

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANÁLISE DAS MUTAÇÕES C282Y, S65C E H63D E FREQUÊNCIA ALÉLICA DO
GENE HFE EM PACIENTES COM HIPERFERRITINEMIA, EM UMA CIDADE DO
NORDESTE, BRASIL

GIOCONDA DIAS RODRIGUES LEÃO

NATAL/RN
2013

GIOCONDA DIAS RODRIGUES LEÃO

ANÁLISE DAS MUTAÇÕES C282Y, S65C E H63D E FREQUÊNCIA ALÉLICA DO
GENE HFE EM PACIENTES COM HIPERFERRITINEMIA, EM UMA CIDADE DO
NORDESTE, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal do
Rio Grande do Norte como requisito
para obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior

NATAL/RN

2013

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Leão, Gioconda Dias Rodrigues.

Análise das mutações C282Y, S65C e H63D e frequência alélica do gene HFE em pacientes com hiperferritemia, em uma cidade do Nordeste, Brasil / Gioconda Dias Rodrigues Leão. – Natal, 2014. 95f: il.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. C282Y- Dissertação. 2. Hemocromatose hereditária – Dissertação. 3. Mutação H63D – Dissertação. 4. S65C – Dissertação. I. Cavalcanti Júnior, Geraldo Barroso. II. Título.

RN/UF/BSA01

CDU 616-056.7

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Prof.^a Dr.^a Ivonete Batista de Araújo

GIOCONDA DIAS RODRIGUES LEÃO

ANÁLISE DAS MUTAÇÕES C282Y, S65C E H63D E FREQUÊNCIA ALÉLICA DO
GENE HFE EM PACIENTES COM HIPERFERRITINEMIA, EM UMA CIDADE DO
NORDESTE, BRASIL

Aprovada em : 17/05/2014

Banca Examinadora:

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior – Presidente - UFRN

Membros da Banca:

Prof. Aldo da Cunha Medeiros – Membro Interno – UFRN

Profa. Dra. Ana Claudia Galvão Freire – Membro Interno – UFRN

Prof. Dr. Wogelsanger Oliveira Pereira – Membro Externo – UFRN

Profa. Dra. Amália Cinthia Meneses do Rêgo – Membro Externo – UFRN

A Deus, que me proporcionou saúde e forças para vencer as adversidades encontradas no caminho e prosseguir adiante, iluminando meu caminho, minha vida e guiando meus pensamentos, fortalecendo a minha alma.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Giovani (*in memoriam*)** e **Adalva**, que sempre me ensinaram a amar, que deram o exemplo de honradez, bondade, amor, trabalho, humildade e dedicação, iluminando sempre meu caminho com a mais brilhante luz que puderam dar: A BUSCA DO CONHECIMENTO ATRAVÉS DO ESTUDO.

A meu esposo, **Marcos Leão**, sem o qual este trabalho não existiria. Obrigada pelo amor e pelo carinho, pelos melhores momentos da minha vida. Simplesmente obrigada por formarmos uma família.

Aos meus filhos, **Tatiana, Tiago e Clarissa**, que são a razão e força, para que eu possa continuar subindo alguns degraus da vida e proporcioná-los algo que julgo importante quando se tenta educar alguém: O estudo e o exemplo. Com o coração transbordando de amor e carinho, agradeço e peço desculpas pela ausência e pela falta de paciência. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador amigo, Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior, pela orientação, pela confiança e por ter me feito acreditar que seria possível concluir este trabalho, sobretudo pelo acolhimento e cuidados revelados em atitudes amáveis.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar mais uma etapa de minha vida profissional, quero agradecer às pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

A Prof.^a Dra. Nilma Dias Leão Costa, pela dedicação à orientação do projeto e pelo incentivo, paciência e carinho.

Ao meu irmão, Giovani Júnior, pelo carinho. Nem acredito que chegamos até aqui, diante de tantos obstáculos e dificuldades que passamos.

As minhas tias, Alba, Aury e Betinha, que demonstraram carinho e apoio a mim, sempre dispostas a ajudar em todas as horas, especialmente com os meus filhos. A elas, não tenho palavras para agradecer.

Agradeço, especialmente, A MESTRE, Andréa Fernandes, por ter me ensinado os primeiros passos na área da biologia molecular, que, além da participação fundamental na orientação de meu trabalho, se tornou, para mim, uma referência profissional. Ajudou-me nas horas mais difíceis e nos tornamos grandes amigas.

As professoras da banca de qualificação, Dra. Valéria Sales e Dra. Ana Cláudia Freire, com suas valiosas observações pertinentes, contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e sócios do Laboratório DNA Center, Dra. Andréa Fernandes e Dr. Roberto Chaves, pelas palavras de apoio e encorajamento nos momentos mais difíceis. A minha profunda gratidão.

A todos os técnicos e funcionários do Laboratório DNA Center, principalmente aos que estiveram mais envolvidos ao longo de toda caminhada, em especial, Victor Lima, Viviane Fernandes, Girleide Monte e Luciana Frutuoso.

As bioquímicas, Juliana Freire, Taissa Oliveira e Themis Rocha, pela disponibilidade e tranquilidade, sendo de extrema importância para o alcance desta etapa.

A todos que fazem o Laboratório Integrado de Análises Clínicas (LIAC-UFRN), em especial, a Dra. Telma Araújo, que sempre acreditaram e incentivaram na realização de meus sonhos.

A Prof.^a Creusa Dal Bó, Prof. Dr. José Wilton Queiroz e a Prof.^a Dra. Tereza Neuma, pela valiosa participação nas análises estatísticas.

A toda minha família, pelo carinho e dedicação em todas as horas.

Aos pacientes e os integrantes do grupo controle, que participaram de forma voluntária, pois acreditaram no meu estudo e em seus benefícios.

Aos médicos, Dr. Marcos Leão, Dr. Henrique Fonseca, Dr. Cláudio Macêdo, Dr. Gilmar Amorim, Dra. Daniela Albuquerque, Dra. Valéria Sales, Dr. Rodrigo Villar, Dr. Lavosier Campos, Dr. Enildo Alves, Dr. Francisco Júnior, Dr. James Maciel, Dra. Irian Farkat e Dr. Aldair Paiva, que confiaram no serviço do Laboratório DNA Center, encaminhando seus pacientes.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença genética causada pela absorção e deposição elevada de ferro em vários órgãos. Este acúmulo resulta em complicações clínicas, como cirrose, artrite, cardiopatias, diabetes, distúrbios sexuais e escurecimento da pele. A mutação C282Y está bem definida na etiologia da hemocromatose. Outras duas mutações têm sido descritas, H63D e S65C, associada com uma forma mais leve da doença. O objetivo, deste trabalho, foi a identificação das mutações genéticas H63D, S65C e C282Y no gene da Hemocromatose e avaliação da frequência dessas mutações no gene da proteína HFE, em pacientes com hiperferritinemia, que foram encaminhados ao laboratório DNA Center – Natal/RN. Além disso, avaliar a correlação dos genótipos das mutações H63D, S65C e C282Y do gene da Hemocromatose hereditária com a concentração sérica da ferritina. As dosagens bioquímicas e análises moleculares foram realizadas, respectivamente, através do método enzimático e PCR com restrição enzimática. Dos 299 pacientes investigados, 48.49% apresentaram ausência de mutação e 51.1% com algum tipo de mutação: 4.35% C282Y heterozigoto mutado; 2.67% C282Y homozigoto mutado; 31.44% H63D heterozigoto mutado; 8.03% H63D homozigoto mutado e 5.02% heterozigoto para a mutação em ambos os genes. A mutação S65C foi estudada em 112 pacientes, onde foi observado 2.67%, heterozigoto mutado (S65D/WT) e 1.78% duplo heterozigoto (H63D/S65C). Com relação ao sexo, observou-se o maior percentual de casos com alteração molecular em homens em relação a mulheres nas duas mutações avaliadas. Por ser considerado um problema de saúde pública, sua gravidade ser prevenível e a baixa toxicidade do tratamento, o diagnóstico genético precoce da HH torna-se indicado, principalmente, nos pacientes com ferritina elevada e, com isso, é possível evitar manifestações clínicas graves. Nossos achados mostraram a importância da realização de estudos genéticos em indivíduos com suspeita de hemocromatose hereditária, em virtude de elevada incidência dessa doença de cunho hereditário em Natal, Nordeste do Brasil.

DESCRITORES: Hemocromatose Hereditária. Mutação H63D, C282Y, S65C.

ABSTRACT

Hereditary Hemochromatosis (HH) is a genetic disease caused by high iron absorption and deposition in several organs. This accumulation results in clinical disturbances such as cirrhosis, arthritis, cardiopathies, diabetes, sexual disorders and skin darkening. The C282Y mutation is well defined in the hemochromatosis etiology. Others two mutations have been described, H63D and S65C, associated with a milder form of the disease. The aim of this paper was identify the H63D, S65C and C282Y genetical mutations in the hemochromatosis gene and the frequency assessment of these mutations in the HFE protein gene in patients with hyperferritinemia which are sent to the DNA Center laboratory in Natal, state of Rio Grande do Norte. Furthermore, to evaluate the correlation of the H63D, C282Y and S65C mutations in gene Hereditary hemochromatosis with serum ferritin. The biochemical dosages and molecule analyses were done respectively by the enzymatic method and PCR with enzymatic restriction. Out of the 299 patients studied for C282Y and H63D, 48.49% showed absence of mutation and 51.51% showed some sort of mutation: heterozygous C282Y mutation in 4.3% patients; homozygous C282Y mutation in 2.67%; heterozygous H63D mutation in 31,44%; homozygous H63D mutation in 8.03%; and heterozygous for the mutation in both genes (C282Y/H63D) in 5.02%. The S65C mutation was studied in 112 patients and was observed heterozygous mutation (S65D/WT) in 2.67% and double mutation (H63D/S65C) in 1.78% of patients. With regard to sex, we observed the highest percentage of cases with molecular changes in men compared to women in the two mutations evaluated. For be considered a public health problem, its severity be preventable and low toxicity treatment, early genetic diagnosis of HH becomes indicated, especially in patients with elevated serum ferritin and thus prevent severe clinical manifestations. Our findings showed the importance of genetic studies in patients with suspected hereditary hemochromatosis due to high incidence of this disease hereditary nature in a city of northeast, Brazil.

KEY WORDS: Hereditary Hemochromatosis. H63D, C282Y and S65 Mutations

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - Alanina Aminotransferase
AST - Aspartato Aminotransferase
 β 2M - β 2 Microglobulina
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
CPPD - Deposição pirofosfato de cálcio dihidratado
DcytB - Proteína Redutora Citocromo b Duodenal
DMT1 - Transportador de Metais Divalentes 1
DNA - Ácido desoxi-ribonucleico
EASL – Consenso Internacional da Conferência da Hemocromatose
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
 Fe^{2+} - Ferro Ferroso
 Fe^{3+} - Ferro Férrico
 γ GT - Gama Glutamil Transferase
HAMP - Hepsidina
Hcl - Ácido clorídrico
HCP1 - Proteína de Transporte do Heme
HDH - Desidrogenase malática
HFE - Ferro Elevado
HH - Hemocromatose Hereditária
HIS - Histidina
HJV - Hemocromatose juvenil
HLA - Antígeno Leucocitário Humano
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRP - Proteína regulatória do ferro
IRPs - Proteína reguladora do plasma
Kcl - Cloreto de potássio
LDH - Desidrogenase Láctica

LDL - Lipoproteína de baixa densidade
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
mg - miligrama
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaI - Iodeto de sódio
NASH - Esteatohepatite não alcoólica
NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards
NTBI - Ferro não ligado à transferrina
OMIM - On-line Mendelian Inheritance in Man
pb- Pares de Base
PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase
RFLP - Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
RNA_m- Ácido ribonucléico mensageiro
ROS - Espécies reagentes do oxigênio
RTf2 - Receptor 2 da transferrina
SBPC - Sociedade Brasileira de Patologia Clínica
STEAP3 - Enzima Redutora de Metal (six-transmembrane ephelial antigen of prostate 3)
TBE - Tris-EDTA-borato
TBI - Ferro Ligado a Transferrina
TE - Tris-EDTA
TFR1 - Receptor da Transferrina 1
TFR2 - Receptor da Transferrina 2
TS - Saturação da transferrina
UV - Ultra-violeta
WT - Wild Type (Tipo selvagem)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática da mutação no gene <i>HFE</i> – A genética molecular da hemocromatose.....	34
FIGURA 2 - Fluxograma das Análises Laboratoriais.....	44
FIGURA 3 - Análises Moleculares para investigação da mutação do gene <i>HFE</i> da hemocromatose hereditária.....	48
FIGURA 4 - Reação em Cadeia pela Polimerase.....	51
FIGURA 5 - Representação esquemática da avaliação da mutação H63D do Gene <i>HFE</i>	52
FIGURA 6 - Representação esquemática da avaliação da mutação S65C do Gene <i>HFE</i>	53
FIGURA 7 - Representação esquemática da avaliação da mutação C282Y do Gene <i>HFE</i>	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação genética da hemocromatose hereditária.....	27
TABELA 2 - Frequência alélica das mutações C282Y, S65C e H63D no gene <i>HFE</i> no Brasil.....	37
TABELA 3 - Frequência alélica das mutações C282Y, S65C e H63D no gene <i>HFE</i> em diferentes países.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 METABOLISMO DO FERRO.....	19
1.2 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO FERRO.....	22
1.3 SOBRECARGA DE FERRO.....	23
1.4 HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA.....	25
1.4.1 DEFINIÇÃO.....	26
1.4.2 CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA.....	26
1.5 HEMOCROMATOSE DO TIPO 1.....	28
1.5.1 DEFINIÇÃO.....	28
1.5.2 FISIOPATOLOGIA.....	29
1.5.3 DIAGNÓSTICO.....	31
1.5.4 ALTERAÇÃO NA MUTAÇÃO DO GENE HFE.....	31
1.5.5 SELEÇÃO FAMILIAR.....	34
1.5.6 EPIDEMIOLOGIA.....	35
1.5.7 TRATAMENTO.....	39
2 JUSTIFICATIVA.....	40
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 MÉTODOS.....	42
4.1 CASUÍSTICA.....	42
4.1.1 GRUPO DE ESTUDO.....	42
4.1.2 GRUPO CONTROLE.....	42
4.1.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	42
4.3 REAGENTES.....	43
4.4 EQUIPAMENTOS.....	43
4.5 AVALIAÇÃO LABORATORIAL BIOQUÍMICA.....	44
4.5.1 FERRITINA SÉRICA.....	45
4.5.2 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE NO PLASMA.....	45

4.5.3 DETERMINAÇÃO DA ALANINA AMINO TRANSFERASE (ALT/GPT).....	46
4.5.4 DETERMINAÇÃO DA ASPARTO AMINO TRANSFERASE (AST/GOT).....	46
4.5.5 DETERMINAÇÃO DA GAMA GLUTAMIL TRANSFERASE (γ GT).....	47
4.6 ANÁLISES MOLECULARES.....	48
4.6.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	49
4.6.2 AVALIAÇÃO ELETROFORÉTICA DO DNA GENÔMICO.....	49
4.6.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO C282Y DO GENE <i>HFE</i>	49
4.6.4 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO H63D DO GENE <i>HFE</i>	50
4.6.5 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO S65C DO GENE <i>HFE</i>	50
4.6.6 RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS DE PCR.....	51
4.6.7 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO.....	51
4.6.8 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES C282Y, H63D E S65C NO GENE <i>HFE</i>	52
4.6.9 CONTROLE DE QUALIDADE DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES.....	54
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
5 ARTIGOS PRODUZIDOS.....	55
6 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES.....	70
7 REFERÊNCIAS.....	76
8 APÊNDICE.....	87
9 ANEXOS.....	89

1 INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento comum da natureza, praticamente encontrado em todos os seres vivos. É um mineral vital para homeostase celular, que possui várias funções essenciais ao organismo humano, tais como: a participação no transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), na transferência de elétrons, na síntese de RNA (ribonucleotídeo redutase), na produção de energia oxidativa (citocromo, catalase e peroxidase), na respiração mitocondrial (succinato desidrogenase) e na inativação de radicais livres (xantina oxidase)¹⁻³. O ferro é usado como um cofator importante para enzimas e proteínas regulatórias, devido ao fato de existir em dois estados de oxidação estáveis, denominados estado ferroso (Fe^{+2}) e estado férrico (Fe^{+3})⁴⁻⁵.

Apresenta-se na dieta sob duas formas: o ferro heme e o ferro não heme. O ferro heme é absorvido na forma férrica (Fe^{+3}), ligado à mucina⁶ ou à apoferritina na forma ferrosa (Fe^{+2}), ligando-se ao transportador de metais divalente 1 (DMT1). O DMT1 é o principal transportador de ferro na membrana apical e é responsável pela movimentação unidirecional do ferro ferroso (Fe^{+2}) para o interior da célula, através da mucosa duodenal acoplado a redutase férrica, que permite a passagem da molécula de ferro através do citoplasma no enterócito, presentes em altas concentrações no duodeno⁷, em que a via caracterizada por este transportador representa a de maior absorção de ferro não heme⁸. De acordo com a sua forma, o ferro pode ser absorvido de diferentes maneiras na mucosa intestinal. O ferro heme é facilmente absorvido, pois é solúvel nas condições do intestino delgado. No entanto, a absorção do ferro não-heme é bem menor, podendo ser aumentada na presença da vitamina C ou outro ácido, que reduz (Fe^{+3}) ao (Fe^{+2}) absorvível^{9,10}.

1.1 METABOLISMO DO FERRO

O ferro, utilizado pelo organismo, é obtido pela dieta e da reciclagem de hemácias senescentes. É absorvido de 1mg a 2mg por dia pelo epitélio duodenal e pelo jejuno proximal através das células absorptivas intestinais (enterócitos), que apresentam estruturas vilosas para ampliar a superfície de absorção¹¹. Os precursores dos enterócitos encontram-se nas criptas, nas bases das vilosidades e,

a medida que se diferenciam, migram para o ápice. Os enterócitos maduros revestem as vilosidades de absorção próximas da junção gastroduodenal e são responsáveis pela absorção intestinal do ferro proveniente da dieta, uma vez que o ferro não incorporado ao grupo heme ocorre, primariamente, no estado férrico (Fe^{3+}) ou como hemoglobina ou mioglobina. Além disso, uma redutase férrica na borda vilosa (uma proteína redutora chamada de citocromo-b duodenal (DcytB) atua reduzindo o ferro a sua forma ferrosa (Fe^{+2})¹² e transportado por meio da membrana apical pelo enterócitos duodenais através do DMT1 (transportador de metal divalente)⁹ incorporado no enterócito após a digestão enzimática da hemoglobina e da mioglobina, geralmente, através de uma proteína de transporte do heme chamada de HCP1 (heme Carrier protein). Dentro do enterócito, o heme é degradado pela heme oxigenase e o Fe^{+3} é liberado^{13,14}.

Uma vez internalizado, o ferro, proveniente da dieta, é utilizado nos processos metabólicos celulares. Outra parte é estocada na forma de ferritina. enquanto uma terceira parte é transferida pela membrana basolateral do enterócito para o plasma. O ferro, retido como ferritina dentro do enterócito, é excretado nas fezes, quando ocorre a descamação epitelial dos enterócitos senescentes dois a três dias depois^{9,15,16}. Dentro do enterócito, o transporte do ferro entre a membrana apical e a membrana basolateral é pouco conhecido.

O ferro ferroso (Fe^{+2}), para sair do lúmen intestinal e atingir o plasma, precisa atravessar as duas membranas celulares, a membrana apical na superfície da luz intestinal e a membrana basolateral na superfície serosa. Uma vez que o ferro ferroso (Fe^{+2}) cruze a membrana basolateral, que é mediado pela ferroportina, ele é oxidado à forma de ferro férrico (Fe^{3+}) pela hephaestina, facilitando a ligação do ferro à transferrina. A transferrina liga-se ao receptor de transferrina 1 (TFR1) na superfície da célula, formando o complexo que se invagina para formar o endossomo, no qual ocorre a diminuição do pH, induzindo a liberação do ferro da transferrina. Neste momento, o Fe^{+3} é convertido a Fe^{+2} , por uma proteína redutora, chamada STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3), permitindo o transporte do íon para fora dos endossomas através da DMT1. O ferro é transportado, principalmente, para as mitocôndrias para síntese do grupo heme, a fim de formar hemoglobina. O ferro adicional é armazenado como ferritina e hemossiderina¹⁷.

O corpo não tem meios efetivos de excretar o ferro e, assim, a regulação da absorção do ferro dietético do duodeno desempenha um papel crítico na homeostase férrea do corpo. A concentração de ferro, no organismo é, aproximadamente, 1mg a 2mg de ferro dietético por dia e isto é equilibrado com perdas por renovação de células da mucosa, menstruação e outras perdas de sangue, e circula no plasma ligado à transferrina, a sua principal proteína transportadora. Mais de dois terços desse ferro circulante é incorporado à hemoglobina, sendo a maior parte do restante incorporado a mioglobina. O excesso de ferro é, geralmente, armazenado em células do parênquima hepático ou em macrófagos retículo-endoteliais¹⁸.

O aumento do estoque de ferro no corpo e o acompanhamento da elevação dos níveis de ferro ligado à transferrina (TBI) podem levar ao aumento do ferro nas criptas das células, conseqüentemente, modula a capacidade de absorção no enterócito, onde o complexo irá migrar para os vilos intestinais, que regulam a produção do transportador de metais divalentes (DMT1), reduzindo a absorção de ferro na dieta. Esse processo é revertido na deficiência de ferro¹⁹.

A capacidade total de ligação ao ferro é cerca de 12 mg no adulto normal, embora essa capacidade total, raramente, seja utilizada e a maioria das pessoas, geralmente, possua cerca de 3mg de ferro ligado à transferrina (ou seja, 25% da saturação da transferrina). Considera-se que a mediação da transferência de ferro, através dessa membrana, seja feita pela ferroportina, com a ajuda da hefaestina^{19,20}. Como o DMT1, a ferroportina é específica para ferro ferroso (Fe^{+2}) e funciona unidirecionalmente. Não está claro exatamente de que maneira a hefaestina auxilia a ferroportina, embora pareça provável que ela oxide o ferro. O transporte de ferro, através da membrana basolateral, pode, também, ser facilitado pela ferroxidase plasmática solúvel a ceruloplasmina, que é muito semelhante à hefaestina²¹.

O ferro, quando não transferido para o plasma, permanece dentro do enterócito, armazenado na forma de ferritina, que é subseqüentemente eliminado do organismo através do trato gastrointestinal ou é transportado através do plasma, via ferroportina¹⁹. A ferritina, juntamente com a hemossiderina, constitui a forma de estocagem do ferro no corpo humano. A primeira reflete as reservas mobilizáveis do ferro no organismo, enquanto que a segunda é a forma de reserva estável. As células se protegem da toxicidade do ferro ionizado, estocando na forma da ferritina

e esta regula a absorção intestinal do ferro, que é inversamente proporcional à quantidade estocada. Possivelmente a apoferritina das células, na mucosa intestinal, está implicada na regulação eficaz das concentrações moderadas do ferro e é habitualmente encontrada na luz intestinal²².

A ferritina sérica tem valor indicativo com relação à existência de danos no fígado e quando o valor for acima de 1000ng/mL, é extremamente provável a presença de fibrose hepática. Porém, a limitação desta informação é sua baixa especificidade, pelo fato da mesma ser uma proteína de fase aguda e que torna os seus valores séricos elevados em outras condições patológicas, tais como em processos agudos e crônicos de inflamação²³. Ferritina sérica de medição é o indicador prognóstico mais útil da gravidade da doença. A biópsia hepática é realizada para encenar o grau de fibrose com elevação de ferritina grave ou transaminite ou para diagnosticar hemocromatose hereditária não clássica em pacientes com outros defeitos genéticos²⁴.

A ferritina tem um papel no transporte citosólico do ferro. Nas células dos hepatócitos do sistema macrófago-monocítico, tem função de estocagem. Dentro das células, onde as necessidades do ferro são importantes (eritroblastos e células malignas), a ferritina aparece como um transportador intermediário obrigatório na transferência do ferro transferrínico do sistema mitocondrial²⁵.

As causas de hiperferritinemia são: as hemocromatoses, síndromes inflamatórias, autólise, hemofagocitose, doença de Still e outras etiologias como síndrome da hiperferritinemia catarata hereditária, dentre outras²⁶.

1.2 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO FERRO

O gene HFE (Ferro elevado) tem 1029 nucleotídeos, constituído de 6 éxons e que foi localizado no cromossomo 6p21.3²⁷. Codifica uma proteína de 343 aminoácidos, homóloga ao complexo de histocompatibilidade (HLA) classe I²⁸. Está localizada em três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), um domínio transmembrana e uma substância citoplasmática que apresenta 4 cisteínas, bastante conservadas, que formam 2 pontes dissulfetos intracelulares, uma no domínio $\alpha 2$ e outra no domínio $\alpha 3$. Estas pontes dissulfetos são essenciais para a correta aderência da proteína, para a interação não covalente com a proteína beta2-microglobulina e para a localização na superfície celular da proteína^{29,30}.

