GACCAGCTGTTCTGTGTT CTATGATC 3 , D63 a jusante 5 GACCAGCTGTTCTGTGTT-CTATGATG 3 e H63D a montante 5 CCCTCTCCACATACC-CTTGCTGTG 3 ) para discriminação da posição Aa63. As condições de termociclagem foram de; 50° C 2 minutos; 95° C 10 minutos e 45 ciclos de; 95° C 30 segundos; 58° C 30 segundos. Para determinação do genótipo por PCR tempo real utilizamos a razão obtida dos valores de *Cicle Threshold* (Ct) obtidos para cada conjunto de alelos analisados; Para a posição 63 foram determinados os valores de; < 0,85 para homozigotos HH; > 1,15 para homozigotos DD; e < 1,10 ou > 0,90 para heterozigotos HD. Para a posição 282 foi possível determinar apenas um valor arbitrário para de < 0,90 para homozigotos CC, visto que o alelo Y282 não foi observado.

Para ratificação dos resultados e validação da técnica as amostras foram submetidas ao sequenciamento das posições Aa282 (SEQ C282Y F 5 CACCATG AAGTGGCTGAAGGAT3 e SEQ\_H63D\_R 5 GACTAGGGTGCCAGAC GGTGAGG3) e Aa63 (SEQ\_H63D\_F 5 GGCCCTGTTGCTCTGTCTCCAGG3 e SEQ\_

**Tabela 1.** Indicadores de idade, sexo, ferritina sérica, uso de álcool, doenças virais associadas e genotipos para as mutações nas posições Aa63, Aa65e, Aa282 do gene HFE1.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Ferritina (ng/ml)*/**	Uso de álcool	Doença associada	HFE1 Aa63	HFE1 Aa65	HFE1 Aa282
1	70	F	363	Sim	–	HH	SS	CC
2	54	M	527	Sim	HIV	HH	SS	CC
3	59	M	367	Sim	HCV	HH	SS	CC
4	34	F	19,7	Sim	–	HH	SS	CC
5	44	F	524	Sim	–	DH	SS	CC
6	42	F	217	Sim	–	DH	SS	CC
7	51	M	9,5	Sim	–	DH	SS	CC
8	50	M	290	Sim	HCV/HIV	DH	SS	CC
9	52	M	378	Sim	–	HH	SS	CC
10	56	M	152,5	Sim	–	DH	SS	CC
11	29	F	286	não	–	DD	SS	CC

\*Os valores limítrofes superiores para ferritina sérica são de 150 ng/ml para mulheres e 200 ng/ml para homens.

\*\*Média da Ferritina Sérica nos pacientes do estudo foi de 284,88 ng/ml.

H63D\_R 5 CCCTCTCCACATACCCTTGCTGTG3 ), com as sequências geradas também foi possível identificar os resultados na posição Aa65 do gene HFE1 e estes foram adicionados a análise. Como controle para os ensaios de PCR tempo real foram utilizadas 40 amostras de sangue não relacionadas a hepatopatias.

## Resultados

Dos 11 pacientes diagnosticados com PCT participantes do estudo, em oito pacientes (72%) foi evidenciado aumento dos níveis de ferritina, sendo quatro (36%) destes carreadores do alelo mutante D63, três pacientes (27%) heterozigotos (H/D) e um (9%) homozigoto (D/D) para a mutação. Em dois pacientes (18%) heterozigotos (H/D) os níveis de ferritina sérica estavam dentro da normalidade (Tabela 1).

Não foi observada a presença das mutações C282Y e S65C em nenhum dos pacientes do estudo ou indivíduos controle, não sendo possível fazer uma análise de ligação entre os alelos, assim como outros estudos realizados em população de origem latina, ratificando que provavelmente se tratem de alelos raros[3, 8, 10]. Todos os genótipos observados por sequenciamento foram ratificados por PCR em tempo real, demonstrando que a técnica pode ser utilizada na triagem de genótipos para as mutações H63D e C282Y com alto grau de confiança.

## Comentário

No presente estudo detectamos apenas a mutações D63 para o gene HFE1 tanto em pacientes quanto em indivíduos controle, sendo um total de seis pacientes (54%) com PCT e de 12 indivíduos controle (30%) dos 40 testados. A frequência de alelos com a mutação D63 nos pacientes com PCT foi de 7/22 (32%) enquanto no grupo controle foi de 12/80 (15%). A presença de alelos carreando a mutação D63 nos pacientes com PCT possui um OR de 2,61 (IC 95%, 0,74-8,75) quando comparado com a presença deste alelo no grupo controle. No entanto, esta correlação não atingiu o nível de significância estatística (teste de Fischer,  $p = 0,13$ ). Uma provável explicação para a ausência de correlação é o poder estatístico (erro de tipo II) do nosso estudo que foi de aproximadamente 40%. Todavia a estreita relação do genótipo DD com a PCT já é bem descrita e fica em evidencia quando observamos o paciente 11, pois se trata de um paciente jovem cujos demais fatores de risco estão ausentes, indício da relação do gene HFE1 com a PCT, quer seja no diagnóstico, quer seja no prognóstico da doença[4, 8, 11].

Logo, acreditamos que estes são resultados parciais do estudo e que a próxima meta deva ser agregar novos pacientes ao estudo, de forma a obter resultados mais consistentes sobre a dinâmica das mutações já descritas para o gene HFE1 em pacientes com PCT do estado do Rio de Janeiro, assim como detectar e identificar outras possíveis mutações do gene HFE1 que possam estar associadas à PCT.

## Bibliografía

1. Frank J. The porphyrias. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al. Fitzpatrick's Dermatology in Medicine. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2003: 1435-66.
2. Drage LA, Brandhagen DJ, Pittelkow MR. Association of porphyria cutanea tarda with hereditary haemochromatosis. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 205-11.
3. Roberts AG, Whatley SD, Morgan RR, Worwood M, Elder GH. Increased frequency of the haemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet* 1997; 349: 321-3.
4. Ellervik Ch, Birgens H, Tybjærg-Hansen A, Børge G, Nordestgaard BG. Hemochromatosis Genotypes and Risk of 31 Disease Endpoints: Meta-Analyses Including 66,000 Cases and 226,000 Controls. *Hepatology* 2007; 46: 1071-80.
5. Silva MM, Trope B, Fonseca JCM, Maceira J, Figueira A. Porfiria Cutânea Tardia Sintomatática. *Ana Brasil Dermatol* 1990; 65: 196-7.
6. Feder JN, Gnrke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
7. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 2005; 352: 1769-78.
8. Martinelli AL, Filho R, Cruz S, Franco R, Tavella M, Secaf M et al. Hereditary hemochromatosis in a Brazilian university hospital in São Paulo State (1990-2000). *Genet Mol Res* 2005; 4: 31-8.
9. Martinelli AL, Zago MA, Roselino AM, Filho AB, Villanova MG, Secaf M, et al. Porphyria cutanea tarda in Brazilian patients: association with hemochromatosis C282Y mutation and hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3516-21.
10. Bonkovsky HL, Poh-Fitzpatrick M, Pimstone N, Obando J, Di Bisceglie A, Tattrie C et al. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology* 1998; 27: 1661-9.
11. Stolzel U, Kostler E, Schuppan D, Richter M, Wollina U, Doss MO, et al. Hemochromatosis (HFE) gene mutations and response to chloroquine in porphyria cutanea tarda. *Arch Dermatol* 2003; 139: 309-13.