A proteína HFE, que tem um papel importante no metabolismo do ferro, é expressa nos enterócitos e hepatócitos e encontra-se nas criptas do duodeno, associada com a $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$), e se liga ao receptor da transferrina (TFR1), reduzindo a afinidade deste pela transferrina e controlando, assim, a entrada de ferro no organismo^{9,31}. Na superfície celular, o complexo HFE- $\beta 2M$, associado com o receptor da transferrina e o ferro livre, transporta o ferro complexo no citoplasma²⁷. E se liga com a proteína regulatória do ferro (IRP), a qual, normalmente, está associada, ao elemento de resposta do ferro no DMT1 (RNAm), protegendo o RNAm de degradação. A dissociação do IRP aumenta o DMT1, que é a chave molecular para o transporte de ferro no lúmen gastrointestinal. Acredita-se que a molécula da HFE deve facilitar a compreensão da dependência do receptor da transferrina, em relação ao ferro dentro das criptas nas células, permitindo que o complexo atue como sensor do estoque de ferro no corpo³²⁻³⁶.

A hepcidina é a principal proteína que regula a homeostase do ferro no organismo³⁷. É um peptídeo sintetizado pelos hepatócitos, e o nome HEP significa fígado e CIDIN antibacteriano³⁸. Sua estrutura química foi descrita³⁹ como uma molécula retorcida em forma de grampo de cabelo, cujos dois braços estão ligados por pontes dissulfeto em uma configuração de escada. Existe uma conexão entre a hepcidina e o metabolismo de ferro com estudos hepáticos em respostas à sobrecarga do ferro⁴⁰⁻⁴².

A ferroportina é o receptor da hepcidina e a interação hepcidina-ferroportina controla os níveis de ferro nos enterócitos, hepatócitos e macrófagos. O complexo hepcidina-ferroportina é internalizado nos domínios da membrana basolateral dos macrófagos e a ferroportina é degradada, bloqueando a liberação do ferro dessas células⁴³. Alguns estudos sugerem que a proteína HFE interage com TFR1 e TFR2, controlando a síntese da hepcidina e que esta interação estaria associada às alterações na cinética do ferro nos hepatócitos^{44,45}.

1.3 SOBRECARGA DE FERRO

A sobrecarga de ferro, nos tecidos orgânicos, está associada a várias sequelas clínicas graves e, a menos que os valores de ferro sejam efetivamente controlados, é provável que os pacientes, nessa condição, sofram de uma significativa morbidade e mortalidade^{46,47}. Essas sequelas clínicas desenvolvem-se

primariamente por causa das formas potencialmente tóxicas do ferro circulante, chamadas de ferro não ligado à transferrina (NTBI, da expressão em inglês *non-transferrin-bound iron*). A parte patologicamente relevante do NTBI é chamada de ferro plasmático lábil, que compreende formas de ferro com potencial de penetração nos órgãos, ativas em termos de processos redox e que podem ser queladas⁴⁸. O NTBI é uma forma mal definida de ferro ligado a proteínas, lipídeos e compostos orgânicos de baixo peso molecular, como o fosfato e o citrato. A eficiência do ferro ferroso (Fe^{2+}), como doador de elétrons e do ferro férrico (Fe^{3+}) como receptor de elétrons, torna o ferro altamente tóxico. Essa toxicidade deve-se à capacidade do ferro de catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio em íons hidroxila (OH^-), radicais livres altamente tóxicos, que podem lesar membranas celulares, proteínas e o DNA⁴⁹.

Em muitos pacientes, a sobrecarga de ferro desenvolve-se, lentamente, ao longo de muitos anos, podendo, portanto, ser descrita como um “assassino silencioso”, já que pode passar muito tempo despercebida até que o paciente esteja gravemente afetado. As concentrações de ferro no organismo podem ser consideradas como um marcador indireto do potencial para formação de radicais livres, que provocam danos celulares, mas não podem ser mensuradas diretamente⁴⁹.

A sobrecarga de ferro acontece precocemente e é encontrada ao nível das células do sistema dos macrófagos mononucleares ou associada com sobrecarga parenquimatosa e uma sobrecarga das células de kupffer. No primeiro tipo, nenhuma manifestação clínica foi descrita e, no segundo, as manifestações clássicas da hemocromatose estão presentes. Um fator importante dessa mutação é seu efeito sobre o aumento da absorção do ferro nos enterócitos, na circulação sanguínea⁵⁰. Para outros autores, essas mutações são responsáveis pela diminuição da função da ferroportina, notadamente, ao nível da elevação do ferro pelas células do sistema dos macrófagos mononucleares. Assim, a retenção do ferro pelos macrófagos diminui a disponibilidade desse metal pelo sistema hematopoético e outros tecidos. E, conseqüentemente, produzirão uma atividade exacerbada dos mecanismos por aumentar a absorção intestinal⁵¹⁻⁵⁴. Os pacientes com hemocromatose absorvem mais ferro que a população geral. Entretanto, as manifestações clínicas da deposição excessiva deste metal ocorrem quando os

indivíduos atingem a faixa etária entre 20 anos a 40 anos de idade, quando as cifras de acúmulo de ferro atingem concentrações em torno dos 20 a 40 gramas de ferro.

O ferro, em excesso na corrente sanguínea e nos tecidos, pode facilitar a proliferação de patógenos invasores, que facilita a replicação viral, causando inflamações e infecções bacterianas, diminuindo a resposta imunológica do hospedeiro, induzindo fibrinogênese, podendo causar lesão celular por liberação de radicais livres, causando estresse oxidativo. A secreção da hepcidina faz parte da resposta imune inata, que é induzida pelas infecções e inflamações^{41,55,56}. A hipoferritinemia, que acompanha as infecções bacterianas e que é mediada pela interleucina-1, é um mecanismo de defesa, procurando dificultar a multiplicação dos microorganismos⁵⁷.

1.4 HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

Os primeiros relatos de Hemocromatose Hereditária (HH) foram escritos no final do século XX, como a “clássica tríade” de cirrose portal, diabetes mellitus e pigmentação bronze da pele, por Trousseau, em 1865. Von Recklinghausen, vinte e cinco anos depois, em 1889, na Alemanha, após a autópsia de um homem com cirrose, associada ao acúmulo massivo de ferro no fígado, descreveu, pela primeira vez, o termo hemocromatose do grego “haima” (sangue) e “chromatos” (cor) como uma desordem no estoque de ferro e injúria no tecido^{58,59}.

Posteriormente, foi proposta, pela primeira vez, como uma doença hereditária, por Sheldon, em 1935, em sua monografia clássica “*Haemochromatosis*”, onde revisa referências de 14 outros autores com casos de hemocromatose, com uma base hereditária. Sua análise criteriosa de 198 páginas, desta rara doença, concluiu esta hipótese sobre um defeito de nascença do metabolismo, parece ser a única que cerca a enorme gama de fatos fornecidos pelos aspectos clínicos, patológicos e químicos da doença. A hereditariedade da doença permaneceu em controvérsia durante quatro décadas, até que Simon e colaboradores demonstraram uma forte associação entre a Hemocromatose e o HLA-A3, estabelecendo que o gene responsável pela doença estaria intimamente ligado à posição HLA-A no braço curto do cromossomo 6⁵⁹.

Em 1996, descobriram o gene HFE, que codifica uma nova molécula HLA da Classe MHC-I, com 343 aminoácidos e a sua localização encontra-se no braço curto do cromossomo 6²⁷.

Tradicionalmente, a hemocromatose hereditária clássica é manifestada clinicamente com hiperpigmentação cutânea, diabetes melittus e hepatomegalia. Outras manifestações clínicas incluem fadiga, dor abdominal, funções hepáticas alteradas, carcinoma hepatocelular, cardiomiopatia, defeito na condução elétrica do coração, hipogonadismo, hipotireoidismo, impotência nos homens e artropatia⁶⁰.

1.4.1 DEFINIÇÃO

A hemocromatose hereditária é uma doença autossômica recessiva, e está caracterizada pelo aumento inapropriado da absorção intestinal do ferro, com conseqüente acúmulo progressivo desse metal em diferentes órgãos e tecidos, especialmente fígado, coração, pâncreas, pele e articulações, podendo ocasionar lesão celular e tecidual, fibrose e insuficiência funcional⁶¹⁻⁶³.

Recentemente, foi definida como uma doença resultante de uma inadequada produção da hepcidina, um hormônio responsável pela regulação do ferro⁶⁴.

1.4.2 CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

A classificação genética da hemocromatose foi, inicialmente, descrita, com base no Consenso Internacional da Conferência da Hemocromatose EASL (em inglês, *International Consensus Conference on Haemochromatosis*). (EASL, 2000) e de acordo com a classificação genética da hemocromatose hereditária no OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação genética de hemocromatose hereditária. OMIM Online Mendelian Inheritance in Man.

Doença	Classificação OMIM	Gene	Proteína	Posição cromossômica	Transmissão
Hemocromatose hereditária tipo 1	2352000	HFE	HFE	6p21	Autossômico recessivo
Hemocromatose hereditária tipo 2	608374	HJV-A	Hemojuvelina	1q21	Autossômico recessivo
	606464	HAMP-B	Hepcidina	19q13	Autossômico recessivo
Hemocromatose hereditária tipo 3	604250	TFR2	Transferrina receptor 2	7q22	Autossômico recessivo
Hemocromatose hereditária do tipo 4	606069	SLC10A1	Ferroportina	2q32	Autossômico dominante

OMIM: On-line Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A classificação genética da hemocromatose hereditária, segundo o banco de dados da OMIM, está descrita na tabela acima. Este estudo concentra-se na hemocromatose primária ou hemocromatose hereditária Tipo I, associada ao gene HFE e abreviada como HH. Portanto, ao nos referirmos às siglas HH, estamos nos referindo a hemocromatose do Tipo I e é amplamente descrita posteriormente.

A hemocromatose do tipo 2 (HJV e 2BHamp) ou hemocromatose juvenil é caracterizada por desenvolver sinais clínicos na puberdade, como hipogonadismo de origem hipofisária e insuficiência cardíaca⁶⁵. A distribuição parenquimatosa da sobrecarga de ferro é equivalente a forma do tipo 1, mas o acúmulo de ferro é maior e as consequências são mais exacerbadas, pois os sintomas aparecem mais precocemente. É uma forma autossômica recessiva rara, mais frequente na Itália, na Grécia e no resto da Europa^{66,67}. A primeira localização genética foi encontrada no cromossomo 1 (1q21)⁶⁸ e, recentemente, identificaram o gene responsável, o qual foi nomeado HFE2⁶⁹. Uma segunda forma do gene 2B HAMP está localizada no braço longo do cromossomo 19 (19q13), que codifica a hepcidina, peptídeo implicado na regulação do metabolismo do ferro⁷⁰.

O gene da Hemocromatose do tipo 3 (Rtf2) está localizado no cromossomo 7 (7q22) e codifica o receptor 2 da transferrina (Rtf2) ²³. A transmissão é autossômica recessiva e foi descrita, principalmente, nos pacientes de origem do sul da Europa (Itália, Sicília e Portugal). Várias mutações diferentes são atualmente conhecidas, mas a mutação Y250X, encontrada nos pacientes, tem participação nos receptores do ferro ⁷¹⁻⁷⁴.

Na Hemocromatose do tipo 4 (ferroportina), a transmissão é autossômica dominante e o gene, localizado no cromossomo 2q32, que codifica a ferroportina, está relacionado ao gene SLC40A1 ⁵⁰. A hemocromatose do tipo 4 é caracterizada por hiperferritinemia, contrastando com um aumento moderado do coeficiente de saturação da transferrina.

Existem outras causas com sobrecarga de ferro, que são classificadas como síndromes secundárias, relacionadas à enfermidade hereditária (talassemia, deficiência do piruvato quinase, anemia sideroblástica, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) entre outros), e doenças adquirida, como anemia sideroblástica, hemotransfusão repetida e outros.

1.5 HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA DO TIPO 1

1.5.1 Definição

A hemocromatose do Tipo 1 é a mais estudada, conhecida como a forma mais frequente nas populações caucasianas, caracterizada por uma hiperabsorção intestinal do ferro, que leva ao desenvolvimento da sobrecarga de ferro no fígado, pâncreas e coração ⁷⁵. É uma doença autossômica recessiva. Sua expressão é tardia e as manifestações clínicas aparecem raramente antes dos 20 anos, quando os estoques de ferro ainda se encontram baixos, estando a maioria dos pacientes sintomáticos entre os 40 e 50 anos de idade. Embora a presença do gene defeituoso esteja igualmente distribuído entre homens e mulheres, a maioria dos estudos relatam uma prevalência maior nos homens, em relação às mulheres, na proporção de 4 a 10:1, em função das “perdas fisiológicas” de ferro que elas apresentam através das menstruações e gestações ^{76,77}.

1.5.2 Fisiopatologia

A Hemocromatose Hereditária (HH) se caracteriza por uma absorção intestinal massiva de ferro procedente da dieta. A expressão clínica é mais comum em homens do que em mulheres que, graças aos ciclos menstruais e gestações, têm maiores perdas de ferro e, assim, tendem a desenvolver sintomas clínicos tardiamente^{59,78-80}. O acúmulo de ferro, ao longo da vida do paciente, provoca alterações de diversos órgãos na quinta década de vida, no caso dos homens e na sexta década de vida, no caso das mulheres. Portanto, a HH apresenta uma etapa inicial assintomática. A HH, em fase avançada, evolui para a cirrose hepática, diabetes, hiperpigmentação da pele (coloração bronzeada), falência cardíaca, artralguas, hipogonadismo e diminuição da libido^{81,82}. Todos estes sintomas são devido ao acúmulo de ferro no fígado, pâncreas, pele, coração, articulações e glândulas endócrinas, respectivamente.

Desta forma, na hemocromatose, polimorfismos no gene *HFE*, rompe a atividade biológica da proteína HFE, que pode prejudicar a ligação entre o receptor da transferrina (TfR) e o ferro acoplado à transferrina nas criptas celulares, causando um falso sinal, em que o estoque de ferro está baixo. A deficiência de ferro nas células das criptas do duodeno, resulta no aumento de expressão do transportador de metais divalentes (DMT1), que é o responsável pela absorção nos vilos, nas células do intestino^{32,36,83}.

O fígado é o órgão de armazenamento principal para o ferro. Na sobrecarga de ferro, a formação de radical livre e geração de produtos de peroxidação de lipídio podem resultar em dano no tecido e, finalmente, em cirrose ou carcinoma hepatocelular. Aproximadamente, 90% do excesso de ferro são depositados no fígado, e por isso, a manifestação clínica mais comum é a fibrose hepática ou cirrose⁸⁴. A cirrose hepática, independente da etiologia, pode predispor ao carcinoma hepatocelular e, portanto, ser considerada uma condição pré-maligna. Sendo assim, a cirrose hepática leva ao carcinoma hepatocelular primário em terça parte dos pacientes afetados por HH. Assim, a prevenção da HH é uma forma de prevenção de câncer. Ainda hoje, os pacientes de HH podem apresentar este quadro clínico, apesar de que a tendência atual é de se detectar os pacientes em uma fase mais precoce antes que ocorra algum dano irreversível ao tecido. Olynyk et al., em 2004, documentaram casos de pacientes com cirrose e fibrose hepática progressiva, mas que apresentavam níveis séricos de ferritina abaixo de

1000ng/mL⁸⁵. Conclui-se, dessa forma, que esses sinais clínicos também devem ser levados em consideração, como medida preventiva para a evolução da forma grave da HH.

O pâncreas, também, é comumente envolvido na hemocromatose, acometido com lesão pelo depósito de ferro, causando diabetes mellitus em 50% dos pacientes. O defeito parece ser relativamente pelas células beta pancreáticas e, também, uma redução da secreção da insulina e c-peptídeo, mas a função das células alfa parece estar intacta. Quando o paciente não tem cirrose, frequentemente, desenvolve diabetes do tipo I⁸⁶.

A associação da hemocromatose com osteoartrite, a qual é encontrada em, aproximadamente, 50% dos pacientes com hemocromatose, tem como fisiopatologia provável a presença de ferro em nível cartilaginoso, induzindo alterações enzimáticas nos condrócitos, assim como, secundariamente, a presença de ferro nas sinovias, que alteraria a nutrição articular, levando ao sofrimento cartilaginoso. A artropatia ocorre de 25%-50% dos pacientes, afetando comumente, as juntas médias metacarpofalangenas. Entre 30% a 50% de pacientes com HH e artropatia também sofrem da doença de deposição de cristal pirofosfato de cálcio (CPPD), e a osteoporose é comum e progride com a idade⁸⁷.

No curso tardio da doença, aproximadamente, 40% dos homens desenvolvem hipogonadismo pituitário, que é caracterizado pelo excesso de ferro, depositado nas células pituitárias, levando a redução dos níveis no soro dos hormônios tróficos. O hipogonadismo secundário é a anormalidade mais comum na HH, causando subsequente diminuição da libido e impotência sexual nos homens⁸⁶.

Em relação às manifestações cardíacas, a hemocromatose pode levar a cardiomiopatia dilatada, caracterizada pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca e distúrbio de condução, como a doença do nódulo sinusal⁸⁸, induzido, pelo excesso de ferro no miocárdio⁸⁹.

Alguns pacientes, também, desenvolvem hiperpigmentação cutânea, que está presente na maioria dos pacientes sintomáticos, mas está ausente nos estágios precoce do acúmulo de ferro. A pigmentação é causada por impregnação de melanina e ferro na camada basal da epiderme, generalizada embora possa ser mais acentuada na face, pescoço, faces extensoras dos antebraços, dorso das mãos, pernas, região genital e antigas cicatrizes⁹⁰.

Alguns relatos demonstram que o consumo de álcool acentuado aumenta a absorção de ferro e potencializa a lesão hepática e os sintomas são mais precoces, podendo aumentar significativamente o risco de cirrose em pacientes com hemocromatose. A doença é mais grave e a incidência de carcinoma hepatocelular é maior do que nos não alcólatras⁹¹.

1.5.3 Diagnóstico

Com os avanços recentes na área da biologia molecular, agora é possível diagnosticar e, assim, tratar a doença em um estágio inicial ou até antes mesmo do aparecimento de sintomas ou danos aos órgãos. Por último, quando a penetrância da doença for melhor compreendida, graças aos grandes estudos com base populacional, a seleção da população genética será mais valiosa⁷⁸.

Atualmente, o diagnóstico é baseado nas investigações de primeiro nível (testes bioquímicos, como saturação de transferrina e ferritina sérica) e do segundo nível (testes genéticos moleculares do gene HFE).

As pessoas afetadas com HH, geralmente, começam a apresentar sintomas na meia idade que varia de uma simples alteração bioquímica a danos em órgãos grave da doença. Os níveis de ferritina sérica são mais utilizados para determinar a sobrecarga de ferro no tecido, que definem o ponto no qual a HH se expressa e que o tratamento deve ser iniciado⁵⁹.

A mutação, no gene HFE homozigoto mutado para C282Y, com concentrações de ferritina sérica acima de 1000 ng/L, tem um alto risco de desenvolver a hemocromatose⁹².

1.5.4 Alteração na mutação do gene HFE

Existem várias mutações, descritas no gene HFE (C282Y, H63D, S65C, V53M, V59M, Q127H, Q283P, P168X, E168Q, G168X e W199X). Porém, as mais estudadas e frequentes, em pacientes portadores HH, são as mutações C282Y e H63D^{93,94}(FIGURA 1).

Em 1996, foram descobertas duas mutações, localizados no braço curto do cromossomo 6, C282Y e H63D. A mutação C282Y ocorre no exon 4, no nucleotídeo (G845A), havendo uma substituição de uma cisteína por uma tirosina na

posição 282 da proteína, e a H63D ocorre no exon 2, no nucleotídeo 187 (C187G), que resulta na substituição de uma histidina pelo ácido aspártico na posição 63, da proteína²⁷. HH é causada principalmente pela mutação C282Y do gene HFE, quatro estados da doença foram publicados: a predisposição genética (genótipo C282Y/C282Y) sem nenhuma alteração adicional, sobrecarga de ferro (aprox. 2-5g) sem anormalidades adicionais, sobrecarga de ferro com sintomatologia inicial, sobrecarga de ferro com dano aos órgãos⁶¹. A absorção de ferro se produz durante toda a vida, porém o desenvolvimento de anormalidades fenotípicas e sintomas clínicos variam, dependendo de fatores, como: doação de sangue, menstruação, gravidez, dieta, suplementação de ferro e outros fatores que podem afetar a expressão da doença. A penetrância é altamente variável em indivíduos susceptíveis de ascendência norte-européia, além disso, reconhecemos que a história natural da HH não é tão discreta como se acreditava anteriormente, porque modificadores genéticos e ambientais da penetrância da doença são, cada vez mais, identificados como influenciando a expressão clínica da doença⁹⁴.

A mutação C282Y resulta no rompimento da ponte dissulfeto que diminui a afinidade do HFE com o beta2-microglobulina e o receptor da transferrina, que são responsáveis pela regulação da absorção do ferro, de modo que a proteína mutante fica retida no complexo de Golgi²⁹. Este rompimento impede a expressão do HFE, com perda da função proteica. Cerca 80% a 100% de indivíduos de descendência do norte europeu, com manifestações clínicas para HH, apresentam homozigose para a mutação C282Y^{32,95}.

Apesar dos estudos realizados a respeito, ainda não se sabe a penetrância exata dos homozigóticos para C282Y na HH, mas as divergências entre o número de pacientes com HH, a frequência alélica da mutação C282Y, na população, em geral, e as previsões da frequência da HH indicam que, ou a penetrância da mutação é incompleta ou que há muitos pacientes sem diagnóstico^{96,97}.

A mutação H63D consiste em uma mudança de C por G no nucleotídeo 187, situado no exón 2, do gene HFE. A mutação provoca a mudança do aminoácido histidina (His) por aspartato (Asp) no aminoácido número 63 da proteína HFE²⁷. Esta mutação não foi associada ao maior risco de HH, quando o indivíduo apresenta apenas esta alteração genética em heterozigose. No entanto, em heterozigose composta com a mutação C282Y/H63D, o indivíduo pode desenvolver HH, sendo, muitas vezes, comparados ao risco de um indivíduo portador do genótipo

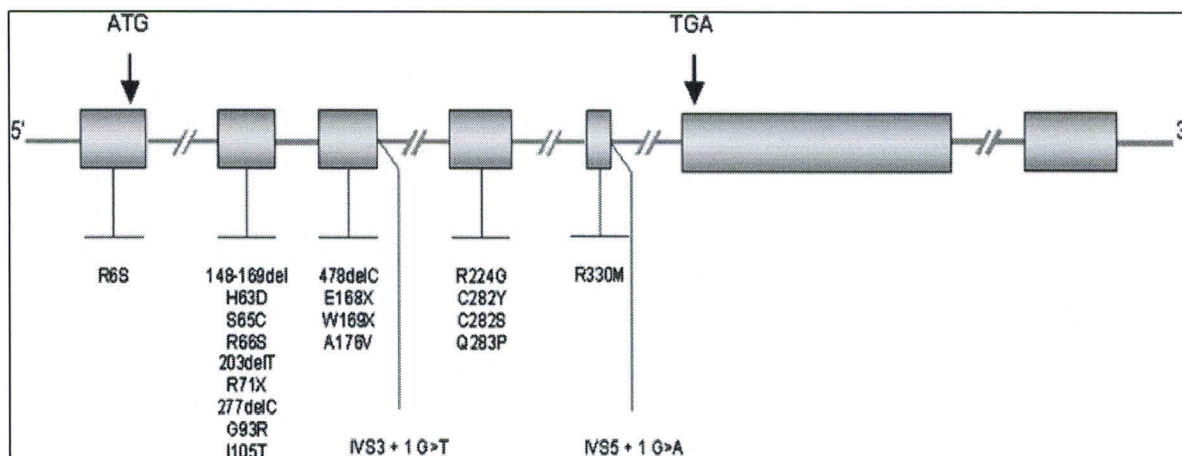
C282Y/C282Y^{98,99}. A mutação H63D trata-se de uma mutação difundida mundialmente, com maior frequência entre os bascos⁹⁶. Na população caucasiana, em geral, a frequência de portadores da mutação H63D é de, aproximadamente, o dobro de portadores da mutação C282Y (2% vs 10%)¹⁰⁰. O genótipo homocigótico para a mutação H63D tem sido associado com a sobrecarga de ferro¹⁰¹⁻¹⁰³.

Foi relatado que a mutação H63D impede o funcionamento normal da proteína HFE e que esta mutação impediria o funcionamento normal, com diminuição da afinidade do receptor da transferrina²⁹.

O genótipo homocigoto mutado não é tão presente quanto o C282Y, embora existam relatos de casos da hemocromatose com esse genótipo^{100,104}. O H63D não interfere com a expressão da proteína HFE, somente determina uma baixa afinidade pelo receptor da transferrina^{29,105}.

Além das mutações C282Y e H63D, descreveram-se outras mutações que permitem uma mudança de aminoácido (mutações *missense*). Algumas dessas mutações foram descritas em pacientes com sobrecarga de ferro, ao passo que outras não possuem uma associação comprovada com a doença e podem ser simples variantes ou polimorfismos. Exceto para as mutações C282Y e H63D, não foram realizados testes funcionais das demais mutações descritas, por isso não se conhece a importância de tais mutações no gene HFE.

Outra mutação foi descrita no gene HFE, a S65C, troca de uma serina por uma cisteína, que foi encontrada em pacientes com sobrecarga de ferro em frequência alélica de, aproximadamente, 1,0%^{106,107}. As duas mutações têm sido descritas, H63D e S65C, associadas com uma forma mais suave da doença¹⁰⁸.



Fonte: Lê Gac; Férec, 2005

Figura 1. Representação esquemática das mutações no gene HFE – A genética molecular da hemocromatose.

1.5.5 Seleção Familiar

A análise das mutações do gene HFE determinará se o paciente apresenta HH (homozigótico para C282Y ou heterozigótico composto C282Y/H63D). Se for detectado que o paciente é heterozigótico para a mutação C282Y, recomenda-se a determinação da mutação H63D, já que foi descrito que uma pequena porcentagem de indivíduos heterozigóticos compostos C282Y/H63D desenvolvem sobrecarga de ferro¹⁰⁹.

No caso de um teste homozigótico para C282Y, deve-se realizar uma análise genética do gene HFE nos irmãos e irmãs da pessoa examinada, assim como análise dos níveis de ferro (TS e ferritina). Se encontrarmos algum outro irmão, também homozigótico para C282Y, o tratamento desta pessoa dependerá dos valores de saturação de transferrina e ferritina sérica que apresente. Se os valores de ferritina sérica estiverem acima do valor normal e forem $<1000 \mu\text{g/L}$, o tratamento por flebotomia deve ser iniciado sem a necessidade de se realizar uma biópsia hepática. Se os níveis de ferro forem normais, a flebotomia não é necessária, mas estes valores devem ser analisados a cada ano¹¹⁰. Estima-se que os valores de ferritina sérica só aumentam $50 \mu\text{g/L}$ por ano em indivíduos com HH¹¹¹. Por isso, não seria necessária uma monitoração anual do indivíduo. Porém, este protocolo frequente facilita o seguimento do indivíduo e reduz a probabilidade de que

a monitoração não se realize por esquecimento do indivíduo ao mencioná-lo por um período muito amplo¹¹⁰.

Se o irmão da pessoa examinada for heterozigótico para C282Y, deve-se analisar a mutação H63D, que é heterozigótico composto (C282Y/H63D), já que existe um pequeno risco de sobrecarga de ferro em indivíduos com este genótipo^{32,112}.

Os filhos de pessoas C282Y homozigóticas têm risco de 1 em 20 de, também, serem homozigóticos em uma população com frequência portadora de 10%. A análise genética pode ser feita de duas formas: tanto o cônjuge como o filho podem ser analisados¹¹³. Testar o cônjuge é o mais prático e, assim, evita-se o problema de se obter consentimento por escrito de um filho. Se o cônjuge for normal para C282Y e H63D, então todos os filhos serão heterozigóticos (C282Y/normal). Se o cônjuge for heterozigótico para C282Y, o filho tem uma probabilidade de 1 entre 2 de ser homozigótico, e é necessário realizar o teste genético para saber que genótipo ele apresenta. Devido à raridade de se dar um incremento significativo dos valores do ferro antes do final da adolescência, a análise genética pode esperar até que o filho atinja a maioridade e possa dar consentimento por escrito. Se o cônjuge for heterozigótico para H63D, o filho pode ser testado geneticamente ao atingir sua maioridade, para se estabelecer se ele é heterozigótico composto (C282Y/H63D)¹¹⁰.

Os filhos de indivíduos com HH homozigóticos para C282Y, também, devem ser analisados, já que, ocasionalmente, se pode descobrir que alguns deles também sejam homozigóticos para C282Y, e isto tem implicações para o resto da família. Para as famílias com sobrecarga de ferro não relacionadas com o gene HFE, a seleção dos irmãos, filhos e pais só podem ser realizados, determinando-se a saturação de transferrina e a ferritina sérica.

1.5.6 Epidemiologia

No Brasil, os estudos envolvendo a hemocromatose hereditária são ainda muito escassos. Em virtude de a população ser uma mistura genética de três raízes ancestrais: Europeus, Africanos e Ameríndios, hoje, o Brasil dispõe de uma grande diversidade genômica¹¹⁴.

A prevalência da hemocromatose hereditária, na população brasileira, não é conhecida. Entretanto, o percentual dos descendentes de italianos e espanhóis é

muito alto no sudeste do Brasil. O índice de portadores de heterozigose de C282Y e H63D tem sido relatado em três estudos no sul e sudeste do Brasil. Um dos estudos relata a prevalência de 1.2% para C282Y e 31.1% para H63D¹¹⁵. O outro apresentou 2.8 % para C282Y e 32.6 para H63D e o terceiro demonstrou a frequência da mutação C282Y elevada, 3.5% no sul e 4.4% no sudeste¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Um estudo, com 35 pacientes brasileiros, com sobrecarga de ferro, demonstrou que 74% apresentaram pelo menos, uma das mutações analisadas do gene HFE. Entre esses, 5 (14%) com genótipo C282Y / C282Y, 4 (11%) C282Y / H63D, 1 (3%) H63D / H63D, 6 (17%) C282Y / WT e 11 (29%) H63D / WT, e 9(26%) pacientes não apresentaram nenhuma das três mutações do gene HFE¹¹⁹.

Em 4 estados da região amazônica brasileira, foi realizado um estudo, onde encontraram as frequências alélicas das mutações C282Y e H63D em 0.3% e 7.0%, respectivamente¹²⁰.

Na cidade de São Paulo, foram realizados dois estudos, onde foram encontradas as frequências alélicas de 1.4%, 10.8% e 1.0% para as mutações C282Y, H63D e S65C, respectivamente, em 148 indivíduos doadores de sangue¹²¹. Enquanto outro demonstrou que 38 (76.0%) dos 50 pacientes, com sobrecarga de ferro, apresentaram mutações no gene HFE, observando a maior frequência para a mutação C282Y (43.0%)¹²². A tabela 2 mostra alguns estudos das frequências alélicas realizados no Brasil, podendo-se observar que a mutação H63D foi encontrada com maior frequência.

Na América Latina, alguns países realizaram estudos, envolvendo as mutações no gene HFE. No Equador, as frequências alélicas para C282Y, H63D e S65C foram 0%, 3.5% e 4.0%, respectivamente¹²³. Outros estudos realizados na Venezuela, Argentina, Chile e México, envolvendo as mutações para C282Y e H63D, mostraram que a mutação para H63D teve maior frequência alélica¹²⁴⁻¹²⁷.

Nos Estados Unidos da América (EUA), foi realizado um estudo abordando algumas regiões. Em Connecticut, as frequências alélicas, encontradas, foram 5.0% e 16.0% para C282Y e H63D, respectivamente. Em Missouri, 4.9% para C282Y e 15.4% para o H63D. As frequências para C282Y e H63D, na região do Alabama foi 6.0% e 12.7%, respectivamente¹²⁸.

Na tabela 3, é possível observar a grande variedade das frequências das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE entre diferentes populações da Europa.

Tabela 2 Frequência alélica das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE no Brasil ^(8 e 12).

Estudo, ano e lugar	Cor da Pele	Frequência alélica (%)		
		C282Y	H63D	S65C
Agostinho et al., 1999 Campinas (*) (N=227)	W	(1.4)	(16.3)	NR
	B	(1.1)	(7.5)	
	M	(1.1)	(1.1)	
Calado et al., 2000 Ribeirão Preto (N=320)	W+B+M	(2.2)	(14.3)	NR
Pereira et al., 2001 São Paulo (N=395)	W	(3.7)	(20.3)	NR
	B	(0.5)	(6.4)	
	M	(0.7)	(13.0)	
Oliveira et al., 2003 São Paulo (N=148)	W	(1.4)	(8.6)	(0.6)
	B	(0.0)	(2.4)	(0.3)
Tarada et al., 2009 São Paulo (N=542)	NR	(2.1)	(13.6)	(0.6)

N= número de participantes no estudo, W= branco, B= preto, M= mulato;

NR= não realizado;

Fonte:Cançado RD et al 2010

Tabela 3 Frequência alélica das mutações do gene HFE em diferentes países Europeus

País	Número de Amostras	Frequência Alélica (%)			Referencias
		C282Y	H63D	S65C	
Romania (Transylvania region)	225	1.75	10.9	0.75	resent study
Ireland (data pooled from 5 studies)	1,119	10.1 ^a	14.7	-	[1]
UK (data pooled from 10 studies)	12,697	8.1	15.2	-	[1]
Denmark (data pooled from 4 studies)	876	7	12.1	-	[1]
Sweden	502	6.1	12.4	1.6	[12]
France (data pooled from 4 studies)	10,395	7.1	16.7	- ^b	[1]
Germany (data pooled from 4 studies)	425	3.8	13.2	-	[1]
Poland	871	3.1	16.2	-	[13]
Czech republic	481	3.4	14.9	1.25	[14]
Austria	271	3.7	12.9	-	[15]
Hungary (data pooled from 4 studies)	1719	3.4	12.3	-	[1]
Slovenia	200	4	14.5	0.5	[16]
Croatia	200	3.3	14.5	1.8	[16]
Serbia and Montenegro	318	1.6	15.7	1.6	[17]
Bulgaria	100	0	23	-	[18]
Spain (data pooled from 8 studies)	1,194	3.2	20.6 ^c	-	[1]
Italy (Apulia region)	500	1.5	14	0.5	[20]
Greece	196	1.3	13.5	-	[19]
Turkey	70	0	13.6	-	[19]
Romania (Moldavia region)	200	1.75	13.25	-	[21]

1.5.7 Tratamento

A flebotomia terapêutica é o tratamento mais seguro, eficiente e econômico para a hemocromatose hereditária. Consiste da remoção inicial de uma unidade de sangue (350mL-450mL, contendo 200mg-250mg de ferro) uma ou duas vezes por semana, dependendo da tolerância hematológica e subjetiva do paciente. O objetivo é obter um estado de depleção de sangue, ou seja, alcançar níveis de ferritina de soro abaixo de 50µg/L e saturação de transferrina abaixo de 50%. Uma vez alcançados estes níveis, o paciente inicia um esquema de manutenção (geralmente com flebotomia a cada 2-3 meses), com o objetivo de manter a ferritina sérica e a saturação da transferrina abaixo dos níveis previamente relatados. É importante enfatizar que os pacientes, que iniciam a flebotomia antes do início dos danos irreversíveis ao órgão, têm uma expectativa de vida normal⁷⁸.

2 JUSTIFICATIVA

A hemocromatose hereditária é uma doença autossômica recessiva, e está caracterizada pelo aumento inapropriado da absorção intestinal do ferro, com consequente acúmulo progressivo desse metal em diferentes órgãos e tecidos, especialmente, fígado, coração, pâncreas, pele e articulações, podendo ocasionar lesão celular e tecidual, fibrose e insuficiência funcional⁶¹⁻⁶³. É uma das mais prevalentes doenças metabólicas hereditárias e que proporciona considerável morbimortalidade (hepatopatia crônica, carcinoma hepatocelular), decorrentes do diagnóstico tardio, haja vista que a eficácia terapêutica depende da precocidade diagnóstica.

Em virtude da heterogeneidade genética observada no Brasil, devido à grande mistura étnica de negroides, caucasoides, ameríndios e indígenas, nota-se a ocorrência de diferentes frequências regionais, sofrendo variações comparadas a populações em outros países. Além do que se trata de um país geograficamente grande, são poucos os estudos demográficos que abordam a população brasileira, como um todo, dificultando a caracterização da população em relação à HH¹²⁹. São vastas as referências bibliográficas internacionais sobre a HH, porém não há relatos do perfil genético na população de Natal/RN.

No Estado do Rio Grande do Norte, a disponibilidade do estudo genético da hemocromatose, envolvendo as mutações C282Y, H63D e S65C e suas correlações clínicas e laboratoriais em pacientes com ferritina elevada, justifica a realização do presente estudo, que é inédito em nossa região. Além de ser considerado um problema de saúde pública, a hemocromatose, pela alta frequência e pela facilidade no diagnóstico laboratorial e genético, bem como no tratamento, deve ser investigada precocemente em pacientes com suspeita desta enfermidade.

Tendo em vista esses dados e estudos preliminares terem demonstrado a necessidade de um estudo mais detalhado em nossa região, é que esta tese se propõe trazer uma resposta, para que se entenda melhor o impacto da frequência destas mutações em relação à Hemocromatose Hereditária.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

- Identificar as mutações H63D, C282Y e S65C do gene da proteína HFE, em pacientes com hiperferritinemia, que são encaminhados ao laboratório DNA Center em Natal-RN, e avaliar a frequência dessas mutações em pacientes com ferritina elevada.

3.2 ESPECÍFICOS

- Definir a correlação estatística entre os genótipos das mutações e os valores da ferritina no grupo de estudo;
- Realizar dosagens bioquímicas em pacientes com suspeita clínica de Hemocromatose Hereditária;
- Realizar análise molecular para identificar as mutações H63D, C282Y e S65C do gene da proteína HFE.

4 MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Grupo de Estudo

O grupo de estudo foi constituído de 299 pacientes com hiperferritinemia, encaminhados ao laboratório DNA Center. Os indivíduos foram triados pelos pesquisadores, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, previamente determinados. Os pacientes foram informados sobre o protocolo de estudo, e somente participaram os que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 1 e 2). Os dados dos pacientes foram obtidos através de um questionário (Anexo 3).

O principal critério para inclusão dos pacientes no estudo foi a elevação da ferritina sérica persistente com idade entre 15 e 70 ou mais anos, de ambos os sexos. Quanto aos critérios de exclusão, não participaram deste estudo os pacientes com anemia hemolítica, talassemia e relatos prévios de transfusão sanguínea.

4.1.2 Grupo Controle

O grupo controle foi composto de 160 alunos e funcionários sem hiperferritinemia, provenientes da Faculdade de Farmácia da UFRN. Este grupo foi utilizado apenas para analisar a frequência dos genótipos.

4.1.3 Aspectos Éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, com o número do processo 0312.0.000-051-06 (Anexo 4).

4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletadas amostras de 20mL de sangue, colhidas por punção venosa, utilizando agulhas estéreis (BDVacutainer), após jejum de, no mínimo 8 horas, de

todos os pacientes para a realização das dosagens bioquímicas e extração de DNA. O sangue foi fracionado em 2 alíquotas, sendo uma sem anticoagulante (Dosagens bioquímicas) e outra com tubo BD Vacutainer e EDTA K2 (5,4 mg) Plus Plastic com capacidade de 5mL para as determinações das mutações C282Y e H63D. As recomendações adotadas basearam-se nas normas do NCCLS (National Committee for clinical laboratory Standards), atualmente denominado CLSI (Clinical and laboratory Standards Institute).

Posteriormente, após as dosagens bioquímicas, o soro foi eliminado e o DNA extraído foi acondicionado a -4°C , durante 2 anos, para eventual validação dos resultados.

4.3 REAGENTES

Iodeto de sódio, álcool isopropílico, clorofórmio, cloreto de magnésio, álcool isoamílico, etanol absoluto, azul de bromofenol da MERCK S.A (Ind. Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); brometo de etídio, EDTA sódico, *Taq* DNA polimerase e tampão 10x concentrado, solução de nucleotídeos, enzima de restrição *Bcl*I da Amersham Pharmacia Biotech do Brasil (São Paulo, SP); enzima de restrição *Sna*BI, oligonucleotídeos, agarose ultra pura, marcadores de tamanho molecular de DNA (100 pb e 10 pb), tampão TE, ácido bórico ultrapuro de Life Technologies do Brasil (São Paulo, SP); xilenocianol-FF, glicerol da Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo, EUA); Tris (hydroxymethyl) aminomethane (SERVA FEINBIOCHEMICAL Gmb H & CO.KG- Heidelberg).

4.4 EQUIPAMENTOS

Centrífuga de bancada modelo LS3 da CELM (Barueri, SP), microcentrífuga de tubos Eppendorf (São Paulo, SP); Termociclador com tampa térmica PE-2200 da Perkin Elmer do Brasil (São Paulo, SP); Fluxo laminar da Veco modelo ULFS-12 (Veco, Campinas, SP); Câmara asséptica da Permutation (São Paulo, SP); Fonte de eletroforese modelo EPS (200 e 400 mA, 550V); Cuba horizontal para eletroforese Gibco Horizon 11-14 (Life technologies do Brasil, São Paulo, SP); Sistema fotográfico Polaroid PS34 (Polaroid, Cambridge, EUA); Transiluminador UV Macrovue (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil, São Paulo, SP); Analisador IMX da

ABBOTT (São Paulo, SP); Pipetas automáticas da Gilson (Emeryville, CA, EUA); Banho de água modelo 102 (Fanem, São Paulo, SP); Aparelho automático SB-200 da CELM (São Paulo, SP); estufa; autoclave; agitador magnético; agitador de tubo; congelador e refrigerador.

4.5 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

As amostras de sangue foram colhidas dos pacientes, por punção venosa, sem anticoagulante, em jejum de 8 horas, após o preenchimento do questionário e assinatura do termo de consentimento, para determinação dos seguintes exames bioquímicos, como mostra a Figura 2.

- Dosagem de Ferritina Sérica;
- Dosagem de Glicose;
- Dosagem de Alanina aminotransferase (ALT);
- Dosagem de Aspartato aminotransferase (AST);
- Dosagem de Gama-glutamil transferase (γ GT);

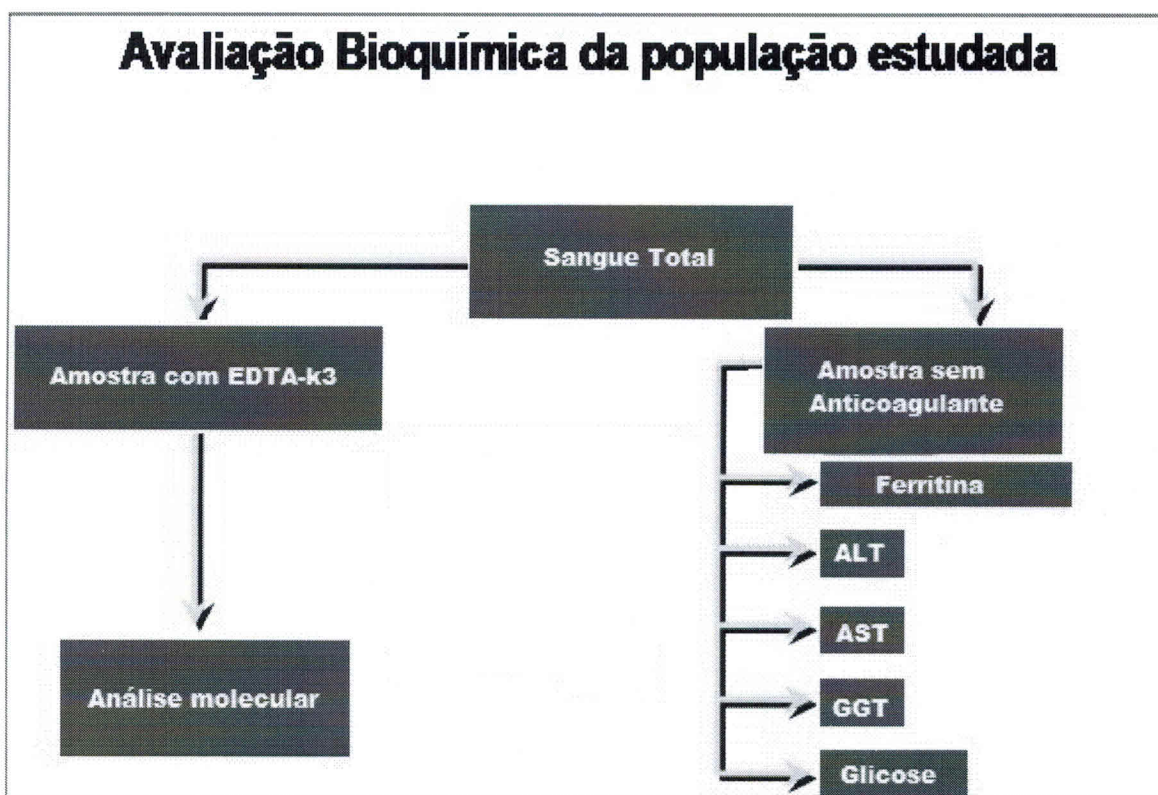


Figura 2 Fluxograma das Análises Laboratoriais.

As determinações foram realizadas por método enzimático, através de kits comercialmente vendidos da BioSystems Reagents and Instruments, Barcelona, Espanha.

4.5.1 Ferritina Sérica

A concentração de ferritina, dos indivíduos em estudo, foi determinada, utilizando “kit ferritin” e o analisador Access da BECKMAN COULTER do Brasil (São Paulo, SP).

O método para determinação da ferritina é totalmente automatizado e baseia-se na captura de ferritina por micropartículas sensibilizadas com anticorpos monoclonais antiferritina. Um segundo anticorpo monoclonal antiferritina, marcado com fosfatase alcalina, liga-se a ferritina sérica capturada. O imuno complexo formado é transferido para uma matriz de fibra de vidro, que se liga, irreversivelmente, às partículas. Após a remoção das proteínas não complexadas, é adicionado um substrato fluorogênico 4-metil-umbeliferil-fosfato que, na presença da fosfatase, forma produto fluorescente, cuja emissão de fluorescência é medida pelo equipamento. A intensidade de leitura é proporcional à concentração de ferritina capturada¹³⁰⁻¹³².

Valores de Referência:

- **Homens 23.9 – 336 (ng/mL, µg/L)**
- **Mulheres 11.0 – 307 (ng/mL, µg/L)**

4.5.2 Determinação da Glicose no Soro

A concentração de glicose, no soro dos indivíduos em estudo, foi determinada por espectrofotometria, utilizando-se o Kit Biosystems Glucose Oxidase, Peroxidase e o analisador BTS-370 Biosystems (Barcelona, ES).

O Kit Glucose utiliza a glicose presente na amostra pela reação descrita abaixo, formando um complexo colorido, que é quantificado por espectrofotometria¹³³.

Procedimento:

Glicose - Reação Ponto final

- 10µL da amostra (Plasma fluoretado)
- 1 mL do reagente (Biosystems)
- Incuba 37°C durante 5 minutos
- Lê no Bioplus-200

Valores de Referência: 70 a 99 mg/dl.

4.5.3 Determinação da Alamina Aminotransferase (ALT/GPT)

A concentração da ALT, no soro dos indivíduos em estudo, foi determinada por espectrofotometria, utilizando-se o Kit Biosystems Alamina Aminotransferase (ALT/GPT) e o analisador BTS-310 Biosystems (Barcelona, ES).

O fundamento do método da alamina aminotransferase (ALT ou GPT) cataliza a transferência do grupo amino da alanina ao 2 oxoglutarato, formando piruvato e glutamato. A concentração catalítica determina-se, seguindo a reação abaixo da desidrogenase láctica (LDH), a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, medido a 340nm^{134,135}.

Procedimento:

Reação cinético, 340nm

Manual Bioplus -200:

- 50ul amostra
- 4ml do reagente a mais 1ml do reagente B.
- O reagente de trabalho, para cada amostra, é previamente aquecido à 37°C no BM.
- Lê no BioPlus

Valores de Referência: até 41U/L

4.5.4 Determinação do Aspartatoamino-Transferase (AST/GOT)

A concentração da AST, no soro dos indivíduos do estudo, foi determinada por espectrotometria, utilizando-se o Kit Biosystems Aspartato Aminotransferase (AST/GOT) e o analisador BTS-310 Biosystems (Barcelona, ES).

A aspartato aminotransferase (AST ou GOT) cataliza a transferência do grupo amino do aspartato a 2 oxoglutarato, formando oxolacetato e glutamato. A concentração catalítica determina-se, seguindo a reação, abaixo descrita, da desidrogenase malática (HDH), a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, medida a 340nm (IFCC methods for measurement of enzymes, 1983; Beleta, Gella, 1990; IFCC Primary reference Procedures, 2002).

Procedimento:

Reação cinético, 340nm

Manual Bioplus -200:

- 50uL amostra
- mL reagente de trabalho (4mL do reagente A (Reagente Tris) mais 1mL do reagente B (Reagente NADH)).
- O reagente de trabalho, para cada amostra, é previamente aquecido a 37°C no BM.
- Leitura no BioPlus

Valores de referência: até 40U/L.

4.5.5 Determinação da γ Glutamiltransferase (γ GT)

A concentração da γ GT, no soro dos indivíduos em estudo, foi determinada por espectrofotometria, utilizando-se o Kit Biosystems Aspartato Aminotransferase (γ GT) e o analisador BTS-310 Biosystems (Barcelona, ES).

A γ glutamiltransferase (γ GT) catalisa a transferência do grupo γ -glutamil da γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida à glicilglicina, libertando 3-carboxi-4-nitroanilina. A concentração catalítica determina-se, a partir da velocidade de formação da 3-carboxi-4-nitroanilina (*IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes, 1983; Beleta, Gella, 1990; IFCC Primary reference Procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C, 2002*)

Procedimento:

Reação cinético, 405nm

Manual Bioplus -200:

- 100µL amostra
- mL reagente de trabalho (4mL de reagente A para 1mL do reagente B);
- O reagente de trabalho, para cada amostra, é previamente aquecido à 37°C no BM;
- Leitura no BioPlus.

Valores de referência:

Homens < 38U/L

Mulheres < 55U/L

4.6 ANÁLISES MOLECULARES

As análises moleculares das mutações C282Y, H63D e S65C, no gene da hemocromatose, foram realizadas, de acordo com o protocolo abaixo¹²⁹: (Figura 3).

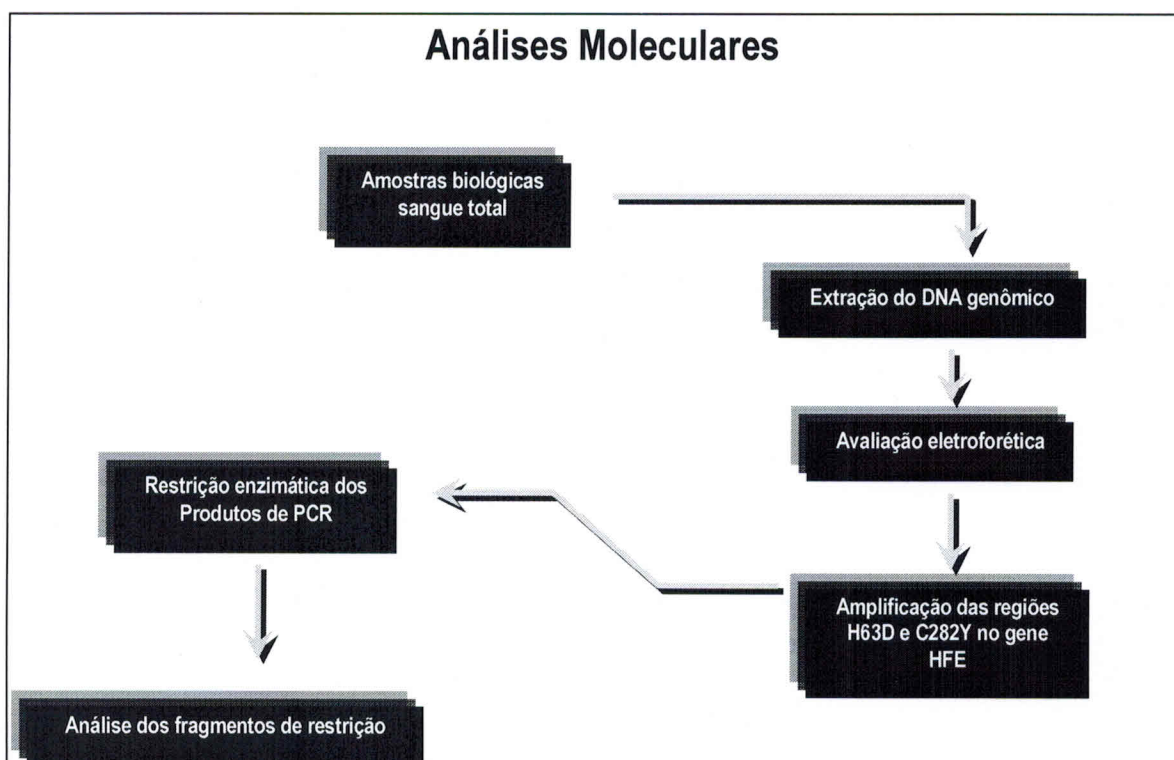


Figura 3 Análises Moleculares para investigação da mutação do gene *HFE* da hemocromatose hereditária.

Fonte: LOPAREV et al., 1991; Bittencourt et al, 2002

4.6.1 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi obtido de sangue total, utilizando um agente lítico caotrópico, de acordo com o protocolo abaixo¹³⁶:

O sangue total foi adicionado a igual volume de iodeto de sódio 6M, que promoveu a lise celular. As proteínas e debris celulares foram removidos por extração com 600µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e o DNA foi isolado da fase aquosa pela adição de isopropanol. O DNA precipitado, foi solubilizado com a adição do tampão Tris-EDTA (TE, Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1mM pH 8,0) e mantido a -20°C.

4.6.2 Avaliação Eletroforética do DNA Genômico

A integridade do DNA, das amostras utilizadas neste estudo, foi avaliada em gel de agarose a 1%, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE, Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0)¹³⁷. As amostras, contendo 5µL de DNA e 3 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25% xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%), foram aplicadas no gel submerso, no tampão TBE. A separação eletroforética foi realizada a 100 V. 70 mA, por 35 minutos e a visibilização das bandas foi feita em transiluminador, sob luz Ultravioleta (UV), utilizando-se, como referência, um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pares de base. A documentação dos resultados foi realizada, utilizando o sistema fotográfico Polaroid, modelo DS 34 (Cambridge, EUA).

4.6.3 Amplificação da Região C282Y do Gene HFE.

As mutações C282Y, no gene da hemocromatose, foram detectadas por PCR-FRLP. A região, no gene C282Y, foi amplificada, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificar um fragmento de 400pb, de acordo com o estudo¹²⁹.

O DNA genômico foi aquecido a 56°C, durante 2 minutos, para solubilizar a amostra e 2,0µL do mesmo foram amplificados nas seguintes condições de reação: 1µL de cada primers 5' TGGCAAGGGTAAACAGATCC 3' and 5'

CTCAGGCACTCCTCTCAACC 3', 1 μ L de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 μ L de Taq DNA polimerase, tampão de PCR (KCL a 50mM, Mgcl2 3,5mM, Tris-HCL a 10mM, pH 9,0) e água esterilizada para volume de 50 μ L.

O DNA foi amplificado por 35 ciclos, sendo cada ciclo composto pelas etapas de desnaturação 96°C, hibridação a 56°C e extensão a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos, conforme demonstrado, esquematicamente, na Figura 4.

4.6.4 Amplificação da Região H63D do Gene da *HFE*

A região H63D, no gene da *HFE*, foi amplificada pela técnica de PCR-FRLP, utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificar um fragmento de 208 pb, de acordo com o protocolo abaixo¹²⁹:

O DNA genômico foi aquecido a 56°C, durante 2 minutos, para solubilizar a amostra, e 2,0 μ L do mesmo foram amplificados nas seguintes condições de reação: 1 μ L de cada primer 5' TGGCAAGGGTAAACAGATCC 3' and 5' CTCAGGCACTCCTCTCAACC 3', 1 μ L de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 μ L de Taq DNA polimerase, tampão de PCR (KCL a 50mM, Mgcl2 3,5mM, Tris-HCL a 10mM, pH 9,0) e água esterilizada para volume de 50 μ L.

O DNA foi amplificado por 35 ciclos, sendo cada ciclo composto pelas etapas de desnaturação 96°C, hibridação a 56°C e extensão a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C, conforme demonstrado, esquematicamente, na Figura 4.

4.6.5 Amplificação da Região S65C do Gene da *HFE*

A região S65C, no gene da hemocromatose, foi amplificada pela técnica de PCR-FRLP, utilizando os mesmos oligonucleotídeos e condições da PCR previamente descritos para a análise da mutação H63D¹⁰⁷.

O DNA foi amplificado por 35 ciclos, sendo cada ciclo composto pelas etapas de desnaturação 96°C, hibridação a 56°C e extensão a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C, conforme demonstrado, esquematicamente, na Figura 4.

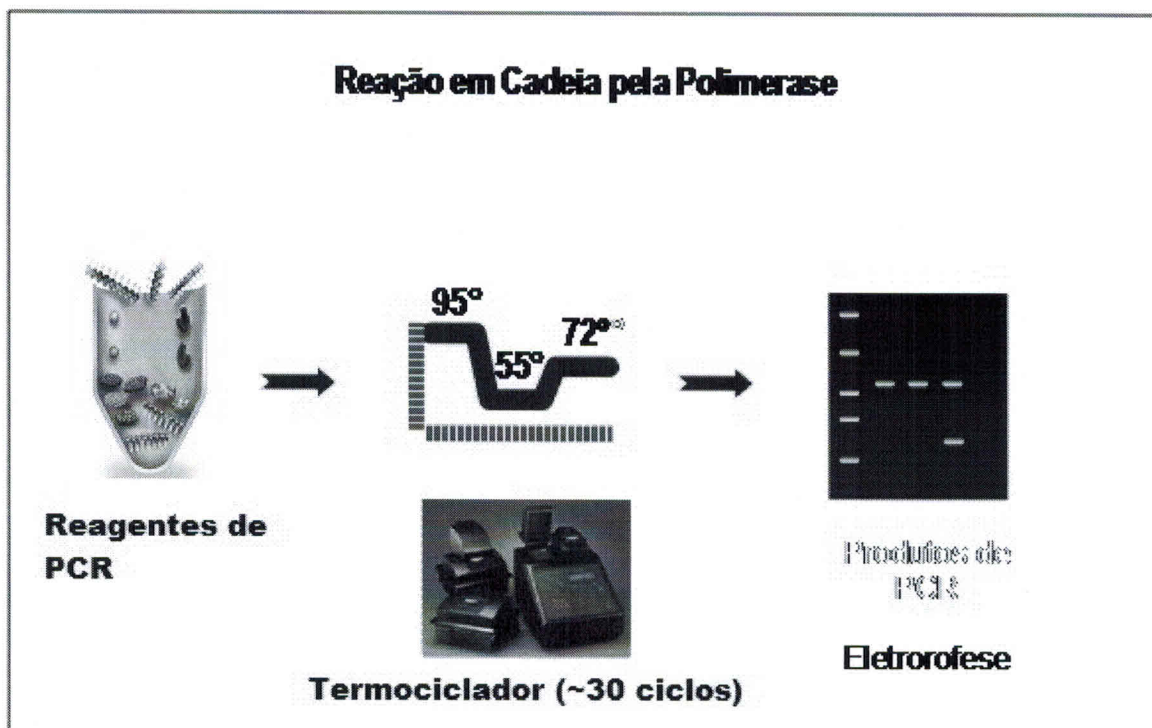


Figura 4 Reação em Cadeia pela Polimerase

Fonte: Farah, 1997¹³⁸

4.6.6 Restrição Enzimática dos Produtos de PCR

Os produtos amplificados foram digeridos com a enzima *BclI*, *SnaB* e *HinfI*, para as mutações H63D, C282Y e S65C, respectivamente.

Foram digeridos com 1 μ L de enzima de restrição, em tampão de reação (Tris-acetato a 10mM, pH7,5, acetato de magnésio a 10mM e acetato de potássio a 50mM) e água esterilizada para volume final de 20 μ l. Os produtos de PCR foram incubados por, no mínimo, 3 horas, a 37°C para C282Y e S65C e 50°C para H63D.

4.6.6 Análise dos Produtos de PCR e dos Fragmentos de Restrição

Os produtos de restrição enzimática foram separados, por eletroforese, em gel de agarose a 3%, em tampão TBE, durante 30 minutos, a 100V e 55mA. Os géis, corados com brometo de etídio, foram visualizados através da luz UV em transiluminador.

4.6.8 Análise das Mutações C282Y, H63D e S65C no Gene da HFE

Os produtos de PCR e de restrição enzimática com *Sna*BI, *Bcl*II e *Hinf*I foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, em tampão TBE, durante 30 minutos, a 100V e 55mA. O gel foi corado com brometo de etídeo e a visualização das bandas foi feita sob luz UV em transiluminador. Os géis foram fotografados com o sistema fotográfico Polaroid, modelo DS34, filme 667 instantâneo, ASA 3000.

A análise dos fragmentos de digestão foi realizada, utilizando um marcador de tamanho de DNA (100pb) e os genótipos, dos indivíduos estudados, foram caracterizados de acordo com o esquema das Figuras 5, 6 e 7.

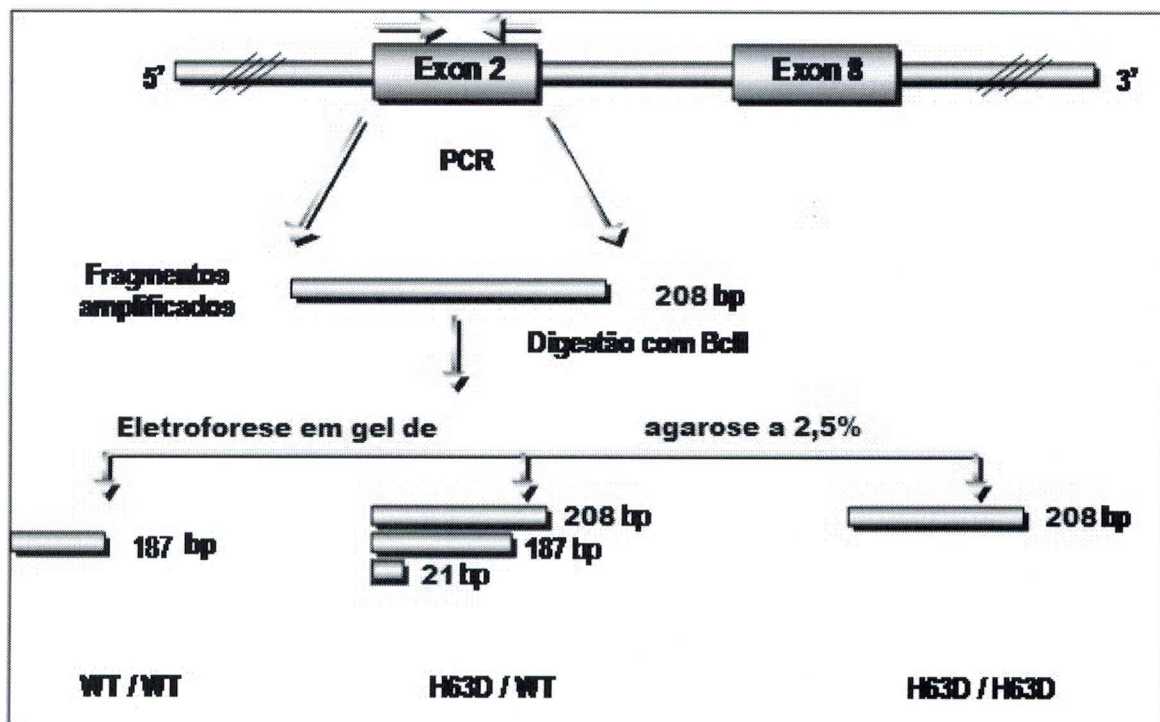


Figura 5 Representação esquemática da avaliação da mutação H63D do Gene *HFE*. Após a amplificação por PCR, com iniciadores específicos P₁ e P₂, os produtos são submetidos à restrição enzimática com a enzima BCL1 e os produtos de digestão e respectivos genótipos são mostrados.

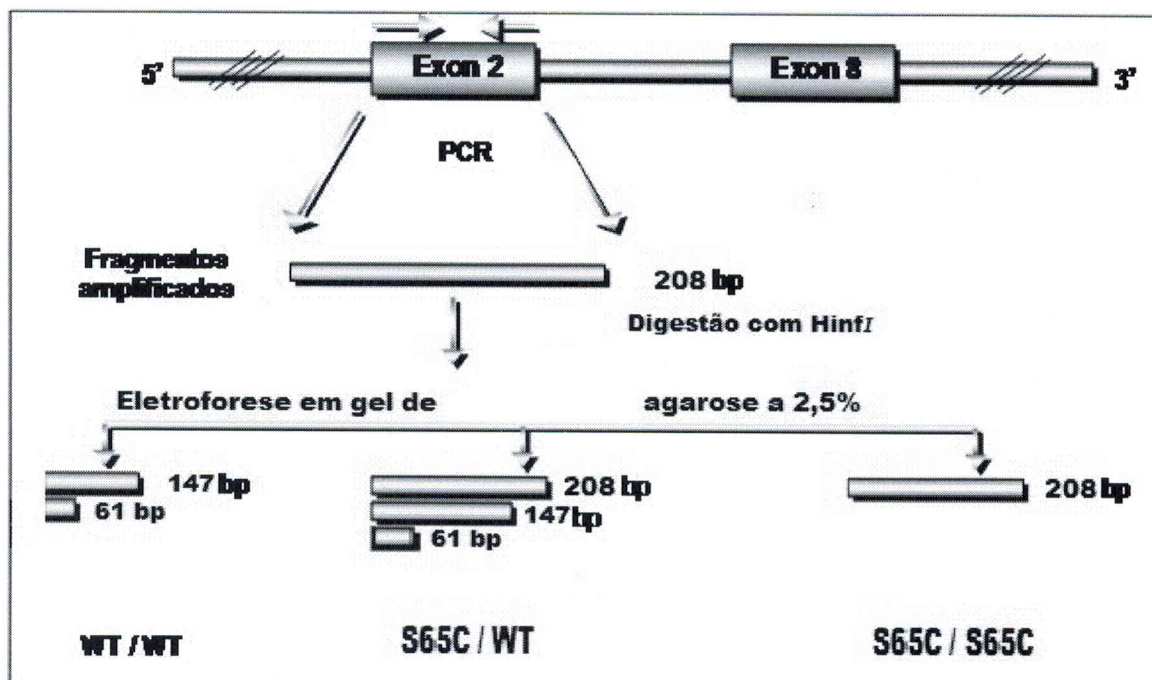


Figura 6 Representação esquemática da avaliação da mutação S65C do Gene *HFE*. Após a amplificação por PCR, com iniciadores específicos P₁ e P₂, os produtos são submetidos à restrição enzimática, com a enzima HinfI e os produtos de digestão e respectivos genótipos são mostrados.

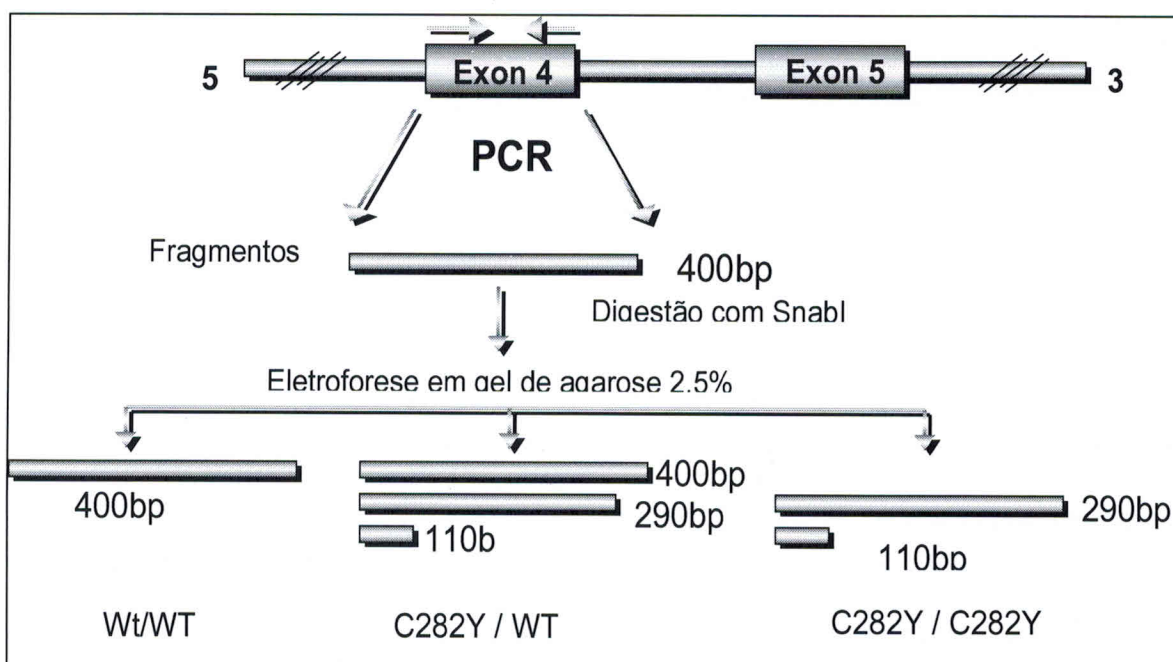


Figura 7 Representação esquemática da avaliação da mutação C282Y do Gene *HFE*. Após a amplificação, por PCR, com iniciadores específicos P₁ e P₂, os produtos foram submetidos à restrição enzimática com a enzima SNAB1 e os produtos de digestão e respectivos genótipos são mostrados.

4.6.9 CONTROLE DE QUALIDADE DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES

A monitorização da precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações bioquímicas foram feitas pela determinação concomitante de espécimes-controle baixo, médio e alto, em cada carrossel fornecido no próprio Kit, utilizado e por participação no Programa Nacional de Controle de qualidade da SBPC. Foram utilizadas, também, replicatas em cada ensaio para analisar a reprodutibilidade do equipamento e calibradores para averiguação da exatidão.

O controle de qualidade das reações de PCR foi realizado com e sem amostra de DNA, ou seja, controle positivo e controle dos reagentes, respectivamente. Para avaliar a reprodutibilidade da reação de PCR, 10% das amostras foram repetidas.

No controle de qualidade da digestão enzimática, para cada procedimento de digestão, foi utilizada sempre uma amostra de DNA homozigoto normal, homozigoto mutado e heterozigoto, para as mutações H63D e C282Y do gene *HFE*. Essas amostras foram submetidas às mesmas condições de tempo e temperatura que os produtos em teste.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para saber se existe diferença significativa entre os grupos. Para análise dos genótipos, foi feita comparação entre proporções do teste quiquadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher. A associação entre as variáveis mensuradas e os fatores de interesse foi verificada, utilizando-se a Análise de Variância com múltiplos fatores (ANOVA) *one way* para medidas repetidas. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados, cujos valores descritos (valores de P) fossem inferiores a 0,05.

5 ARTIGOS PRODUZIDOS

5.1. O artigo foi publicado no periódico Journal of Medicine and Medical Sciences 2010;1(10):453-459. ISSN 1119-3999, cujo fator de impacto está sendo computado para 2013.

Analysis of C282Y and H63D mutations of the HFE gene in patients with persistent hyperferritinemia

Gioconda Dias Rodrigues Leão^{1,2}; Taissa Maria Moura de Oliveira^{1,2}; Andrea Luciana Araújo Cunha Fernandes²; Juliana Mendonça Freire^{1,2}; Roberto Chaves de Vasconcelos²; Márcia Valéria Moura de Carvalho Farias²; Valéria Soraya de Farias Sales¹; Telma Maria de Araújo Moura Lemos¹; Marcos Dias Leão³; Gilmar Amorim de Sousa⁴; Geraldo Barroso Cavalcanti Junior¹.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N; Petropolis. 59010-180 - Natal, RN – Brazil.

²Laboratório DNA-Center. Avenida Afonso Pena 952; Tirol; Natal, RN – Brasil.

³Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Medicina Clínica; Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N; Petropolis. 59010-180 - Natal, RN – Brazil.

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Medicina Integrada; Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N; Petropolis. 59010-180 - Natal, RN – Brazil.

Accepted 01 November, 2010

Hereditary Hemochromatosis (HH) is a genetical disease caused by the high absorption and deposition of iron in several organs. This accumulation results in several clinical complications such as cirrhosis, arthritis, cardiopathies, diabetes, sexual disorders and skin darkening. The H63D and C282Y mutations are well defined in the HH etiology. The objective of this paper will be the identification of the H63D and C282Y mutations in the HFE protein gene and the frequency assessment of these mutations in patients with persistent increased of serum ferritin. Out of the 183 patients studied, 51.37% showed absence of mutation and 48.6% showed some sort of mutation: heterozygous C282Y mutation in 4.92% patients; homozigous C282Y mutation in 1.09%; heterozygous H63D mutation in 30,6%; homozigous H63D mutation in 8.74%; and heterozygous for the mutation in both genes in 3.28%. Due to the high prevalence of hemochromatosis, its seriousness and easy treatment, the genetic diagnosis of HH has become a dream, especially in the high risk group.

Key-words: Hereditary hemochromatosis, Gene HFE, Hyperferritinemia, C282Y mutation, H63D mutation

INTRODUCTION

Hereditary hemochromatosis (HH) is an inherited autosomal recessive disorder of iron metabolism. Due to excessive intestinal absorption, iron accumulates in parenchymal cells of the liver, pancreas, heart and other organs with resultant damage to their structure and impairment of their function. It is one of the most common genetic diseases in caucasians with a prevalence of nearly 1 in 300 (Hanson et al., 2001; Pietrangelo, 2004;

Trinder et al., 2002; Whittington et al., 2002; Kowdley et al., 2008; Ramrakhiani et al., 1998).

Although, the symptoms of the disease are often nonspecific, much of the organ damage is irreversible once it has occurred. The patients with hemochromatosis absorb more iron than the population in general. However, the clinical manifestations of excessive deposition of this metal occur when the individuals reach ages 20 to 40, when the levels of iron accumulation reach concentrations around 20 to 40 grams of iron (Trinder et al., 2002). The clinical manifestations rarely appear before the 20th birthday, when the iron stocks are still low, and a

*Corresponding author E-mail: gbcjunior@hotmail.com; CEP: 59010-180; FAX: + 55 (84) 3215-4226

majority of patients are symptomatic between 40 and 50 years old (Hanson et al., 2001; Pietrangelo, 2004; Trinder et al., 2002; Whittington et al., 2002; Kowdley et al., 2008; Ramrakhiani et al., 1998).

Early detection and therapy is therefore very important as a part of preventive medicine. The discovery of the responsible gene *HFE* in 1996 by Feder et al, that found two mutations located in the short arm of chromosome 6 related to this disease, the C282Y and H63D mutations enabled molecular analysis to be included in the diagnostic strategy for HH (Feder et al., 1996).

Although, the presence of the mutant gene is equally distributed between men and women, most studies report a higher prevalence in men than in women at a proportion of 4 to 10:1 proportion, due to "physiological losses" of iron present in women because of menstruation and pregnancy (Hanson et al., 2001; Trinder et al., 2002; Whittington et al., 2002; Kowdley et al., 2008; Ramrakhiani et al., 1998).

The C282Y mutation occurs in the exon 4 in the nucleotide (G845A) and there is a substitution of a cysteine by a tyrosine in the position 282 of the protein, and the H63D mutation occurs in the exon 2, in the nucleotide 187 (C187G), which results in the substitution of a histidine by aspartic acid in the position 63 of the protein (Hanson et al., 2001; Ramrakhiani et al., 1998; Feder et al., 1996).

Around 80 to 100% of individuals from North European descendency who show clinical manifestations for HH show homozygous state for C282Y mutation (Ramrakhiani et al., 1998; Bacon et al., 1999). Around 11 % of heterozygous individuals (C282Y/H63D) may develop clinical signs of hemochromatosis (Hanson et al., 2001; Trinder et al., 2002; Whittington et al., 2002; Kowdley et al., 2008; Ramrakhiani et al., 1998). Around 5 to 6% of patients clinically diagnosed with HH do not show identifiable mutations in the *HFE* gene, suggesting that other genes are involved in the disease, especially in some populations, like in Southern Italy (Kowdley et al., 2008.; Ramrakhiani et al., 1998). Every year, molecular studies point to the molecular investigations through genetical studies which are able to identify the C282Y and H63D mutations in the *HFE* gene in individuals with HH. The high frequency of the C282Y and H63D mutations in individuals affected in some populations encouraged the usage of molecular tracing techniques of these mutations like a confirming exam to the clinical and laboratory diagnosis of HH (Hanson et al., 2001; Ramrakhiani et al., 1998; Feder et al., 1996).

Considering the lack of genetical studies in Brazil about hemochromatosis, especially in the Northeast area, this paper aimed at identifying and evaluating the *HFE* protein gene and the H63D and C282Y mutations frequency in patients with persistent hyperferritinemia and suspected

of Hemochromatosis in Natal, state of Rio Grande do Norte; Brazil (Natal-RN, Brazil).

PATIENTS AND METHODS

Subjects

Samples of peripheric blood were taken from 183 patients suspected of HH and which were studied. The main criterion for including such patients in the study was the persistent increasing of serum ferritin in individuals aged between 18 and 70 or older, both males and females. As to the exclusion criteria, individuals holding hemolytical anemia, talassemia and previously report of blood transfusion did not take part of the study.

Meanwhile we used a control group of 60 non-related individuals, both males and females, from the Natal-RN, Brazil, without hyperferritinemia and aging between 18 and 50 years old.

The study delimitation and its starting point occurred after its approval by ethics committee of Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil. The patients were informed about the study protocol, and only those who signed the consent term took part.

Two hundred mL of peripheric blood (PB) were collected from every patient by venous puncture after an 8-hour fasting period, at least. Upon collecting, the PB was fractioned into 2 aliquots, one of them in a tube with no anticoagulant destined to serum ferritin dosage and the other in a tube containing EDTA (BD.Vacutainer and EDTAK₂ 5,4 mg Plus Plastic) holding up to 5 mL for studying the C282Y and H63D mutations in the *HFE* gene.

Serum ferritin dosage

The serum ferritin dosage was determined by the immune assay method with micro particles (IMx-Abbott). It is a "sandwich" type of technique based on capturing ferritin by micro particles sensibilized with anti-ferritin monoclonal antibodies. Another anti-ferritin polyclonal antibody with phosphatase alkaline links to the captured serum ferritin. This immune complex is transferred into a matrix of glass fiber which links to the micro particles irreversibly. After washings for non-complex protein removal, the 4-metil-umbeliferil-fosfat fluorogenic substrat is added which, in the presence of phosphatase, forms the fluorescent product whose light emission is read by the equipment. The reading intensity is proportional to the ferritin concentration captured, turning the method a quantitative one (Guerra-Shinohara et al, 1998). The normal serum ferritin levels were 23.9 to 400 ng/mL in male and 11 to 300 ng/mL in female.

DNA extraction

The genomic DNA extraction obtained from total blood was done using a caothropic lithium agent according to the protocol described by Loparev et al (Loparev et al, 1991). The total blood was mixed to the same volume of sodium iodet 6M, promoting the cell lise. The proteins and cell debris were removed by extraction with chloroform/isoamilic alcohol in the proportion of 24:1 and the DNA was isolated from the watery phase by adding isopropanol. The precipitated DNA was solubilized with the addition of the tampon Tris-EDTA (TE, Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1mM pH 8,0) and kept at -20°C.

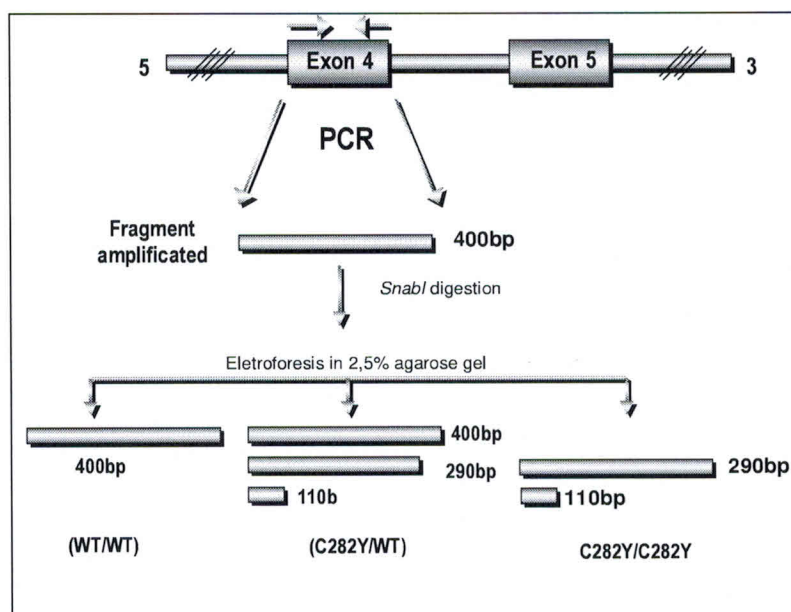


Figure 1. Schematic representation of the evaluation of the HFE gene C282Y mutation. After PCR amplification with specific primers, the fragment de 400 bp are subjected to restriction with the restriction enzymes *Sna*BI and the digestion products and their genotypes are shown.

Detection of C282Y and H63D mutations

The HFE mutations were detected by PCR-RFLP analysis according to some work originally done (Bittencourt et al, 2002). The length of the amplified fragment of exon 4 of the C282Y HFE gene is 400 bp. The G to A transition at nucleotide 845 (amino acid 282) creates a *Sna*BI cleavage site and fragments of 290 and 110 bp after endonuclease digestion. In the presence of the H63D mutation, only the undigested 208-bp fragment is observed, since the C to G transversion at nucleotide 187 (amino acid 63) disrupts a *Bcl*I cleavage site. The fourth exon of the HFE gene flanking the *Sna*BI recognition site for the C282Y substitution was amplified using the following primers: 5' TGGCAAGGGTAAACAGATCC 3' and 5' CTCAGGCACTCCTCTCAACC 3'. Amplification of the second exon of the HFE gene containing a *Bcl*I recognition site for H63D was done using the primers 5' ACATGGTTAAGGCCTGTTGC 3' and 5' GCCACATCTGGCTTGAAATT 3' (Figures 1 and 2). Approximately 800 and 200 ng of genomic DNA were used, respectively, for amplification of of exon 2 and 4 of HFE gene, 0.6 μ M of each primer in a total volume of 50 μ L containe 200mM of each dNTP (Gibco-BRL, New yaork, NY, USA), 2 IU of Taq polymerase (Cenbiot, Porto Alegre, RS, Brasil) and PCR buffer containing 1.5 mM magnesium chloride. The amplification was carried out in a PCR-100 Thermal cycle (MJ Reseach Inc., Watertown, MA, USA) and conditions were some for both amplifications: 35 cycles, each one composed by the denaturation step at 96°C, for 2 minutes, hybridation at 56°C, for 1 minute and extension at 72°C, for 1 minute, with a final extension of 10 minutes at 72°C.

The products amplified were digested with the *Bcl*I and *Sna*BI enzymes, for the H63D and C282Y mutations, respectively and separated by electrophoresis in agarose gel at 2,5%. The band

visualization was done under ultra-violet (UV) light in transluminator.

The fragments analysis of digestion was done by using a DNA-size marker (100pb) and the individuals genotypical profiles studied were evaluated with positive control samples, including the mutated homozygous and heterozygous genotypes (Figures 3 and 4).

Statistical analysis

The variance analysis (ANOVA) was applied in order to know whether there is meaningful difference between the groups. They were done by using the STATISTICAS 6.0 software.

The variables were then analyzed descriptively. For the quantitative analysis, it was done by observing the minimum and maximum values and the mean and standard deviation equation. For the qualitative variables we calculated the absolute and relative frequencies.

RESULTS

The genotype distribution pattern and the allele frequency of C282Y and H63D mutations in the study group HFE gene in comparison to the control group are shown in Table 1, that represents the allelic frequencies and the genotypical distribution for the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in individuals from the control group and the patients group. In both grups the allelic frequency was 11 cases (4.53%) for the C282Y mutation

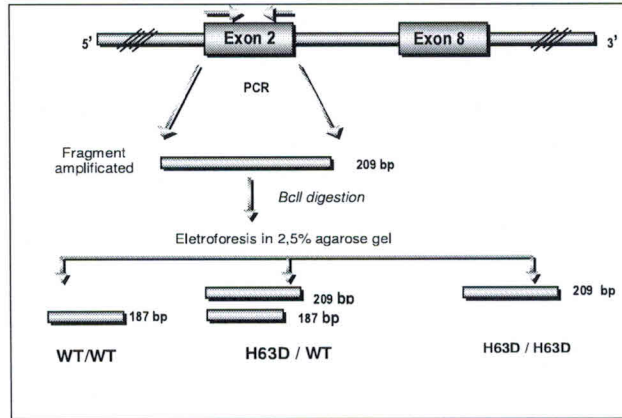


Figure 2. Schematic representation of the evaluation of the HFE gene H63D mutation. After PCR amplification with specific primers, the fragment de 209 bp are subjected to restriction with the restriction enzymes BclI and the digestion products and their genotypes are shown

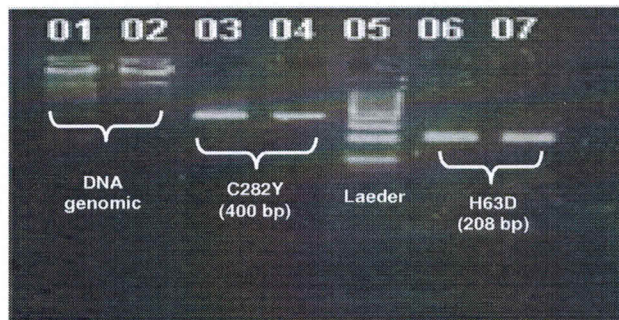


Figure 3. Electroforesis in agarose gel at 2,5% stained with ethidium bromide romide after amplification products and restriction enzyme Snab with the C282Y mutation I and Bcl I mutation H63D.. **Columns 1 and 2** show genomic DNA; **columns 3 and 4** show homozygotes normal for C282Y; **Column 5** show molecular size marker 100bp and **columns 6 and 7:** product of PCR for the H63D mutation PCR, after enzymatic digestion by the enzyme

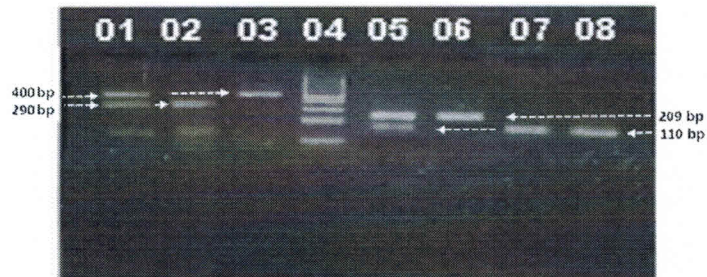


Figure 4. Electroforesis in agarose gel at 2,5% stained with ethidium bromide romide after amplification products and restriction enzyme Snab with the C282Y mutation I and Bcl I mutation H63D. **Columns 1, 2 and 3** show the profile of individuals heterozygous, and homozygous mutant homozygotes normal, respectively for the C282Y mutation. **Column 4** shows molecular size marker 100bp; **Column 5:** subjects heterozygous, **column 6:** normal homozygous and **column 7 and 8:** homozygote for the H63D mutation.

Table 1. Distribution of the different genotypes of the C282Y and H63D mutations in the patients groups with hyperferritinemia and in the control group

Genotype distribution	Control N°. (%)	Patients N°. (%)	Total N°. (%)
C282Y/WT	2 (3.33)	9 (4.92)	11 (4.53)
H63D/WT	16 (26.67)	56 (30.60)	72 (29.60)
C282Y/C282Y	0 (-)	2 (1.09)	2 (0.82)
H63D/H63D	2 (3.33)	16 (8.74)	18 (7.41)
C282Y/H63D	1 (1.67)	6 (3.28)	7 (2.88)
No molecular alteration (Wild Type)	39 (65.0)	94 (51.37)	133 (54.7)
Total	60 (100)	183 (100)	243 (100)

WT: Wild Type; No.: Number of patients; C282Y/WT: mutant C282Y heterozygous; C282Y/C282Y: mutant C282Y homozygous; H63D/WT: mutant H63D heterozygous; H63D/H63D: mutant H63D homozygous; C282Y/H63D: double heterozygous.

Table 2. Representation of age average of patients with and without molecular alterations for the HFE gene

Variable	Mutation	Average (age)	Nº	Ranger
Age	No alteration (WT)	51.0	94	26.0 - 83.0
	C282Y/WT	52.4	9	36.0 - 82.0
	H63D/H63D	50.9	6	36.0 - 72.0
	H63D/WT	52.8	6	32.0 - 72.0
	C282Y/H63D	54.0	6	38.0 - 83.0
	Total	52.2	18	34 - 83.0

Nº. number of patients; WT: Wild Type; C282Y/WT: mutant C282Y heterozygous; C282Y/C282Y: mutant C282Y homozygous; H63D/WT: mutant H63D heterozygous; H63D/H63D: mutant H63D homozygous; C282Y/H63D: double heterozygous.

(C282Y/Wild type) and 72 (29.6%) for the H63D mutation (H63D/Wild type) and a total of 7 cases (6 patients and one control group) was double heterozygous (C282Y/H63D). The homozygous genotypes for the C282Y was presents in 2 cases (all patients) and in 18 cases for the H63D mutation (16 patients and 2 control groups) and 133 cases (94 patients and 39 control groups) were normal homozygous.

We noticed that the genotype distribution in the group studied in both mutations was similar to the control group and there were no meaningful differences. We observed that the allele H63D and genotype H63D heterozygous was the most frequent one both in the study group and the control group, showing the frequency of these genetical alterations in our population (Table 1).

The table 2 shows that out of the 183 patients studied, 94 individuals with average age of 51.0 years and standard deviation of 11.4 did not show any molecular alterations. However, 87 patients showed at least one genetical alteration either under the homozygous state or heterozygous state for the C282Y and H63D mutations, with average age of 53 years. This analysis showed that the moment of genetical study of these patients happened only during the first clinical manifestations and laboratory alterations and not preventively.

As to the serum ferritin values, this determination was studied in relation to sex and presence or absence and type of mutation of HFE gene mutation in each mutation

group, due to the reference values being different. The minimum and maximum values for men were 400 ng/mL and 3204 ng/mL respectively. For women, 310ng/mL for minimum and 1322 ng/mL for maximum.

In men, the highest mean values observed of serum ferritin were 836 ng/mL and 1113 ng/mL for the H63D and C282Y mutation genotypes respectively and also in double heterozygous men for both mutations were noticed a mean of 1170 ng/mL. As to women, the highest mean values observed were 1261 ng/mL and 556 ng/mL in the heterozygous genotype for the C282Y and H63D mutations, respectively (table 3).

DISCUSSION

For the last few years, several international studies have been published in search for the genetical fundaments of hemochromatosis. Due to its heterogeneity, it still has not been possible to elucidate how these alleles act in different populations. In this paper, we analyzed the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in samples from patients with persistent hyperferritinemia aiming at trying to understand its role in the HH predisposition (Hanson et al., 2001; Trinder et al., 2002; Whittington et al., 2002; Kowdley et al., 2008; Ramrakhiani et al., 1998; Feder et al., 1996).

Table 3. Correlation between the H63D and C282Y gene mutations and the serum ferritin levels

	Mutation	Average	Nº.	Ranger
Male	No alteration (WT)	844	79	400 – 1143
	C282Y/WT	844.1	7	653.9 - 1143
	H63D/H63D	836	14	410 - 1600
	H63D/WT	814.1	46	401 - 1756
	C282Y/H63D	1170	5	599 - 2140
	C282Y/C282Y	1321	2	625 - 3204
Female	No alteration (WT)	814.3	18	310 - 1261
	C282Y/WT	1261	2	1200 - 1322
	H63D/H63D	465	2	412 - 518
	H63D/WT	556	10	410 - 869
	C282Y/H63D	890	1	890
	C282Y/C282Y	-	0	-

Nº: number of patients; **WT**: Wild Type; **C282Y/WT**: mutant C282Y heterozygous; **C282Y/C282Y**: mutant C282Y homozygous; **H63D/WT**: mutant H63D heterozygous; **H63D/H63D**: mutant H63D homozygous; **C282Y/H63D**: double heterozygous.

The present paper, for the first time in Natal-RN, city from northeast of Brazil, reports the allelic and genotypical frequencies of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in individuals with persistent hyperferritinemia.

As we evaluate our study, we notice the C282Y and H63D mutation allelic frequency being 6% and 39.3% respectively. In Brazil, the HH prevalence studies are even rarer; however some studies showed an allelic frequency smaller than that in our study that is 1.2 and 31.1% for C282Y and H63D, respectively, (Martinelli et al., 2005), and 2.8 e 32.6% respectively (Agostinho et al., 1999).

Comparing to our world population, our allelic frequency was similar to that in European countries like Portugal, Holand, France and Spain (Hanson et al, 2001; Ryan et al., 1998; Pardo et al., 2004), once our immigrant population had high portuguese, french and dutch influence.

As we evaluate the genotypical frequencies for the C282Y and H63D mutations in the HFE gene, we noticed that in our study, the C282Y/C282Y (1.1%), C282Y/WT (5.0), H63D/H63D (8.7), H63D/WT (31.0) and C282Y/H63D (3.3) mutations were similar to the Portugal population, taking into account that the frequencies were C282Y/C282Y (1.1%), C282Y/WT (10.0), H63D/H63D (8.0), H63D/WT (31.0) and C282Y/H63D (3.0) in that population. Only the C282Y/WT mutation frequency was smaller than in Brazil.

In the present paper, out of the 89 patients that showed the C282Y and H63D mutation, a total of 26 (29.2%) had ferritin values higher than 1000 ng/mL, highest levels being found in male patients (Table 3). It was found that 56 (30.6%) males from this group were heterozygous for the H63D mutation, 6 (3.28%) were double heterozygous

mutat (H63D/C282Y), 16 (8.74%) were homozygous for H63D mutation, 9 (4.92%) were heterozygous for the C282Y mutation, and 2 patients (1.09%) were homozygous for the C282Y mutation with average ferritin values of 1321 ng/mL. For the 2 females in this group, we noticed an average ferritin value of 1261 ng/mL and heterozygous C282Y mutation. We should mention that all these patients had already shown some clinical manifestation related to iron overload.

The homozygosity for the C282Y mutation is now found in approximately 5 out of 1.000 patients from North European descendency. Every homozygous person for the C282Y mutation has a genetical predisposition for an event chain which can trigger severe multiple organ damage (Merryweather-Clarke et al.,1999; Hanson et al, 2001, Trinder et al., 2002; Whittington et al.,2002; Kowdley et al., 2008; Ramrakhiani et al., 1998; . Feder et al., 1996).

As we evaluated the genotypes separately in our study, we noticed that 4.4% of the patients studied had both mutations which are considered important for the HH, that is the C282Y homozygous and the double (C282Y/H63D) heterozygous mutations, from which 1.1% of the patients showed the homozygous C282Y mutation and 3.3% were double heterozygous. Out of the two mutant heterozygous patients, one is a 28-year old Caucasian with ferritin value of 1600 ng/mL and still did not show any clinical manifestations.

Several reports show that among men and women, the C282Y homozygous have some tendency for high serum ferritin, down-followed by the individuals with genotypes C282Y/H63D (double heterozygous), H63D/H63D, C282Y/WT, H63D/WT and these data were practically similar to our study, only highlighting an inversion of the C282Y/WT genotype position with H63D/H63D

comparing to the papers reported (Hanson et al, 2001, Trinder et al., 2002; Whittington et al., 2002; Kowdley et al., 2008; Ramrakhiani et al., 1998; Feder et al., 1996).

In relation to penetration of the compound heterozygous or double heterozygous, which holds the C282Y/H63D genotype and account for approximately 5-10% of the patients diagnosed with HH (Hanson et al, 2001, Trinder et al., 2002; Whittington et al., 2002; Kowdley et al., 2008; Ramrakhiani et al., 1998; Feder et al., 1996). In these studies, the compound heterozygous frequency was 6.7%, being 5 males and 1 female, having the average ferritin values for men of 1170 ng/mL, all of them showed some clinical manifestation and one patient showed liver cirrhosis (Feder et al., 1996; Hanson et al., 2001).

When we compare the study group and the control group in relation to frequency, both had similar results and the H63D genotype had the highest frequency, confirming what has been published in literature. Since hemochromatosis is the most common genetic disease in the Caucasian population¹, even considering the genetic heterogeneity seen in Brazil, our control group showed molecular alteration for those below 40 years of age, but we should emphasize that they still showed no increased ferritin. As the molecular biology advances, it is now possible to detect specific genetic alterations responsible for several diseases, even before the individual show any symptoms. It is important to prevent iron overload, which happens silently and slowly, and detect individuals who are still healthy but who will later show or could show symptoms and signs of a hereditary disease or an increase susceptibility to certain common diseases of adult people.

In conclusion, with the hemochromatosis being considered a public health matter due to its high frequency and by how easy it is to diagnose it both genetically and in laboratory, as well as the treatment, it should be investigated in its early stages in patients suspected of such infirmity. This paper can bring some contribution for a better understanding, penetration and clinical expression of this disease in our population.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Laboratory DNA-Center in Natal-RN, Brazil, for carrying out the molecular analyses.

REFERENCES

- Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, Bordin S, Soares MCP, Menezes RC, Costa FF, Saad STO (1999). Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis.* 25 (21):324-327.
- Bacon BR, Olynyk JK, Brunt EM, Britton RS, Wolff RK (1999). HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. *Ann. Intern. Med.* 130(12):953-962.
- Bittencourt PL, Palacios AS, Couto CA, Cançado, ELR, Carrilho FJ, Laudana AA, Kalil J, Gayotto LCC, Goldenberg AC (2002). Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35(3):329-335.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 13 (4):399-408.
- Guerra-Shinohara EM, Paiva RP, Santos HS, Sumita NM, Mendes ME, Nunes L, Szarfac SC, Vaz AJ (1998). Determinação da ferritina sérica por dois métodos imunológicos automatizados. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 30(2):39-40.
- Hanson EH, Imperatore G, Burke W (2001). HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am. J. Epidemiol.* 154(3):193-206.
- Kowdley KV, Tait JF, Bennett RL, Motulsky AG Hereditary hemochromatosis (2010). Disponível in: [www.geneclinics.org / profiles / hemochromatosis](http://www.geneclinics.org/profiles/hemochromatosis).
- Loparev VN, Cartas MA, Monken CE, Velpandi A, Srinivasan A (1991). An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *J. Virol. Methods.* 34(1):105-112.
- Martinelli AL, Filho R, Cruz S, Franco R, Tavella M, Secaf M, Ramalho L, Zucoloto S, Rodrigues S, Zago M (2005). Hereditary hemochromatosis in a Brazilian University Hospital in São Paulo State (1990-2000). *Genet. Mol. Res.* 31(1):31-38.
- Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD (1999). Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results. The European Haemochromatosis Consortium. *Nat. Genet.* 22(4):325-326.
- Pardo A, Quintero E, Barrios Y, Bruguera M, Rodrigo L, Vila C, Acero D, Guarner C, Pascual S, López L, Moreno R, Fábrega E, Andrade R, Peláez G, Santos J, Buti M, Torres M (2004). Genotype and phenotypic expression of hereditary hemochromatosis in Spain. *Gastroenterol. Hepatol.* 27(8):437-443.
- Pietrangolo A (2004). Hereditary Hemochromatosis – A new look at an old disease. *N. Engl. J. Med.* 350:2383-2397.
- Ramrakhiani S, Bacon BR (1998). Hemochromatosis: advances in molecular genetics and clinical diagnosis. *J. Clin. Gastroenterol.* 2(1):41-46.
- Ryan E, O'keane C, Crowe J (1998). Hemochromatosis in Ireland and HFE. *Blood Cells Mol Dis;* 24(4):428-32.
- Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK (2002). Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut.* 51 (2):290-296.
- Whittington CA, Kowdley KV (2002). Review article: haemochromatosis. *Ailment Pharmacol. Ther.* 16:1963-1975.

5.2 O artigo foi publicado no periódico Journal of Clinical Laboratory Analysis. ISSN 1098-2825, que possui fator de impacto 1.384.

Journal of Clinical Laboratory Analysis 00: 1–8 (2014)

Analysis of HFE Genes C282Y, H63D, and S65D in Patients With Hyperferritinemia From Northeastern Brazil

Gioconda Dias Rodrigues Leão,^{1,2} Juliana Mendonça Freire,^{1,2} Andrea Luciana Araújo Cunha Fernandes,^{1,2,3} Taissa Maria Moura de Oliveira,^{1,2} Nilma Dias Leão,⁵ Erica Aires Gil,¹ Roberto Chaves de Vasconcelos,¹ João Paulo da Silva Azevedo,² Valéria Soraya de Farias Sales,² Telma Maria de Araújo Moura Lemos,² Marcos Dias Leão,⁴ Francisco Fernandes do Nascimento Jr.,³ James Farley Rafael Maciel,³ Rodrigo Villar de Freitas,³ Aldair de Souza Paiva,³ and Geraldo Barroso Cavalcanti Jr.^{2,3*}

¹Laboratório DNA-Center, Natal-RN, Tirol, Natal-RN, Brazil

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Petrópolis, Natal-RN, Brazil

³Departamento de Hematologia, Hemocentro Dalton Cunha, Tirol, Natal-RN, Brazil

⁴Departamento de Medicina Clínica, Centro de Ciências da Saúde, Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Petrópolis, Natal-RN, Brazil

⁵Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Ciências da Saúde, Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Petrópolis, Natal-RN, Brazil

Background: Hereditary hemochromatosis (HH) is a genetic disease caused by the high absorption and deposition of iron in several organs. This accumulation results in several clinical complications such as cirrhosis, arthritis, cardiopathies, diabetes, sexual disorders, and skin darkening. The H63D and C282Y mutations are well defined in the HH etiology. The objective of this article is identification of the H63D and C282Y mutations in the HFE protein gene and the frequency assessment of these mutations in patients with persistent increase of serum ferritin in patients from Natal City from state of Rio Grande do Norte, located in northeastern Brazil. **Results:** Of the 299 patients studied for C282Y and H63D, 48.49% showed absence of mu-

tation and 51.51% showed some sort of mutation: heterozygous C282Y mutation in 4.35% patients, homozygous C282Y mutation in 2.67% patients, heterozygous H63D mutation in 31.44% patients, homozygous H63D mutation in 8.03% patients, and heterozygous for the mutation in both genes (C282Y/H63D) in 5.02% patients. The S65C mutation was studied in 112 patients and heterozygous mutation (S65D/WT) in 2.67% of patients and double mutation (H63D/S65C) in 1.78% of patients were observed. **Conclusion:** Due to the high prevalence of hemochromatosis, its genetic diagnosis has become a challenge, especially in the high-risk group. J. Clin. Lab. Anal. 00:1–8, 2014. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: hereditary hemochromatosis; hyperferritinemia; C282Y mutation; H63D mutation; S65C mutation

This information should be removed and added the item Acknowledgment at the end of the article.

*Correspondence to: Geraldo Barroso Cavalcanti Jr., Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, 1th floor, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Avenida Gus-

tavo Cordeiro de Farias S/N, CEP: 59010-180, Natal-RN, Brazil. E-mail: gbcjunior@hotmail.com

Received 27 January 2013; Accepted 24 June 2013

DOI 10.1002/jcla.21663

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Hereditary hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder of iron metabolism. Due to excessive intestinal absorption, iron accumulates in parenchymal cells of the liver, pancreas, heart, and other organs with resultant damage to their structure and impairment of their function. This accumulation results in several clinical complications such as cirrhosis, arthritis, cardiopathies, diabetes, skin darkening, and hypogonadism. It is one of the most common genetic diseases in Caucasians with a prevalence of nearly one in 300 individuals (1–6).

Although the symptoms of the disease are often non-specific, much of the organ damage is irreversible once it has occurred. The patients with hemochromatosis absorb more iron than the population, in general. However, the clinical manifestations caused by excessive deposition of this metal occur when the individuals reach at the age of 20–40, and the levels of iron accumulation reach at the concentration of around 20–40 g of iron (3). The clinical manifestations rarely appear before 20 years of age, when the iron stocks are still low, and a majority of patients are symptomatically aged between 40 and 50 years (1–6).

The classical HH, also known as type I hemochromatosis, is associated with mutations in the *HFE* gene located on chromosome 6, which encodes the *HFE* (high-iron) protein, a key limiting factor of the duodenal iron absorption, interacting with the transferrin receptor (TfR), and decreasing its affinity for the transferrin (7).

The *HFE-C282Y* gene mutation was first described by Feder in 1996 resulting from a guanine-to-adenine transition in position 845 of the *HFE* gene. About 60–80% of the type I HH cases depend on the ethnic background (1, 5–7).

A second mutation, H63D (a histidine-to-aspartate substitution), resulting from a transversion C (cytosine) to G in position 187 of the *HFE* gene, is associated with a milder form of the disease, as this mutation leads only to a partial decrease in the ability of the HFE protein to reduce the TfR affinity for transferrin. Depending on the ethnic background, this mutation represents 40–70% of the *HFE* non-C282Y hemochromatosis (5, 8).

Finally, a third mutation, S65C (a serine to cysteine substitution), resulting from a transversion A to T (thymine) in position 193 of the *HFE* gene, although initially considered a polymorphism with no phenotypic effect, has been found to be associated with milder forms of hemochromatosis, especially in C282Y/S65C compound heterozygous individuals (5, 9, 10).

Although the presence of the mutant gene is equally distributed between men and women, most studies report a higher prevalence in men than in women in the 4 to 10:1 proportion, due to “physiological losses” of iron that females show because of menstruation and pregnancy (1, 3–6).

Around 80–100% of individuals from North European descendency who show clinical manifestations for HH were homozygous for the C282Y mutation (6, 8). Although compound heterozygosity (C282Y/H63D) appears to be disease associated in such individuals with suspected iron overload, cofactors should be considered as a cause (11).

Around 5–6% of patients clinically diagnosed with HH do not show identifiable mutations in the *HFE* gene, suggesting that other genes are involved in the disease, especially in some populations, such as in southern Italy (5, 6). Every year, molecular studies point to the molecular investigations through genetical studies that are able to identify the C282Y and H63D mutations in the *HFE* gene in individuals with HH. The high frequency of the C282Y and H63D mutations in individuals affecting some populations encouraged the usage of molecular tracing techniques of these mutations such as a confirming exam to the clinical and laboratory diagnosis of HH (1, 6, 7).

Considering the lack of genetical studies in Brazil about hemochromatosis, especially in the northeast area, this article aimed at identifying and evaluating the frequency of mutation and determination of allele frequency of the *HFE* genes H63D, C282Y, and S65C in patients with persistent hyperferritinemia from Natal city from northeast of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Samples of peripheral blood (PB) from 299 patients suspected of HH were studied. The main criterion for inclusion of such patients in the study was the increase of persistent serum ferritin in individuals aged between 18 and 89 years, both males and females. As to the exclusion criteria, individuals with hemolytic anemia, thalassemia, and previously did blood transfusion, did not take part in the study.

For the control, a group of 160 healthy patients of both sexes were selected, with serum ferritin levels within normal limits.

The study delimitation and its starting point occurred after its approval by ethics committee of Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil. The patients were informed about the study protocol, and only those who signed the consent term took part (CEP/UFRN; No. 0312.0.000-061-06).

Twenty milliliters of PB were collected from every patient by venous puncture after an 8-h fasting period, at least. Upon collecting, the PB was fractioned into two aliquots, one of them in a tube without anticoagulant destined to serum ferritin dosage and the other in a tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA-K₂ 5,4 mg Plus Plastic; BD.Vacutainer) holding

Analysis of HFE Gene in Patients with Hyperferritinemia 3

up to 5 mL for studying the C282Y, S65C, and H63D mutations.

Serum Ferritin Dosage

The serum ferritin dosage was determined by the immune assay method with micro particles (Abbott IMX immunology analyser, MA). The normal serum ferritin levels were 15–300 ng/mL in male and 15–200 ng/mL in female (12)

DNA Extraction

The genomic DNA extraction was obtained from total blood according to the protocol described by Loparev et al. (13).

Detection of C282Y, H63D, and S65C mutations

The *HFE* gene C282Y, H63D, and S65C mutations were studied by polymerase chain reaction restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP) assays, as previously described (14). The fourth exon of the *HFE* gene flanking the *Sna*I recognition site for the C282Y substitution was amplified using the following primers: 5'-TGGCAAGGGTAAACAGATCC-3' and 5'-CTCAGGCACTCCTCTCAACC-3'. The length of the amplified fragment of exon 4 of the C282Y *HFE* gene is 400 bp. The G to A transition at nucleotide 845 (amino acid 282) creates a cleavage site and fragments of the 290 and 110 bp are generated after enzymatic restriction with *Sna*I.

Amplification of the second exon of the *HFE* gene containing a *Bcl*I recognition site for H63D was done using the primers 5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3' and 5'-GCCACATCTGGCTTGAAATT-3'. Approximately 800 and 200 ng of genomic DNA was used, respectively, for amplification of exon 2 and 4 of *HFE* gene, 0.6 μ M of each primer in a total volume of 50 μ L containing 200 mM each of dNTP (Gibco-BRL, New York, NY), 2 IU of Taq polymerase (Cenbiot, Porto Alegre, RS, Brasil), and PCR buffer containing 1.5 mM magnesium chloride. In the presence of the H63D mutation, only the undigested 208-bp fragment is observed, since the C to G transversion at nucleotide 187 (amino acid 63) disrupts a *Bcl*I cleavage site.

Amplification of S65C was done using the primers 5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3' and 5'-GCCACATCTGGCTTGAAATT-3'. Approximately 800 and 200 ng of genomic DNA was used, respectively, for amplification of exon 2 and 4 of *HFE* gene, 0.6 μ M of each primer in a total volume of 50 μ L containing 200 mM each of dNTP (Gibco-BRL), 2 IU of Taq poly-

merase (Cenbiot), and PCR buffer containing 1.5 mM magnesium chloride.

The amplification was carried out in a PCR-100 Thermal cycle (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) and conditions were same for both amplifications: 35 cycles, each one composed of the denaturation step at 96°C, for 2 min, hybridization at 56°C, for 1 min, and extension at 72°C, for 1 min, with a final extension of 10 min at 72°C.

The amplified products were digested with the *Bcl*I, *Sna*I, and *Hinf*I enzymes, for the H63D, C282Y, and S65C mutations, respectively, and separated by electrophoresis in agarose gel at 2.5%. The band visualization was done under ultra-violet (UV) light in transilluminator.

The analysis of restriction fragments was done by using a DNA size marker (100 bp) and the genotypical profiles of the individuals studied were evaluated with positive control samples, including the absence of mutation in both alleles or wild type (WT/WT); homozygous mutant with the same mutation in both alleles for the H63D gene (H63D/H63D) and C282Y gene (C282Y/C282Y); heterozygous mutant with a mutation present in one allele H63D/WT, C282Y/WT, and S65D/WT and double heterozygous mutant H63D/C282Y and H63D/S65D.

Statistical Analysis and Determination of the Allele Frequencies

The variance analysis (ANOVA) was applied in order to know whether there is meaningful difference between the groups. It was performed by using the STATISTICS 6.0 software.

The variables were then analyzed descriptively. For the quantitative analysis, it was done by observing the minimum and maximum values and the mean and standard deviation equation. For the qualitative variables, we calculated the absolute and relative frequencies.

The determination of allele frequencies for the *HFE* genes C282Y, H63D, and S65D was performed according to the proposal by Trifa et al. (16).

RESULTS

The genotype distribution pattern and the allele frequency of C282Y and H63D mutations were determined in 299 patients with hyperferritinemia and 160 samples from control group (Table 1). In patients with hyperferritinemia, the genotype frequency observed was as follows: 94 cases of (31.44%) H63D/WT. Of the total 299 patients with hyperferritinemia and 160 samples from control groups, absence of H63D and C282Y mutations was observed in 48.49% and 68.75% of cases, respectively.

The investigation of the S65D mutation was performed in 112 patients with hyperferritinemia and 160 samples

4 Leão et al.

TABLE 1. Distribution of Different Genotypes C282Y, H63D and S65C of the HFE Protein in Patients with Hyperferritinemia and Control Group

Distribution of genotypes	Control group		Patient group	
	No	%	Number	%
C282Y/C282Y	0	0	8	2.67
C282Y/WT	6	3.75	13	4.35
H63D/H63D	2	1.25	24	8.03
H63D/WT	41	25.62	94	31.44
C282Y/H63D	1	0.63	15	5.02
No mutation (WT)	110	68.75	145	48.49
Total (C282Y and H63D)	160	100	299	100
S65C/WT	1	0.62	3	2.67
S65C/S65C	0	0	0	0
S65C/H63D	0	0	2	1.78
S65D/C282Y	0	0	0	0
No mutation (WT)	159	99.38	107	95.53
Total S65D	160	100	112	100

Note: No mutation or WT (Wild Type); No (Number of patients); C282Y/WT (mutant C282Y heterozygous); C282Y/C282Y (mutant C282Y homozygous); H63D/WT (mutant H63D heterozygous); H63D/H63D (mutant H63D homozygous); C282Y/H63D (double heterozygous); S65C/WT (mutant S65C heterozygous).

from control group. The genotypic distribution observed was as follows: three cases (2.67%) and one case (0.62%) were of S65D/WT, in patients with hyperferritinemia and control group, respectively (Table 1).

With respect to the ferritin levels in PB, all patients were investigated taking into account the sex and presence or absence of mutation to the *HFE* gene. The maximum measures of serum ferritin found were 3,204 ng/mL and 2,057 ng/mL in male and female patients, respectively. In male patients, the highest serum levels of ferritin found were with average of 1,362 ng/mL with genotypes C282Y/C282Y, and in female patients serum levels of ferritin were 1,261 ng/mL, with genotypes C282Y/WT (Table 2).

As observed in male patients with hyperferritinemia, female patients with other genotypes also showed elevated levels of serum ferritin, but with average and maximum values lower than those observed in male patients, and the same happened also in female patients with hyperferritinemia without mutations (Table 2).

The allelic frequency for these genes in patients with serum hyperferritinemia was 7.36% for C282Y, 26.59% for H63D, and 2.23% for S63D (Table 3). In samples from control group, the allelic frequencies were 2.19% for C282Y, 14.37% for H63D, and 0.31% for S65C.

DISCUSSION

In spite of the genetics of HH and its clinical perspectives are known, the statement of alleles related with this

TABLE 2. Correlation between the H63D, C282Y and S65C Mutations and the Serum Ferritin Levels

Mutation	No	Serum ferritin levels (ng/mL)		
		Mean	Range	
Male	No alteration (WT)	112	799.4	400–1,143
	C282Y/WT	11	905.7	654–1,198
	H63D/H63D	21	788	345–1,497
	H63D/WT	76	791.4	337–1,756
	C282Y/H63D	11	814.1	442–1,468
	C282Y/C282Y	6	1,362	625–3,204
Female	S65C/WT	1	515.5	515.5
	S65C/H63D	2	510.5	401–620
	No alteration (WT)	28	806.9	414–1,322
	C282Y/WT	2	1,261	1,200–1,322
	H63D/H63D	3	538.3	412–685
	H63D/WT	18	863.05	410–2,057
	C282Y/H63D	4	841	536–991
	C282Y/C282Y	2	628	526–730
	S65C/WT	2	460.1	323–597

Note: WT (Wild Type); No (Number of patients); C282Y/WT (mutant C282Y heterozygous); C282Y/C282Y (mutant C282Y homozygous); H63D/WT (mutant H63D heterozygous); H63D/H63D (mutant H63D homozygous); C282Y/H63D (double heterozygous); S65C/WT (mutant S65C heterozygous).

disease in populations is not clear. Here, we detected that because of the high heterogeneity *HFE* genes (C282Y, H63D, and S65C), it was not possible to elucidate how these alleles affects different populations (Tables 3 and 4).

This study, for the first time in Natal, city from northeastern of Brazil, reports the genotypic frequencies of C282Y, H63D, and S65C mutations in *HFE* gene from individuals with hyperferritinemia and healthy controls in order to attempt to understand their role in predisposition to HH.

Population studies indicate that HH has originated from Northern Europe. The C282Y mutation is most common in Caucasians of North Western Europe, North America, Australia, and New Zealand. Some studies involving populations of the United States, Australia, New Zealand, and Transilvania showed that a frequency of homozygotes and heterozygotes for the C282Y mutation varies between 0.2 and 3% and 7 and 14%, respectively (15–18). The homozygosity for the C282Y mutation is now found in approximately five out of 1,000 patients from North European descendency (Table 4). Every homozygous person for the C282Y mutation has a genetical predisposition for an event chain that can trigger severe multiple organ damage (1, 3–7).

The H63D mutation is two or three times more frequent than C282Y mutation and the prevalence of heterozygous and homozygous for H63D mutation varies between 15 and 40% and 2.5 and 3.6%, respectively, and the frequency of C282Y/H63D genotype is approximately

Analysis of HFE Gene in Patients with Hyperferritinemia 5

TABLE 3. Allele Frequency of C282Y, H63D, and S65C HFE Gene in Brazilian Population and in Present Study

Study, year, reference, and place	Skin color	Allele frequency (%)		
		C282Y Mutation	H63D Mutation	S65C Mutation
Agostinho et al., 1999 (21) Campinas (No. = 227)	W B M	(1.4) (1.1) (1.1)	(16.3) (7.5) (1.1)	NP
Calado et al., 2000 (22) Ribeirão Preto (No. = 320)	W+B+M	(2.2)	(14.3)	NP
Pereira et al., 2001 (23) São Paulo (No. = 395)	W B M	(3.7) (0.5) (0.7)	(20.3) (6.4) (13.0)	NP
Oliveira et al., 2003 (24) São Paulo (No. = 148)	W B	(1.4) (0.0)	(8.6) (2.4)	(0.6) (0.3)
Terada et al., 2009 (25) São Paulo (No. = 542)	NP	(2.1)	(13.6)	(0.6)
Present study (No. = 299)	NP	(7.36)	(26.59)	(2.23*)

Note: No (Number of participants in each study); W (white); B (black) M (mulatto); NP (not performed). *This Allele frequency was only made in 112 patients. Adapted from Cançado RD et al., 2010 (30).

2% (15, 16). Regarding the S65C mutation, the frequency in Caucasians varies between 1% and 4% (9, 10, 18, 19).

In Brazil, population studies performed by several authors have also demonstrated the predominance of H63D mutation, followed by C282Y, with the highest prevalence in white compared to black or mulatto population (Table 3) (14, 21–25), which was similar to that observed in this study and also in countries with strong influence in shaping the Brazilian population such as Portugal, Spain, France, and Italy (20).

The Brazilian population has a great miscegenation. During the time period from the Brazil's discovery and beginning of colonization to the present date, the percentage of the descendents of European immigrants is 58%, 40% of Africans, and 2% of Asians, besides the great influence of Amerindian (26–29). The miscegenation between people of different ethnicities during this period was a determinant factor in the genetic diversity of the population, reflecting a large variability of results in the investigation of biochemical, molecular, and immunological changes such as mutation or polymorphism of genes such as an HFE gene (21, 26–29).

Thus, some authors point out that the investigation of the frequency of HFE mutations in the Brazilian population, mainly in C282Y gene may present a wide range

TABLE 4. Allele Frequency of the HFE Mutations C282Y, H63D and S65C in Different Countries

Country	Study, year, and reference	Allele frequencies (%)		
		S65D	C282Y	H63D
Denmark	Milman et al., 2004 (36)	NP	5.7	13.4
Sweden	Holmstrom et al., 2002 (38)	1.6	6.2	11.4
Finns, Swedes, Swedish Saamis	Beckman et al., 2001 (39)	3.0	2.0	7.9
Faroe Islands	Milman et al., 2005 (37)	1.0	8.0	17.5
Ireland	Ryan et al., 1998 (40)	NP	14.0	17.9
UK	Merryweather-Clarke et al., 2000 (41)	NP	8.1	15.2
France	Mura et al., 1999 (9)	1.95	7.7	14.0
Germany	Merryweather-Clarke et al., 2000 (39)	NP	3.8	13.2
Poland	Moczulski et al., 2001 (42)	NP	3.1	16.2
Czech Republic	Cimburová M et al., 2005 (18)	1.25	3.4	14.9
Austria	Merryweather-Clarke et al., 2000 (41)	NP	3.7	12.9
Croatia	Ristic et al., 2003 (43)	1.8	3.3	14.5
Slovenia	Ristic et al., 2003 (43)	0.5	4.0	14.5
Russia	Mikhailova et al., 2003 (44)	1.7	3.7	13.3
Bulgaria	Merryweather-Clarke et al., 2000 (41)	NP	0.0	23.0
Nothern Italy	Mariani et al., 2003 (45)	1.3	3.2	13.4
Italy, Apulian	Pietrapertosa et al., 2003 (46)	0.5	1.5	14.0
Greece	Merryweather-Clarke et al., 2000 (41)	NP	1.3	13.5
Nothern Spain	Altes et al., 2004 (47)	1.0	3.0	20.0
Spain, Basque	Merryweather-Clarke et al., 2000 (41)	NP	3.6	30.4
Portugal	Porto et al., 1998 (48)	NP	2.8	23.0
USA, Caucasian	Beutler et al., 2000 (49)	1.6	6.3	15.2
USA, Hispanic	Beutler et al., 2000 (49)	0.6	2.7	12.4
USA, Asian	Beutler et al., 2000 (49)	0.0	0.2	3.3
USA, Black	Beutler et al., 2000 (49)	0.7	1.1	5.1
Transilvania, Romenia	Trifa et al., 2012 (17)	0.75	1.75	10.9

NP, not performed.

6 Leão et al.

of results, depending not only on the basis of population, but also on the criteria adopted in the selection of each sample, with such region, ethnicity, and the criteria used for the detection of iron overload (Table 3).

Cançado et al. in 2007 (30) conducted a study on the frequency of gene mutation C282Y, H63D, and S65D in patients with clinical suspicion of HH in São Paulo, Brazil, showing the presence of *HFE* gene mutations in 76% of this group of patients with genotype being 30.0% for C282Y/C282Y, 14.0% for C282Y/H63D, 2.0% for H63D/H63D, and 14.0% and 16.0% for C282Y/WT and H63D/WT, respectively; there were no cases with a mutation involving the gene S65C.

Bittencourt et al. (14), in a study performed to investigate the C282Y and H63D mutations of the gene in 15 Brazilian individuals with histologic diagnosis of HH, observed frequency of 53.0% patients with genotype C282Y/C282Y and 13.5% patients with genotypes C282Y/WT and H63D/WT.

In Latin America, some countries have conducted studies involving mutations in the *HFE* gene (31–35). In Ecuador, the allele frequency for C282Y, H63D, and S65C were 0%, 3.5%, and 4.0%, respectively (31). In a study conducted in Venezuela by Vizzi et al. (32), the allele frequency for C282Y and H63D were 3.8% and 21.1%, respectively. In Argentina and Chile, the allele frequency for C282Y and H63D was 2.6% and 6.7%, 2.4% and 23.0%, respectively (33, 34). In a study conducted in Mexico by Hanson et al. (35), the allele frequency for C282Y and H63D were 0% and 13.0%, respectively.

In Natal, city from state of Rio Grande do Norte, located in northeastern Brazil had strong genetic influence of the European peoples, mainly Portuguese, French, Dutch, and Spanish in addition to the indigenous peoples and Africans, constituting one of the largest regions of Brazil with index miscegenation.

As we evaluated the genotypes separately in our study, we noticed that 7.69% of the patients studied had both mutations that are considered important for the HH, which are the C282Y homozygous and the double heterozygous mutations (C282Y/H63D), from which 2.67% of the patients showed the homozygous C282Y mutation and 5.02% of the patients showed double heterozygous mutation (Table 1).

In the present study, we observed a predominance of mutations in the gene H63D ($n = 133$), 94 (31.44%) cases were H63D/WT, 24 (8.03%) cases were H63D/H63D, and also double heterozygote mutation (H63D/C282Y) in 15 cases (5.02%). The mutation C282Y involving the C282Y gene totaling 36 patients (12%) with the following distribution: 15 cases (5.02%) were double heterozygous mutant (H63D/C282Y), 13 (4.35%) cases were C282Y/WT, and 8 (2.67%) cases were C282Y/C282Y. The heterozygous genotype for S65C/WT was detected

in three out of 112 patients (2.67%) and heterozygous compounds with H63D in three cases (1.78%) (Table 1). Our results being consistent with that described by Brazilian authors and research from other countries (Tables 3 and 4).

In the control of healthy individuals, genotype frequency of mutation as 6 out of 160 individuals (3.75%) with genotype C282Y/WT, 2 (1.25%) H63D/H63D, 41 (25.62%) H63D/WT, and one case (0.63%) C282Y/H63D was observed. In this group, one case (0.62%) was found with the S65C/WT mutation and no case was found with C282Y/C282Y mutation (Table 1).

The allelic frequency found in our controls of healthy individuals was 2.19%, 14.37%, and 0.31% for C282Y, H63D, and S65C, respectively, lower than group of patients with hyperferritinemia that was 7.36%, 26.59%, and 2.23% for genes *HFE* C282Y, H63D, and S65C, respectively, corroborating with some international studies, mainly in populations from Portugal, France, Spain, and Italy (Table 4).

In this study, the frequency of the group of patients with hyperferritinemia detected the genotypic frequency of mutation as being 13 cases (4.35%) with genotype C282Y/WT, 8 (2.7%) C282Y/C282Y, 24 (8.0%) H63D/H63D, 94 (31.3%) H63D/WT, 15 (5.0%) C282Y/H63D, 3 (2.67%) S65C/WT, and 2 (1.78%) S65C/H63D (Table 1).

In this group, the highest levels of ferritin were found in male patients. It was found that 76 patients (46.9%) from this group were heterozygous for the H63D mutation, 11 (6.8%) patients were double heterozygous mutant (H63D/C282Y), 21 (13.0%) patients were homozygous for the H63D mutation, 11 (6.8%) patients were heterozygous for the C282Y mutation, and six patients (3.7%) were homozygous for the C282Y mutation with average ferritin value of 1,362 ng/mL.

Several reports show that among men and women, the C282Y homozygous have some tendency for high serum ferritin, downfollowed by the individuals with genotypes C282Y/H63D (double heterozygous), H63D/H63D, C282Y/WT, and H63D/WT, and these data were practically similar to our study, only highlighting an inversion of the C282Y/WT genotype position with H63D/H63D comparing to the papers reported (Table 2).

Approximately 5–10% of patients diagnosed with HH presents the compound heterozygous for C282Y/H63D (1, 3–7). In these studies, the compound heterozygous frequency was 5.0%, having the average ferritin values of 814.1 ng/mL for males and 841.0 ng/mL for females, all of them showed some clinical manifestation and one patient showed liver cirrhosis (1, 5–7). For compound heterozygous S65C/H63D, the frequency was 1.78%, found just in male patients with average ferritin values of 510.5 ng/mL.

Analysis of HFE Gene in Patients with Hyperferritinemia 7

When we compare the study group and the control group in relation to frequency, both had similar results and the H63D genotype had the highest frequency, confirming what has been published in literature (Tables 3 and 4). Since hemochromatosis is the most common genetical disease in the Caucasian population, even considering the genetical heterogeneity seen in Brazil, our control group showed molecular alteration for those below 40 years of age, but we should emphasize that they still showed no increased ferritin. As the molecular biology advances, it is now possible to detect specific genetical alterations responsible for several diseases, even before the individual show any symptoms. It is important to prevent iron overload, which happens silently and slowly, and detect individuals who are still healthy but who will or could show symptoms and signs of a hereditary disease or an increase susceptibility to certain common diseases of adult people.

In conclusion, with the HH is considered a public health matter with high frequency, it should be investigated in its early stages in patients suspected for this infirmity. This article brings a contribution for a better understanding of penetration and clinical expression of this gene in our population, especially in the high-risk group, since the H63D and C282Y mutations are well defined in the HH etiology.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by Pro-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PROPESQ/UFRN), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank the Laboratório DNA-Center in Natal-RN, Brazil, for carrying out the molecular analysis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis. A new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004;350:2383–2397.
- Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: A HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol* 2001;154(3):193–206.
- Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 2002;51(2):290–296.
- Whittington CA, Kowdley KV. Review article: Haemochromatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1963–1975.
- Kowdley KV, Bennett RL, Motulsky AG. HFE – Associated Hereditary Hemochromatosis. *GeneReviews*; Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1440>. (Accessed June 10, 2013).
- Ramrakhiani S, Bacon BR. Hemochromatosis: Advances in molecular genetics and clinical diagnosis. *J Clin Gastr* 1998;2(1):41–46.
- 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.
- Bacon BR, Olynyk JK, Brunt EM, et al. HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. *Ann Int Med* 1999;130(12):953–962.
- Mura C, Raguene O, Férec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: Evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999;93:2502–2505.
- Wallace DF, Walker AP, Pietrangelo A, et al. Frequency of the S65C mutation of HFE and iron overload in 309 objects heterozygous for C282Y. *J Hepatol* 2002;36:474–479.
- European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* 2010;53:3–22.
- Worwood M, May A. Iron deficiency anaemia and iron overload in: Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. *Dacie and Lewis Practical Haematology*; chapter 9, pag 182; 11th Ed Elsevier Churchill Livingstone, London, 2012.
- Loparev VN, Cartas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *J Virol Methods* 1991;34(1):105–112.
- Bittencourt PL, Palácios SA, Couto CA, et al. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:329–335.
- Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, et al. Screening for hemochromatosis: High prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 2001;36(10):1108–1115.
- Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 2005;352:1769–1778.
- Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, et al. HFE gene C282Y, H63D and S65C mutations frequency in the Transylvania region, Romania. *J Gastrointestin Liver Dis* 2012;21:177–180.
- Cimburová M, Putová I, Provazníková H, et al. S65C and other mutations in the haemochromatosis gene in the Czech population. *Folia Biol (Praha)* 2005;51:172–176.
- Oliveira VC, Caxito FA, Gomes KB, et al. Frequency of the S65C mutation in the Hemochromatosis gene in Brazil. *Genet Mol Res* 2009;3:279–298.
- Salvioni A, Mariani R, Oberkanins C, et al. Prevalence of C282Y and E168X HFE mutations in an Italian population of Northern European ancestry. *Haematologica* 2003;88(3):250–255.
- Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, et al. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25(21):324–327.
- Calado RT, Franco RF, Pazin-Filho A, et al. HFE gene mutations in coronary atherothrombotic disease. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(3):301–306.
- Pereira AC, Mota GF, Krieger JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: Effects of admixture for screening programs. *Hum Biol* 2001;73(1):145–151.
- Oliveira TM, Souza FP, Jardim AC, et al. Mutations in the HFE gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2006;39(12):1575–1580.
- Terada CT, Santos PC, Caçado RD, et al. Iron deficiency and frequency of HFE C282Y gene mutation in Brazilian blood donors. *Transfus Med* 2009;19(5):245–251.

8 Leão et al.

26. Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen A, et al. HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the State of São Paulo. *Tissue Antigens* 2001;57:158–162.
27. Braun-Prado AL, Vieira Mion N, Farah Pereira L, et al. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSCP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens* 2000;56(5):417–427.
28. Callegari-Jacques S, Salzano FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *J Braz Ass Adv Sci* 1999;51:166–174.
29. Parr FC, Amado RC, Lambertucci JR, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci US A* 2003;100(1):177–182.
30. Cançado RD, Gugliemi ACO, Vergueiro CSV, et al. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007;29(4):351–360.
31. Leone PE, Giménez P, Collantes JC, Paz-y-Miño C. Analysis of HFE gene mutations (C282Y, H63D, and S65C) in the Ecuadorian population. *Ann Hematol* 2005;84(2):103–105.
32. Vizzi E, Loureiro C, Gerder M, et al. Mutation analysis of the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis in a Venezuelan sample. *Ann Hematol* 2005;84:802–806.
33. Soria NW, Isasi SC, Chaig MR, de Burgos NMG. Analysis of C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in blood donors from Córdoba, Argentina. *Ann Hematol* 2009;88:77–79.
34. Wolff C, Armas R, Frank J, Poblete P. Mutaciones del gen de la hemocromatosis en donantes de sangre voluntarios y em pacientes con porfiria cutanea tarda en Chile. *Medicina (B Aires)* 2006;66:421–426.
35. Hanson E, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2001;154:193–206.
36. Milman N, Pedersen P, Ovesen L, Melsen GV, Fenger K. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in 2501 ethnic Danes. *Ann Hematol* 2004;83(10):654–657.
37. Milman N, Steig T, Koefoed P, et al. Frequency of the hemochromatosis HFE mutations C282Y, H63D, and S65C in blood donors in the Faroe Islands. *Ann Hematol* 2005;84:146–149.
38. Holmstrom P, Marmur J, Eggertsen G, et al. Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: A retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls. *Gut* 2002;51:723–730.
39. Beckman LE, Sjoberg K, Eriksson S, et al. Haemochromatosis gene mutations in Finns, Swedes and Swedish Saamis. *Hum Hered* 2001;52:110–112.
40. Ryan E, O'Keane C, Crowe J. Hemochromatosis in Ireland and HFE. *Blood Cells Mol Dis* 1998;24:428–432.
41. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet. Test.* 2000;4:183–198.
42. Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B. Frequency of the hemochromatosis C282Y and H63D mutations in a Polish population of Slavic origin. *Med Sci Monit* 2001;7:441–443.
43. Ristic S, Makuc J, Starcevic N, et al. Hemochromatosis gene mutations in the Croatian and Slovenian populations. *Clin Genet* 2003;64:444–446.
44. Mikhailova SV, Kobzev VF, Kulikov I, et al. Polymorphism of the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis in populations of Russia. *Genetika* 2003;39:988–995.
45. Mariani R, Salvioni A, Corengia C, et al. Prevalence of HFE mutations in upper Northern Italy: Study of 1132 unrelated blood donors. *Dig Liver Dis* 2003;35:479–481.
46. Pietrapertosa A, Vitucci A, Campanale D, et al. HFE gene mutations in an Apulian population: Allele frequencies. *Eur J Epidemiol* 2003;18:685–689.
47. Altes A, Ruiz A, Barcelo MJ, et al. Prevalence of the C282Y, H63D, and S65C mutations of the HFE gene in 1,146 newborns from a region of Northern Spain. *Genet Test* 2004;8:407–410.
48. Porto G, Alves H, Rodrigues P, et al. Major histocompatibility complex class I associations in iron overload: Evidence for a new link between the HFE H63D mutation, HLA-A29, and non-classical forms of hemochromatosis. *Immunogenetics* 1998;47:404–410.
49. Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho N. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Ann Intern Med* 2000;133:329–337.

6 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES

Nos últimos 150 anos, um grande número de relatos tem sido publicado mundialmente, em busca de um maior entendimento acerca dos fundamentos genéticos da hemocromatose. Devido a sua heterogeneidade, ainda não tem sido possível elucidar, de maneira satisfatória, como esses alelos atuam em diferentes populações.

A hemocromatose hereditária é uma doença autossômica recessiva e está caracterizada pelo aumento inapropriado da absorção intestinal do ferro, com consequente acúmulo progressivo desse metal em diferentes órgãos e tecidos, especialmente fígado, coração, pâncreas, pele e articulações, podendo ocasionar lesão celular e tecidual, fibrose e insuficiência funcional⁶¹⁻⁶³.

Recentemente, foi definida como uma doença resultante de uma inadequada produção da hepcidina, hormônio responsável pela regulação do ferro⁶⁴.

A hemocromatose é uma doença relativamente comum, que afeta indivíduos adultos, causa morbidez e mortalidade substanciais e pode ser prevenida com tratamento precoce, sendo considerada um distúrbio alvo clássico para o programa de seleção. O objetivo da seleção, com base na população para a hemocromatose, é identificar os indivíduos que necessitam de tratamento antes do desenvolvimento de complicações ou de sobrecarga de ferro. Porém, ainda se discute sobre qual teste, bioquímico ou genético, deveria ser usado para a seleção geral e qual população deveria ser selecionada. Com relação ao primeiro ponto, a saturação da transferrina é a forma mais aceita de seleção bioquímica, com uma sensibilidade de mais de 90% na maioria dos estudos, quando se considera uma frequência de corte de 45%⁹³. De uma forma alternada, o genótipo HFE tem sido sugerido como uma estratégia inicial de seleção para identificar os indivíduos e, então, prosseguir com o teste para os níveis de ferritina de soro, para estabelecer o grau de carga de ferro⁵⁸.

Desde o descobrimento do gene HFE, como responsável pela maioria dos casos de HH, muitos trabalhos trataram o sequenciamento de novas mutações que pudessem explicar esses casos, nos quais não se observaram os genótipos C282Y/C282Y nem C282Y/H63D. Destes trabalhos, veio a descoberta de várias novas mutações e polimorfismos. Além da mutação C282Y e H63D, a maioria das novas mutações, descritas até o momento, é muito pouco frequente e está restrita a

famílias ou indivíduos concretos, observando-se em um genótipo heterozigótico composto com a mutação C282Y ou H63D.

Com o avanço da biologia molecular, hoje, é possível detectar, com relativa facilidade, alterações genéticas específicas responsáveis por várias doenças, até mesmo antes de o indivíduo manifestar qualquer sintoma. É importante prevenir a sobrecarga de ferro que ocorre silenciosamente e lentamente e detectar indivíduos ainda saudáveis que, mais tarde, poderão apresentar manifestações clínicas ou suscetibilidade aumentada para certas doenças hereditárias. A pesquisa da mutação do gene HH tem um papel importante na prática médica, para conduzir ou guiar a evolução dos pacientes e de seus familiares no diagnóstico da HH, principalmente, no que concerne à hepatotoxicidade relacionada a sobrecarga de ferro. Além das suas complicações clínicas, isto porque o diagnóstico da HH hepática necessita, até o momento, de equipamentos e técnicas laboratoriais de alto custo, invasivas e de difícil execução. Este trabalho pode contribuir para entendermos melhor a frequência, a penetrância, a importância do diagnóstico precoce e a expressão clínica da doença na nossa população.

No presente trabalho, pela primeira vez, em Natal/RN, está sendo descrita as frequências alélicas e genótípicas das mutações C282Y, S65C e H63D no gene da proteína HFE, em indivíduos com suspeita clínica da HH e hiperferritinemia, com o objetivo de compreender seu papel na predisposição à Hemacromatose Hereditária, onde, também, foram investigadas variáveis clínicas, já descritas na literatura e relacionadas a esta doença. Através da identificação das mutações H63D, C282Y e S65C do gene da proteína HFE, foi avaliada a frequência dessas mutações, bem como a correlação estatística entre os genótipos das mutações e os valores da ferritina.

Embora não existam dúvidas de que a mutação C282Y causa a HH, devido à escassez de estudos no Brasil, ainda é controversa a penetrância dessa mutação sobre a variabilidade de manifestações clínicas dos indivíduos com HH.

A população brasileira possui uma grande miscigenação^{139,140}. Isto se deve à intensa imigração que o país recebeu, inicialmente por portugueses e africanos e, posteriormente, por imigrantes de outros países europeus e asiáticos. Entre 1820 e 1975, os imigrantes, na maioria europeus, chegaram, oficialmente, ao Brasil; destes, cerca de 70% eram portugueses e italianos, seguidos pelos espanhóis, alemães, sírios, libaneses e japoneses (IBGE 2000). Durante o período de 1500 e 1972, as

porcentagens de imigrantes, no Brasil, ficaram em torno de 58% de europeus, 40% de africanos e 2% de asiáticos¹⁴¹. O resultado de toda esta mistura de raças causou uma grande diversidade genética na população brasileira, comprovada através de alguns estudos, como, por exemplo, sobre o polimorfismo dos antígenos HLA Classe I, onde um relato recente revelou gradientes entre brancos, mulatos e negros nas frequências dos alelos e haplótipos dos ancestrais europeus, africanos e ameríndios¹⁴⁰. Ressaltamos, também, uma particularidade do nosso Estado, os imigrantes holandeses.

Em relação aos testes genéticos, foram estudadas as três mutações principais no gene da Proteína HFE, a mutação S65C, C282Y e H63D. Observamos que dos 299 pacientes estudados para C282Y e H63D, 48.49% apresentaram ausência de mutação e 51.51% apresentaram algum tipo de mutação: mutação C282Y heterozigoto em pacientes, 4.35%; mutação C282Y homozigóticos em 2.67%; mutação H63D em heterozigose em 31.44%; homozigótica H63D mutação em 8.03%, e heterozigótico para a mutação em ambos os genes (C282Y/H63D) em 5.02%. A mutação S65C foi estudada em 112 pacientes e foi observada mutação heterozigótica (S65D/WT) em 2.67% e mutação dupla heterozigótica (H63D/S65C) em 1.78% dos pacientes. Devido à alta prevalência de hemocromatose, sua gravidade e fácil tratamento, o diagnóstico genético de HH tornou-se um desafio, especialmente, no grupo de alto risco.

Quando avaliamos a ferritina, observamos que a média foi maior nos pacientes homozigotos mutados para C282Y e o duplo heterozigoto nos homens, corroborando com a literatura que esses pacientes têm maior risco de desenvolver a HH. Níveis detectados acima do limite padrão são considerados altos e podem levar ao acúmulo de ferro nos tecidos, e valores acima de 1000ng/mL podem causar fibrose e cirrose hepática³⁵.

Ao analisar a faixa etária dos pacientes, observou-se uma maior frequência de pacientes com hiperferritinemia, associada à HH, naqueles com idade na faixa etária de 40 a 42 anos, seguida da faixa etária de 50 a 59 anos. Em 1994, foi relatado que a sobrecarga de ferro ocorre de forma lenta e silenciosamente, o que torna, muitas vezes, essa doença assintomática nos indivíduos mais jovens⁶⁰. Em torno da 4ª década de vida, esses indivíduos já apresentam acúmulo de ferro na concentração de 10g a 20g em diversos órgãos, tais como: o fígado, o coração e o tecido endócrino dentre outros. Desta forma, nos homens, os sintomas da HH se

manifestam, em geral, a partir da quarta ou quinta década de vida. Por essa razão, é que o ferro tem sido atribuído por alguns autores com o “assassino silencioso”.

Em relação ao sexo, foi demonstrado maior frequência no sexo masculino do que no feminino, pois nas mulheres, perdas periódicas de ferro, por causa da menstruação e gestações, retardam o acúmulo desse metal por, aproximadamente, uma década. Por esse motivo, nas mulheres, os sintomas, geralmente, começam após a menopausa. Tal fato tem sido o motivo da explicação de que os sintomas da HH serem observados com maior frequência duas a dez vezes mais em homens adultos do que em mulheres⁶⁰.

Cabe ressaltar, que a literatura sugere, no diagnóstico laboratorial da HH, além dos testes genéticos e os parâmetros bioquímicos, investigados no presente estudo, a pesquisa da saturação da transferrina como um exame complementar à dosagem da ferritina sérica, o que tornaria a avaliação do acúmulo de ferro no organismo mais sensível. No entanto, a determinação da concentração da ferritina no soro, por si só, reflete a sobrecarga de ferro de forma satisfatória, que, quando se apresenta em concentração elevada, é considerada patológica²³.

Ademais, a ferritina sérica tem um valor previsível, com relação à existência possível de danos no fígado²³. Por isso, neste estudo, foi utilizada a dosagem de ferritina como parâmetro para avaliar a sobrecarga de ferro. No entanto, para afastar a possibilidade de que os valores elevados de ferritina sérica fossem em decorrência de processos inflamatórios, dentre os quais, infecções ou doenças reumáticas, foram realizadas mais 2 vezes as dosagens de ferritina com o intervalo de 2 meses, para, só então, realizarmos os estudos moleculares.

As manifestações clínicas da HH são variadas e resultam da deposição de ferro em múltiplos órgãos e dependem do grau de sobrecarga de ferro nos tecidos ao longo dos anos. Nos primeiros anos de vida, não há qualquer sintoma ou sinal. Porém, após algumas décadas, quando a deposição de ferro torna-se elevada, começam a surgir os primeiros sintomas, que são, em sua maioria, muito inespecíficos, não apontando para nenhum órgão ou sistema: fadiga, artralgias, impotência sexual nos homens, dor abdominal, amenorréia e perda de peso. Com o aumento da sobrecarga de ferro, surgem, então, comprometimentos maiores dos órgãos envolvidos, com o risco de desenvolver cirrose, diabetes, cardiomiopatias, artrites, hipogonadismo e hiperpigmentação da pele, dentre outros³².

Ao ingressar no programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFRN, aumentaram meus conhecimentos, principalmente pela interdisciplinariedade com estatística, metodologia da pesquisa científica, metodologia do ensino superior, ciclos de debates especiais em saúde, redação de trabalho científico e bioética, podendo permitir um aprimoramento de ser pesquisador, mas, acima de tudo, respeitando os valores humanos, éticos e morais, o que foi muito importante para o meu crescimento pessoal, intelectual e científico.

O conhecimento adquirido, neste doutorado, contribuiu e estimulou a desenvolver novas técnicas laboratoriais, estudando novas mutações envolvidas na hemocromatose hereditária, para um maior entendimento da nossa população, já que temos culturas e costumes diferentes dos países europeus, onde se originou essa doença.

Recebi um grande apoio do meu orientador e do Laboratório DNA CENTER, que foi o primeiro laboratório de Natal a trabalhar com biologia molecular para as doenças genéticas. Sua equipe qualificada ajudou-me e incentivou-me a realizar essa pesquisa. Esse laboratório tem convênio com a UFRN, com aulas práticas para o conhecimento do aluno na área da biologia molecular. Sem a sua participação, não teria sido possível concluir este doutorado.

Os resultados, obtidos neste estudo, revelaram que a distribuição dos genótipos das mutações C282Y, S65C e H63D, no gene da HH, foi similar a outros grupos populacionais, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas dos diferentes genótipos das mutações C282Y, S65C e H63D no gene da Hemocromatose, quando comparados o grupo de estudo em relação ao grupo controle. Contudo, podemos observar que, em todos os pacientes com hiperferritinemia e a presença das mutações C282Y homocigoto mutado e o duplo heterocigoto, foram evidenciadas manifestações clínicas da Hemocromatose Hereditária. Diferentemente de alguns estudos, os pacientes, com genótipo alterado para a mutação H63D, apresentaram valores elevados de ferritina sérica e manifestações clínicas da Hemocromatose Hereditária.

Através deste estudo, acreditamos haver contribuído, para que futuros trabalhos nesta área disponham de parâmetros sobre os efeitos desses genótipos da hemocromatose hereditária em relação aos nossos hábitos de vida, aos critérios dos exames de rotina para incluir a dosagem de ferritina como ferramenta básica, no acompanhamento e monitoramento de uma possível doença de sobrecarga de ferro.

Por conseguinte, possamos diagnosticar cada vez mais cedo e prevenir possíveis danos irreversíveis e assim melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Concluindo, esta pesquisa me proporcionou um grande enriquecimento intelectual, e abriu novos horizontes para continuar a pesquisar a hemocromatose hereditária que vem rompendo vários paradigmas ao longo desses anos.

7 REFERÊNCIAS

1. Crosa, J. H. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997;61(3):319-36.
2. Moeck GS, Coulton JW. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol*, 1998;28(4):675-8.
3. Beutler B. Fighting Malaria: Mosquitoes Know How. *Immunity*. 2006;25(4):530-1.
4. Venturi V *et al.* Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Mol Microbiol*. 1995;15(6):1081-93.
5. Wijayanti N, Katz N, Immenschuh S. Biology of heme in health and disease. *Curr Med Chem*. 2004;11(8):981-6.
6. Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG. Iron absorption and transport. *Am J Med Sci*. 1999;318(4):213-29.
7. Fleming MD *et al.* Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*. 1997;16:383-38.
8. Sharp P *et al.* Rapid regulation of divalent metal transporter (DMT1) protein but not mRNA expression by non-haem iron in human intestinal Caco-2-cells. *Febs Lett*. 2002;510(1-2):71-6.
9. Fleming RE. Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption. *Current opinion in gastroenterology*. 2005;21(2):201-6.
10. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Jacob HS, *et al.* Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(12):2119-37.
11. Edison ES, Bajel A, Chndy M. Iron homeostasis; new players, newer insights. *European Journal of Hematology*. 2008;81(6):411-24.
12. Mckie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, *et al.* A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. 2002;5:299-309.

13. Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood*. 2006;107:328-33.
14. Shayeghi M, Latunde-dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takevchi K, Halliday N et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 2005;122(5):789-801.
15. Wessling-Resnich M. Iron imports transfer of iron from the mucosa into circulation. *American Jour of Physiology*, 2006;290(1):G1-6.
16. Zhang AS, Yang F, Wang J, Tsukamoto H, Enns CA. Hemojuvelin-neogenin interactions is required for bone morphogenic protein-4-induced hepcidin expression. *Jour of Biological Chemistry*. 2009;284(34):22580-9.
17. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, Mcdonald A, Chen J, et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferring-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature Genetics*. 2005;37(11):1264-9.
18. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999 dec;341(26):1986-95.
19. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000;17;403(6771):776-81.
20. Chen Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the human transferring receptor-transferrin complex. *Cell*. 2004;116:565-76.
21. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr*. 2002 Apr;22:439-58.
22. Lombard M, Chva E, Otoole P. Regulation of intestinal non-haem iron absorption. *GUT*. 1997;40(4):435-9.
23. Camaschella C *et al*. The gene encoding transferrin receptor 2 is a new type of hemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet*. 2000;25:14-5.
24. Crownover BK, Covey CJ. Hereditary Hemochromatosis. *Am Fam Physician*. 2013;87(3):183-90.
25. Ponka P *et al*. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Seminars in Hematology*. 1998;35(1):35-54.

26. Damade R *et al.* Hyperferritinemia. *Annales De Medecine Interne*, 2000;151(3):169-77.
27. Feder JN *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996;13(4):399-408.
28. Eisenbach C, Gehrke SG, Stremmel W. Iron, the HFE gene, and hepatitis C. *Clin Liver Dis.* 2004;8(4):775-85.
29. Feder JN *et al.*, The hemochromatosis founder mutation in HLA H disrupts B2 micro globulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem*, 1997;94:2534-9.
30. Waheed A *et al.* Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12384-9.
31. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, *et al.* The Hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(4):1472-7.
32. Bacon BR *et al.* HFE genotype in patients with haemochromatosis and other liver diseases. *Ann Int Med.* 1999;130:953-62.
33. Waheed A *et al.* Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999;96:1579-84.
34. Pietrangelo A Physiology of iron transport and the HFE gene. *Am J Physiol*, 2002;282:6403-14.
35. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2006;1763(7):700-10.
36. Zoller H *et al.* Duodenal metal-transporter (DMT-1, NARMP-2) expression in patients with hereditary haemochromatosis. *Lancet*, 1999;353:2120-3.
37. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.* 2009;122(2-3):78-86.
38. Fleming MD *et al.* Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(3):1148-53.

39. Hunter HN *et al.* The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37597-603.
40. Park CH *et al.* Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001;276:7806-10.
41. Pigeon C *et al.* A new mouse liverspecific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001;276:7811-9.
42. Ponka P. Iron is still hot: hepcidin keeps it ablaze, *Blood.* 2005;105(4):1376-7.
43. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306:2090-3.
44. Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand *Biometals.* 2007;20(3-4):665-74.
45. Lee PL, Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:489-515.
46. Brittenham GM. New advances in iron metabolism, iron deficiency, and iron overload. *Curr Opin Hematol.* 1994;1(2):101-6.
47. Hershko C *et al.* Iron chelators for thalassaemia. *British Journal of Haematology.* 1998;101(3):399-406.
48. Cabantchik ZI *et al.* LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2005;18(2):277-87.
49. Britton RS, Bacon BR. Hereditary hemochromatosis and alcohol: A fibrogenic cocktail. *Gastroenterology.* 2002;122(2):563-5.
50. Njajou OT *et al.* A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet.* 2001;28:213-4.
51. Devalia V *et al.* Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3). *Blood.* 2002;100(2):695-7.
52. Roetto A *et al.* A valine deletion of ferroportin 1: a common mutation in hemochromatosis type 4? *Blood.* 2002;100:733-734.
53. Wallace DF *et al.* Novel mutation in ferroportin 1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis, *Blood.* 2002;100:692-4.

54. Jouanolle AM. *et al.* Novel mutation in ferroportin 1 gene is associated with autosomal dominant iron overload, *J Hepatol.* 2003;39:286-9.
55. Adams PC, VALBERG LS. Evolving expression of hereditary hemochromatosis. *Seminars in Liver Disease.* 1996a;16(1):47-54.
56. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, *et al.* Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(7):4596-601.
57. Bonkovsky HL. *et al.* Iron in liver diseases other than hemochromatosis. *Sem Liver Diseases.* 1996;16(1):65-82.
58. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2383-97.
59. Pietrangelo A. Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. *Gastroenterology.* 2010;139(2):393-408.
60. Niederau C *et al.* Epidemiology, clinical spectrum and prognosis of hemochromatosis. *Adv Exp Med Biol.* 1994;356:293-302.
61. Bacon BR. Hemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterology.* 2001;120(3):718-25.
62. Fix OK, Kowdley KV. Hereditary hemochromatosis. *Minerva Med.* 2008;99(6):605-17.
63. Pietrangelo A. Inherited metabolic disease of the liver. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25(3):209-14.
64. Andrews NC. Closing the iron gate. *N Engl J Med.* 2012;366(4):376-7.
65. Lamon M *et al.* Idiopathic hemochromatosis in a young female. A case study and review of the syndrome in young people. *Gastroenterology.* 1978;76:178-83.
66. Camaschella C *et al.* Juvenile and adult haemochromatosis are distinct genetic disorders. *Eur J Hum Genet.* 1997;5:371-5.
67. Papanikolaou G *et al.* Hereditary hemochromatosis: HFE mutations analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26:163-8.
68. Roetto A *et al.* Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 1999;64:1388-93.
69. Papanikolaou G *et al.* Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2004;36(1):77-82.

70. Cadet E *et al.* A targeted approach significantly increases the identification rate of patients with undiagnosed haemochromatosis. *J Intern Med.* 2003;253(2):217-24.
71. Roetto A *et al.* New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood.* 2001;97:2555-60.
72. Girelli D *et al.* Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene. *Gastroenterology.* 2002;122:1295-302.
73. Mattman A *et al.* Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation. *Blood.* 2002;100:1075-7.
74. Fleming RE, *et al.* Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor 2 gene produces hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:10653-8.
75. Edwards CQ, *et al.* Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med.* 1988;318(21):1355-62.
76. Galzzi filho J, Andrade MO. Doença de Wilson e hemocromatose. In: PARIDE, E.R., PORTA, G. (ed). *Manual de diagnóstico de tratamento das doenças hepáticas no paciente adulto e pediátrico.* São Paulo, 1999:145-57.
77. Niederau C, Erhardt A, Häussinger RD., Strohmeyer G. Haemochromatosis and the liver. *J Hepatol.* 1999;30(1):6-11.
78. Franchini M, Veneri D. Hereditary hemochromatosis. *Hematology.* 2005;10(2):145-9.
79. Worwood M. Inherited iron loading: genetic testing in diagnosis and management. *Blood Rev.* 2005;19(2):69-88.
80. Weiss G. Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(1):50-8.
81. Bothwell TH. Overview and Mechanisms of Iron Regulation. *Nutrition Reviews.* 1995;53(9):237-45.
82. Powell LW, Isselbacher KJ. Haemochromatosis. En: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12. ed, 1996.
83. Parkkila S *et al.* Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary haemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1997;94:2534-9.

84. Tavill AS. Diagnosis and management of haemochromatosis. AASLD Practice Guidelines. *Hepatology*. 2001;33:1321-8.
85. Olynyk JK, Hagan SE, *et al.* Evolution of untreated hereditary hemochromatosis in the Busselton population: A 17-year study. *Mayo Clinic Proceedings*. 2004;79(3):309-13.
86. Joffe MD. Hemochromatosis. *eMedicine*. 2005;43.
87. McCarthy GM *et al.* Hereditary hemochromatosis: A common, often unrecognized, genetic disease. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2002;69(3):224-6;229-30;232-3.
88. RahkO PS *et al.* Reversed Closure Sequence of the Mitral and Tricuspid Valves in Congestive Heart Failure. *Circulation*. 1986;74(4):300.
89. Olsson KS. Genetic screening discovers hemochromatosis. Organ damage caused by iron may be prevented. *Lakartidningen*. 1997;94:3957-8.
90. Barton JC, McDonnell SM, Adams PC, Brissot P, Powell LW, Edwards CQ. Management of hemochromatosis. Hemochromatosis Management working group. *Ann Intern Med*. 1998;129(11):932-9.
91. Fletcher LM, Powell LW. Hemochromatosis and alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2003;30(2):131-6.
92. Allen JK. Hereditary haemochromatosis – diagnosis and management. *AUST Fam Physician*. 2010;39(12):938-41.
93. Camachella C, Poggiali E. Rare types of genetic hemochromatosis. *Acta Haematol*. 2009;122:140-5.
94. Rochette J, Le Gac G, Lassoued K, Férec C, Robson KJ. Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. *Hum Genet*. 2010;128(3):233-48.
95. Ryan E *et al.* Haemochromatosis - An Irish disease. *Hepatology*. 1998;28(4):527A.
96. Merryweather-Clarke AT, *et al.* Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test*. 2000;4(2):183-98.
97. Willis G *et al.* Deaths attributed to haemochromatosis are rare in Britain. *British Medical Journal*, 2000;320(7242):1146.
98. Beutler E *et al.* HLA-H and associated proteins in patients with hemochromatosis. *Molecular Medicine*. 1997;3(6):397-402.

99. Carella M, D'Ambrosio L, Torato A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, et al. Mutation Analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):828-32.
100. Hanson EH, Imperatore G, et al. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol.* 2001;154(3):193-206.
101. Aguilar-martinez P et al. Variable phenotypic presentation of iron overload in H63D homozygotes: are genetic modifiers the cause? *Gut.* 2001;48(6):836-42.
102. Sebastiani G et al. Fatty liver in H63D homozygotes with hyperferritinemia. *World J Gastroenterol.* 2006;12(11):1788-92.
103. Matas M et al. Prevalence of HFE C282Y and H63D in Jewish populations and clinical implications of H63D homozygosity. *Clin Genet.* 2006;69:155-62.
104. Bauduner F et al. Genetic hemochromatosis is a rare disease entity among French Basques: a center-based study from the general hospital of Basque County. *Ann Hematol.* 2001;80:472-3.
105. Richards A et al. Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice. *Blood.* 2002;100(4):1465-9.
106. Barton JC et al. Diagnosis of hemochromatosis in family members of probands: A comparison of phenotyping and HFE genotyping. *Genetics in Medicine.* 1999;1(3):89-93.
107. Mura C et al. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood.* 1999;93(8):2502-5.
108. Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Farcas MF, Crisan TO, Gana I, et al. HFE gene C282Y, H63D and S65C mutations frequency in the Transylvania region, Romania. *J Gastrointest Liver Dis.* 2012;21(2):177-80.
109. Adams PC. Population screening for hemochromatosis. *Hepatology.* 1999;29(4):1324-7.
110. Dooley JS, Walker AP. Genetic hemochromatosis: Detection, management, and population screening. *Genetic Testing.* 2000;4(2):97-101.
111. Powell LW. Does transplantation of the liver cure the hemochromatosis. *J. Hepatol.* 1992;16:259-61.
112. Risch N. Haemochromatosis, HFE and genetic complexity. *Nat Genet.* 1997;17(4):375-6.

113. Adams PC, Chakrabarti S. Genotypic/phenotypic correlations in genetic hemochromatosis: evolution of diagnostic criteria. *Gastroenterology*. 1998;114(2):319-23.
114. Suarez-Kurtz G, et al. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. *Front Pharmacol*. 2012;191(3):1-7.
115. Martinelli AL, Franco RF, Villanova MG, Figueiredo JF, Secaf M, Tavella MH, et al. Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? *Acta Haematol*. 1999;102:152-6.
116. Agostinho MF *et al*. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;25:324-7,.
117. 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(1):31-8.
118. Calado RT *et al*. HFE gene mutations in coronary atherothrombotic disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000;33(3):301-6.
119. Cançado RD *et al*. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. *Sao Paulo Med J*. 2006;124(2):55-60.
120. Torres FR, Souza-Neiras WC, D'Almeida Couto AA, D'Almeida Couto VS, Cavasini CE, Rossit AR, et al. Frequency of the HFE C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. *Genet Mol Res*. 2008;7(1):60-4.
121. Bueno S, Duch CR, Figueiredo MS. Mutations in the HFE gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. *Rev Bras Hematol e Hemoter*. 2006;28(4):293-5.
122. Cançado RD, et al. Estudo das mutacoes C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. *Rer Brás hematol hemoter*. 2007;29(4):351-60.
123. Leone PE, Giménez P, Collantes JC, Paz-y-Miño C. Analysis of HFE gene mutations (C282Y, H63D, and S65C) in the Ecuadorian population. *Ann Hematol*. 2005 Feb;84(2):103-5.
124. Vizzi E, Loureiro C, Gerder M, Garcia-Casal M, Rodríguez-Larralde A, Gerace L *et al*. Mutation analysis of the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis in a Venezuelan sample. *Ann Hematol*. 2005;84:802-6.

125. Soria NW, Isasi SC, Chaig MR, de Burgos NMG. Analysis of C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in blood donors from Córdoba, Argentina. *Ann Hematol.* 2009;88:77–9.
126. Wolff C, Armas R, Frank J, Poblete P. Mutaciones del gen de la hemocromatosis en donantes de sangre voluntarios y em pacientes con porfiria cutanea tarda en Chile. *Medicina (B Aires).* 2006;66:421–6.
127. Hanson E, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001;154:193–206.
128. Hanson E, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001;154:193–206.
129. Bittencourt PL *et al.* Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(3):329-35.
130. Crichton RR. Ferritin: structure, synthesis and function. *N. Engl. J. Med.* 1971;284:1413-22.
131. Fairbanks VF, Fahey JL, Beutler E. *Clinical disorders of iron metabolism.* 2ed. New Cork: Grune and Stratton, 1971.
132. Krause JR, Stolc V. Serum ferritin and bone marrow iron stores. I. Correlation with absence of iron in biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1979;72(5):817-20.
133. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 1969;6:24-7.
134. Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la alanina aminotransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin.* 1987;6:241-4.
135. Gella FJ *et al.* A simple procedure for routine determination, of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. *Clin Chim Acta.* 1985;153:241–7.
136. Loparev VN *et al.* An efficient and simple method of DNA extration from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *J Virol Methods.* 1991;34(1):105-12.
137. Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 1989;342:224-5.

138. Farah BB. DNA no diagnóstico das doenças humanas. DNA segredos e misterios. São Paulo: Sarvier, 1997.
139. Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen A, et al. HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the State of São Paulo. Tissue antigens. 2001; 57:158-162.
140. Braun-Prado AL, Vieira Mion N, Farah Pereira L, et al. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSCP, in a Brazilian exogamic population. Tissue Antigens. 2000; 56 (5):417-27.
141. Callegari-Jacques S, Salzano FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. J Braz Ass Adv Sci. 1999; 51:166-174.

8 APÊNDICE

8.1 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES C282Y E H63D DO GENE DA HH

A figura 8 representa um gel após eletroforese, mostrando eficiência na extração do DNA, bem como a integridade do mesmo. Visualizamos, ainda, produtos de PCR após amplificação do DNA genômico para as regiões C282Y e H63D. De acordo com o protocolo descrito na metodologia para C282Y, foi obtido um fragmento de 400pb e para a mutação H63D um fragmento de 187pb, em gel de agarose, quando submetida à luz ultravioleta.

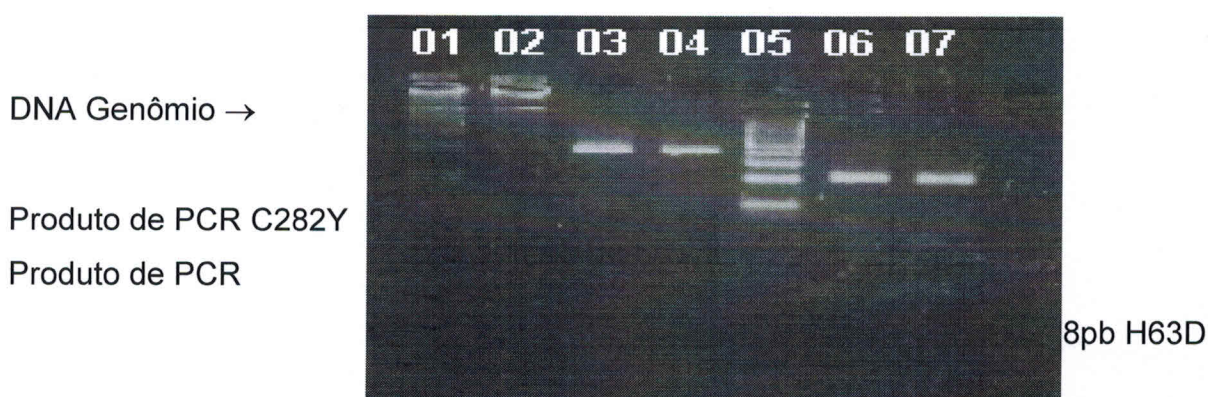


Figura 8 Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo. Colunas 1 e 2 - DNA Genômico; Colunas 3 e 4 – Produto de PCR para a Mutação C282Y; Coluna 5- Padrão peso molecular de 100pb; Colunas 6 e 7 Produto de PCR para a mutação H63D.

A figura 9 representa a análise do produto de amplificação da região da mutação C282Y e H63D do gene HFE e dos produtos de digestão com a enzima *Sna*I e *Bcl*I, respectivamente. Na presença da mutação C282Y, no gene HFE, foram produzidos fragmentos de 400pb, para indivíduos com genótipo homocigoto normal. Nos indivíduos com genótipo heterocigoto, são observados fragmentos de 110pb, 290pb e 400pb, e nos homocigotos mutados, fragmentos de 209pb e 110pb.

Na presença da mutação H63D do gene HFE, foram produzidos fragmentos de 187pb nos indivíduos com genótipo homocigoto normal, 187pb e 208pb, nos indivíduos com genótipo heterocigoto e, 208pb nos indivíduos com genótipo mutado.



Figura 9 Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo com produtos de amplificação e de restrição enzimática com *Sna**b* I para a mutação C282Y e *Bcl* I da mutação H63D. Colunas 1, 2 e 3 evidenciamos o perfil de indivíduos heterozigoto, homozigoto mutado e homozigoto normal, respectivamente, para a mutação C282Y. Coluna 4 – marcador de tamanho molecular de 100pb; Coluna 5, 6, 7 e 8 indivíduos heterozigoto, homozigoto mutado e homozigoto normal para a mutação H63D, respectivamente.

9 ANEXOS

ANEXO 1

“TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”

Título do Projeto: **“Análises das Mutações C282Y e H63D no gene da proteína HFE de pacientes com ferritina elevada”**

O (a) Sr. (a). está sendo convidado(a) a participar, voluntariamente, de uma pesquisa que visa estudar uma doença, denominada Hemocromatose Hereditária e que causa acúmulo de ferro no organismo. Esta doença ocorre pela transmissão de um gene mutado (pequena porção do DNA defeituoso) dos pais para os seus filhos e que pode causar o acúmulo elevado e progressivo de ferro no organismo, causando, com o passar do tempo, uma série de doenças graves, tais como: a diabetes, problemas no coração ou doenças no fígado (cirrose). Sua participação neste estudo, é totalmente voluntária, podendo recusar-se a fazer parte do mesmo ou interromper se julgar conveniente, sem prejuízo para o andamento do trabalho de pesquisa.

Procedimentos: Neste estudo, uma pequena porção de seu sangue deverá ser coletada e analisados no laboratório DNA-Center, Natal RN. Para este fim, será necessário a coleta de (10 mL de sangue) periférico por punção venosa (dobra do braço), para que sejam feitos alguns exames, tais como: dosagem de ferro sérico, ferritina, índice de saturação da transferrina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama glutamil transferase, fosfatase alcalina e glicose e, também, análises moleculares para detecção das mutações genéticas dos genes C288Y e H63D (causadores da doença).

Justificativa para realização do estudo: Devido à alta prevalência da hemocromatose, sua gravidade ser prevenível e tendo em vista que a hemocromatose é considerada um problema de saúde pública, faz-se necessária a realização deste estudo, que tem como objetivo o diagnóstico precoce desta enfermidade e, com isso, evitar manifestações clínicas graves e aumentar a expectativa de vida dos pacientes com esta doença. Esperamos, também, com este

estudo, estimular a necessidade de investigação familiar dos pacientes que apresentarem esta alteração genética.

Benefícios e Riscos: Esse projeto será realizado em amostras de sangue, em pessoas com suspeita de hemocromatose e não envolve nenhum risco para os pacientes, visto que o estudo será realizado no mesmo material que é colhido rotineiramente para o diagnóstico e acompanhamento dessa doença. Dentre os benefícios, pode se destacar a possibilidade de que a detecção precoce de indivíduos com susceptibilidade genética para a Hemocromatose possibilitará a prevenção do surgimento das manifestações clínicas graves, bem como o aumento da expectativa de vida dos indivíduos com susceptibilidade genética para esta doença. A coleta de seu sangue será feita por um profissional habilitado, através de uma punção venosa na dobra do braço, após assepsia local, de modo similar a um exame de sangue convencional, não havendo risco para a sua integridade ou saúde por esse procedimento, podendo, no entanto, ocorrer, raramente, o surgimento de um pequeno hematoma no local da punção, o qual desaparecerá em poucos dias.

Confidenciabilidade do estudo: Os dados de sua participação, nesse estudo, serão mantidos confidenciais. Eles serão guardados e somente os pesquisadores, trabalhando com a pesquisa, terão acesso aos dados, sendo vetado o acesso a esses elementos estranhos à pesquisa, bem como divulgação dos dados que permitam sua identificação. Cada pessoa, participante do projeto, terá acesso aos resultados de seus exames, bem como o seu significado, se assim o desejar em qualquer momento de realização da pesquisa ou mesmo após a conclusão da mesma. Cada participante do projeto receberá um número secreto de identificação, para ser utilizado na pesquisa, o que garantirá o anonimato do participante no projeto. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, sua identificação não será revelada. Se houver algum dano ou se algum problema ocorrer, decorrente desse estudo, tratamento médico será fornecido sem ônus para os pacientes e será providenciado pelo Dr. Marcos Dias Leão, dentro da estrutura do Hospital Universitário Onofre Lopes (fone: 99822033) a qualquer hora do dia. O pesquisador será responsável pelo ressarcimento de despesas e pela indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Este projeto foi avaliado pelo Comitê de

Ética em Pesquisa da UFRN (CEP). Informações adicionais podem ser obtidas pelo telefone 3215-3135.

Armazenamento (guarda) do material biológico: Posteriormente, após as análises laboratoriais, o material biológico remanescente: soro, o DNA extraído e os produto de amplificação (PCR) serão armazenados em um freezer a -8C, por 5 anos, para uma eventual reavaliação dos resultados, ficando sob a guarda do Laboratório-DNA-Center, não podendo, em hipótese alguma, ser removido do local de acondicionamento nem cedido a terceiros. Se porventura este material for empregado em outra pesquisa, o Senhor será novamente contactado, para que seja concedida uma nova autorização do uso de seu material biológico.

Perguntas: Se houver alguma dúvida, entre em contato com a Farmacêutica-Bioquímica Gioconda Dias Rodrigues Leão no Laboratório DNA CENTER ou no LIAC (Laboratório Integrado de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN).

Comitê de Ética: Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN (CEP). Informações adicionais podem ser obtidas pelo telefone 3215-3135.

ANEXO 2
CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO

**Análises da Mutações C282Y e H63D no gene da proteína HFE de pacientes
com ferritina elevada**

Estou de acordo com a participação no estudo, descrito acima. Fui devidamente esclarecido (a) quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos, aos quais serei submetido(a) e dos possíveis riscos que possam ocorrer.

Foram garantidos esclarecimentos sob o sigilo dos dados obtidos, preservando o anonimato de minha pessoa, e que eu, também, possa solicitar durante o curso da pesquisa, acesso aos dados dos exames obtidos e o direito de desistir da participação da mesma a qualquer momento, sem que minha desistência implique em qualquer prejuízo à minha pessoa ou à minha família.

.....
Sujeito da pesquisa

Local e data: _____, ____ / ____ / ____

Compromisso do investigador:

Eu discuti as questões acima com o(a) Sujeito da Pesquisa participante do presente estudo ou com seus responsáveis legais. É minha convicção que o paciente entende os riscos, benefícios e obrigações relacionados com este projeto.

.....
Pesquisador responsável

Local e data: _____, ____ / ____ / ____

ANEXO 3
QUESTIONÁRIO - HEMOCROMATOSE

➤ **Dados do paciente**

1. Nome completo:
2. Data de Nascimento:
3. Idade do diagnóstico:
4. Sexo: F () M ()
5. Telefone:
6. Raça:
7. Família – Número:
8. Gesta- Parto
9. Ciclo Menstrual: S () N ()
10. Quantos dias:
11. Estimativa de quantidade:

➤ **História clínica:**

1. Diabetes- Hiperglicemia- resistência a insulina: S () N ()
2. Doença hepática: S () N ()
3. Doença cardiovascular: S () N ()
4. Impotência: S () N ()
5. Libido: S () N ()

➤ **Antecedentes pessoais patológicos:**

1. Hipertensão: S () N ()
2. Infarto: S () N ()
3. Anemia Hemolítica: S () N ()
4. Fumo: S () N ()
5. Álcool: S () N ()
6. Passado de hepatite: S () N ()
7. Dislipidemia: S () N ()

8. Hipertireoidismo: S () N ()
9. Transfusão: S () N ()
10. Tuberculose: S () N ()
11. Doença inflamatória:
- Artrite reumatoide: S () N ()
- Lupus Eritomatoso Sistêmico: S () N ()
- Esclerose múltipla: S () N ()
- Doença Intestinal infecção crônica: S () N ()

➤ **Dieta:**

1. Vegetariano: S () N ()
2. Quantas vezes come carne vermelha ou vísceras?

➤ **Exames laboratoriais**

Data da Coleta:	Sangue	
	Total	Soro
Hemograma		
Plaquetas		
VSH		
Ferro sérico		
Ferritina		
CFF		
ST		
Hemoglobina glicosada		
Bilirrubinas totais e Frações		
Reticulócitos		
Glicemia		
Fosfatase Alcalina		
PCR		
MUCO		

TGO		
TGP		
γ GT		
TOTG		
Proteínas totais e frações		
Testosterona (H)		

➤ **História medicamentosa**

1. Anti – hipertensivo SIM () NÃO ()
2. Uso de ferro em alguma fase da vida: SIM () NÃO()

➤ **Genética**

Agregação familiar: