ANDRÉIA SILVA EVANGELISTA

**Caracterização fenotípica e genotipagem
HFE em portadores de doença hepática
crônica com sobrecarga de ferro**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Evangelista, Andréia Silva

Caracterização fenotípica e genotipagem *HFE* em portadores de doença
hepática crônica com sobrecarga de ferro / Andréia Silva Evangelista. -- São
Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Eduardo Luiz Rachid Cançado.

Descritores: 1. Sobrecarga de ferro 2.Sobrecarga de ferro/genética 3.Fenótipo
4.Hemocromatose 5.Hemocromatose/etiologia 6.Genótipo 7.Mutação/genética
8.Hepatopatias 9.Gene HFE 10.Carcinoma hepatocelular/etiologia

USP/FM/DBD-086/13

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, exemplo de força, coragem e resiliência; aos meus irmãos, Nana, Suzi, Sinho e Léo, que me ampararam e incentivaram nesta longa formação; aos meus sobrinhos, Alexandre, Pedro Henrique e João Victor, que esta vitória possa servir de exemplo para as suas caminhadas.

AGRADECIMENTOS

*“Ando devagar porque já tive pressa e levo este sorriso,
porque já chorei demais..”*

Ao fim deste trabalho, vem a sensação de dever cumprido e maturidade. Essa é, sem dúvida, a melhor experiência acadêmica que um aluno pode experimentar. Esse tema foi escolhido a partir de uma simples observação dos pacientes com hepatopatia crônica e sobrecarga de ferro no ambulatório, quando ainda residente de Gastroenterologia. O estudo com os portadores dessa condição foi o final, após pesquisa, dedicação, aproximação com os pacientes e incentivo de professores e amigos muito queridos que felizmente tive a felicidade de poder contar com o apoio nesses anos de caminhada. Essa é a melhor oportunidade para expressar os meus agradecimentos.

À **Dra. Marta Deguti**, a primeira referência nesse assunto. Grande mestre, se hoje eu escrevi e finalizei esse trabalho foi graças à sua dedicação e paciência em debater extensivamente sobre o assunto, escrever em quatro mãos capítulos de livros, textos de revisão, aulas sobre o tema, trabalhos para congresso, apresentar pacientes com sobrecarga de ferro e hemocromatose hereditária e, por fim, à confiança em transferir um projeto originalmente seu para que eu pudesse conquistar esse título. Agora estou pronta para a vida acadêmica. Graças a você.

Ao **Dr. Eduardo Cançado**, exemplo de médico, de atenção e cuidado com o paciente, grande professor de boa prática médica. Você foi e ainda é muito importante em minha formação como hepatologista. Obrigada pela dedicação a esse trabalho, obrigada pelos ensinamentos, obrigada pela confiança.

À **Aline Chagas**, minha grande companheira nesta jornada, quem me incentivou a seguir pela hepatologia, esteve sempre, sempre ao meu lado. Minha irmãzinha de coração (e agora comadres!!!), a minha estadia aqui em São Paulo é muito melhor porque tenho você.

À **Samira Apóstolos**, obrigada pela força, pelos conselhos, por estar ao meu lado. Você completa a minha família aqui em São Paulo.

Aos meus amigos do ambulatório de metabólicas, **Débora Terrabuio, Fabrício Guimarães, Michele Harriz**. Obrigada pelo companheirismo, pelos ensinamentos, por fazerem parte desta caminhada.

Aos meus amigos do laboratório LIM-07, **Maria Cristina Nakhle, Thiago de Araújo Ferreira, Clarice Pires Abrantes-Lemos, Michele Gomes-Gouvêa**. Obrigada pelo carinho e dedicação. Os meus projetos caminharam graças a vocês.

Aos meus queridíssimos **Guilherme Felga e Odilson Silvestre**, que felicidade ter feito residência com vocês! Seguimos hoje juntos na vida profissional e colocamos em prática o que aprendemos nessa grande escola. Aprendi e aprendo muito com vocês. Obrigada pelo companheirismo e pelos exemplos como colegas, como médicos, como pesquisadores, como amigos. Vocês contribuem muito para o meu aperfeiçoamento como profissional.

Aos meus queridos companheiros de jornada, **Bianca, Celso, Lílian, Márcio e Pandullo**, pela força e compreensão nesses dias finais e decisivos, obrigada pela atenção e respeito em nosso dia-a-dia, companheirismo e pelos ensinamentos.

À **Katinha**, pela disposição em ajudar, em tornar o nosso ambulatório de autoimunes e metabólicas muito mais prazeroso, alegre e organizado. Você é um grande diferencial para nós.

À **Fabiana e Vilma**, secretárias da pós-graduação em Ciências em Gastroenterologia, vocês tornaram esse caminho muito mais fácil de seguir.

Ao **Márcio**, estatístico, pelo empenho nesse trabalho, pela paciência em marcar inúmeras reuniões e em responder milhares de e-mails.

Aos **pacientes**, pela entrega sem argumentos, pelo respeito, pela confiança. Procuro me aperfeiçoar para fazer o melhor para vocês. O bem-estar de vocês é o meu melhor presente.

“(...) Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco sei, ou nada sei (...)”

(Almir Sater)

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adotado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos, de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras e Gráfico

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença por sobrecarga de ferro	2
1.1.1 Fisiologia	2
1.1.1.1 Homeostase do ferro	2
1.1.1.2 Absorção e captação	3
1.1.1.3 Regulação	5
1.1.2 Fisiopatologia das doenças por sobrecarga de ferro	8
1.2 Hemocromatose hereditária	13
1.2.1 Definição e histórico	13
1.2.2 Epidemiologia	16
1.2.2.1 Distribuição geográfica e frequência alélica	16
1.2.2.2 Penetrância	18
1.2.3 Manifestações clínicas	19
1.2.4 Diagnóstico e manejo da HH	21
1.3 Objetivos	22
1.3.1 Objetivo geral	22
1.3.2 Objetivos específicos	22
2 MÉTODOS	23
2.1 Seleção da casuística	24
2.1.1 Critérios de inclusão	24
2.1.2 Critérios de exclusão	24
2.2 Aspectos éticos	25
2.3 Aspectos revisados dos prontuários médicos	25
2.3.1 Dados demográficos	25
2.3.1.1 Sexo	25
2.3.1.2 Cor	25
2.3.1.3 Naturalidade e procedência	25
2.3.1.4 Ascendência	25
2.3.1.5 Idade ao início dos sintomas	26
2.3.1.6 História familiar de HH	26
2.3.1.7 Índice de Massa Corpórea (IMC)	26
2.3.2 Dados clínicos	26
2.3.2.1 Diagnósticos clínicos relacionados a doença hepática	26
2.3.2.2 Manifestações clínicas compatíveis com HH	27
2.3.2.3 Comorbidades adicionais	27
2.3.2.4 Exames complementares	28
2.3.2.5 Parâmetros de sobrecarga de ferro	28

2.3.2.6 Aspectos terapêuticos	28
2.4 Técnica de genotipagem <i>HFE</i>	29
2.5 Análise estatística	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Casuística	33
3.2 Características gerais	34
3.2.1 Aspectos terapêuticos	37
3.3 Genotipagem <i>HFE</i>	38
3.3.1 Cálculo da frequência alélica	38
3.3.2 Caracterização fenotípica	39
3.3.2.1 Diagnóstico de HH- <i>HFE</i>	39
3.3.2.2 Comparações entre os fenótipos de sobrecarga de ferro	40
3.3.2.3 Análise do genótipo versus fenótipo	49
3.4 Características demográficas, bioquímicas, anatomopatológicas, clínicas e terapêuticas dos pacientes com HH- <i>HFE</i> e sobrecarga de ferro não-HH	64
4 DISCUSSÃO	72
4.1 Caracterização da casuística	73
4.2 Influência do sexo	74
4.3 Manifestações clínicas relacionadas a sobrecarga de ferro, ao genótipo HH- <i>HFE</i> e fatores de risco	75
4.4 Carcinoma hepatocelular	78
4.5 Análise dos marcadores séricos de sobrecarga de ferro	80
4.6 Considerações finais	84
5 CONCLUSÕES	90
6 ANEXOS	93
Anexo A - Aprovação da CAPPesq	94
Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	95
Anexo C - Protocolo utilizado para o levantamento dos dados	98
Anexo D - Características demográficas e resultados de mutações <i>HFE</i>	102
Anexo E - Aspectos laboratoriais e graus de siderose hepática	105
Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas a HH (parte I)	108
Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas a HH (parte II)	111
Anexo G - Principais comorbidades encontradas nos pacientes	114
7 REFERÊNCIAS	117

LISTAS

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ALT	- Alanina aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
Amp	- <i>Amplifier</i>
BMP	- <i>Bone morphogenic proteins</i>
BTF	- Bilirrubinas total e frações
CaPPesq	- Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa
C/EBP α	- Enhancer-binding protein α
CHC	- Carcinoma hepatocelular
CTLF	- Capacidade total de ligação do ferro
DFPN	- Doença da Ferroportina
DHGNA	- Doença hepática gordurosa não alcoólica
DIOS	- <i>Dysmetabolic iron-overload syndrome</i>
DM	- <i>Diabetes mellitus</i>
DMT1	- Transportador de metal divalente 1
ECG	- Eletrocardiograma
ERK	- <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
et al	- e outros
FA	- Fosfatase Alcalina
Fe	- Ferro sérico
FE	- Fração de ejeção
FPN	- Ferroportina
FSH	- Hormônio folículo estimulante
GGT	- Gamaglutamiltransferase

HAMP	- <i>Hepcidin antimicrobial peptide</i>
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEIRS	- <i>Haemochromatosis and iron overload screening</i>
HH	- Hemocromatose hereditária
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HJV	- Hemojuvelina
HLA	- <i>Human leukocyte antigen</i>
IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
IMC	- Índice de massa corpórea
IRC	- Insuficiência renal crônica
Kg/m ²	- Kilograma por metro quadrado
LH	- Hormônio Luteinizante
LIM	- Laboratório de investigação médica
LSN	- Limite superior da normalidade
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
mg/dL	- Miligramas por decilitro
ng/mL	- Nanogramas por mililitro
µg/dL	- Microgramas por decilitro
µl	- Microlitro
mM	- Micromol
OMIM	- <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	- Reação de polimerase em cadeia

PCT	- Porfiria cutânea tarda
RFLP	- <i>Restriction fragment length polymorphism analysis</i>
ROC	- <i>Receiver operating characteristic</i>
SBH	- Sociedade Brasileira de Hepatologia
SBP	- Sociedade Brasileira de Patologia
Snab I	- Endonuclease de restrição I
SRE	- Sistema retículo-endotelial
ST	- Saturação da transferrina
STEAP3	- Proteína transmembrana do antígeno prostático epitelial
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TfR1	- Receptor 1 da transferrina
TfR2	- Receptor 2 da transferrina
TSH	- Hormônio tireoestimulante
U	- Unidade
URO-D	- Uroporfirinogênio descarboxilase
VE	- Ventrículo Esquerdo
VHB	- Vírus da hepatite B
VHC	- Vírus da hepatite C
VPN	- Valor preditivo negativo
VPP	- Valor preditivo positivo
=	- Igual a
<	- Menor que
>	- Maior que

TABELAS

Tabela 1 -	Causas hereditárias de sobrecarga de ferro.....	7
Tabela 2 -	Sobrecarga de ferro secundária a outras doenças.....	8
Tabela 3 -	Classificação OMIM da Hemocromatose Hereditária	14
Tabela 4 -	Manifestações clínicas relacionadas a hemocromatose hereditária HFE	20
Tabela 5 -	Características demográficas do grupo de estudo (n=108)	34
Tabela 6 -	Aspectos laboratoriais e anatomopatológicos dos casos (n=108).....	35
Tabela 7 -	Frequência de manifestações clínicas típicas de hemocromatose hereditária nos casos de sobrecarga de ferro (n=108).....	36
Tabela 8 -	Frequência das principais comorbidades encontradas no grupo (n=108).....	37
Tabela 9 -	Frequência alélica dos casos segundo a etnia	38
Tabela 10 -	Características demográficas dos grupos HH-HFE versus sobrecarga de ferro não-HFE	40
Tabela 11 -	Manifestações clínicas relacionadas a HH-HFE versus sobrecarga de ferro não-HFE (n=108).....	41
Tabela 12 -	Caracterização da sobrecarga de ferro sérica entre o grupo HH-HFE versus o grupo sobrecarga de ferro não-HFE	46
Tabela 13 -	Comparação entre os grupos HH-HFE versus sobrecarga de ferro não-HFE quanto a presença de comorbidades	48
Tabela 14 -	Comparação entre os grupos HH-HFE, grupo com mutações HFE não diagnósticas de HH e grupo sem mutações HFE quanto aos parâmetros bioquímicos de ferro	49

Tabela 15 - Comparação pelo método das comparações múltiplas entre os grupos HH-HFE, grupo com mutações HFE não diagnósticas de HH e grupo sem mutações HFE e os níveis bioquímicos de ferro.....	50
Tabela 16 - Análise de regressão linear simples entre as variáveis bioquímicas e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE	61
Tabela 17 - Análise de regressão linear múltipla entre as variáveis bioquímicas e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE	61
Tabela 18 - Análise de regressão linear simples entre manifestações clínicas relacionadas a HH e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE	62
Tabela 19 - Análise de regressão linear múltipla entre as comorbidades e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE	62
Tabela 20 - Análise simples entre os genótipos e a presença de CHC	63
Tabela 21- Características demográficas entre os grupos HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HH	64
Tabela 22 - Características bioquímicas em pacientes com HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HH	65
Tabela 23 - Diferenças significantes entre os grupos de portadores de HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HH quanto às manifestações clínicas relacionadas a sobrecarga de ferro	65
Tabela 24 - Análise de regressão linear simples entre as variáveis bioquímicas e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE	70
Tabela 25 - Regressão linear múltipla entre as variáveis bioquímicas e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE.....	70
Tabela 26 - Análise de regressão linear simples entre manifestações clínicas relacionadas ao fenótipo HH e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE	71

FIGURAS

Figura 1 -	Absorção e captação do ferro.....	4
Figura 2 -	Regulação fisiológica da hepcidina	6
Figura 3 -	Frequências alélicas do alelo C282Y entre as diferentes regiões da Europa	17
Figura 4 -	Algoritmo diagnóstico e manejo da HH.....	21
Figura 5 -	Visualização à luz ultravioleta dos alelos C282Y (A) e H63D (B). Digestão com <i>snab</i>	30
Figura 6 -	Algoritmo de seleção dos casos	33
Figura 7 -	Algoritmo diagnóstico de HH conforme a presença das mutações HFE.....	39
Figura 8 -	Comparação entre os grupos HH-HFE (HH) versus sobrecarga de ferro não-HFE (NHH) quanto a artropatia	42
Figura 9 -	Comparação entre os grupos HH-HFE (HH) versus sobrecarga de ferro não-HFE (NHH) quanto a presença de carcinoma hepatocelular.....	43
Figura 10 -	Comparação entre os grupos HH-HFE (HH) versus sobrecarga de ferro não-HFE (NHH) quanto a presença de <i>diabetes mellitus</i>	44
Figura 11 -	Comparação entre os grupos HH-HFE (HH) versus sobrecarga de ferro não-HFE (NHH) quanto a presença de osteoporose.....	45
Figura 12 -	Associação entre grau de siderose hepática e o diagnóstico de HH-HFE	47
Figura 13 -	Relação entre os grupos de portadores dos genótipos HH-HFE, MP, e o grupo sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos <i>HFE</i> não compatíveis com HH, MNP, e pacientes sem qualquer mutação <i>HFE</i> , NM) e o fenótipo quanto a saturação de transferrina	51

Figura 14 -	Relação entre os grupos de portadores dos genótipos HH-HFE e o grupo sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos <i>HFE</i> não compatíveis com HH, MNP e pacientes sem qualquer mutação <i>HFE</i> , NM) e o fenótipo quanto a ferritina	52
Figura 15 -	Relação entre os grupos portadores dos genótipos HH-HFE e o grupo sobrecarga de ferro não HH-HFE (pacientes com genótipos <i>HFE</i> não compatíveis com HH, MNP, e pacientes sem qualquer mutação <i>HFE</i> , NM) e fenótipo quanto ao ferro.....	53
Figura 16 -	Relação entre os grupos de portadores dos genótipos HH-HFE (MP, mutação padrão) e o grupo sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos <i>HFE</i> não compatíveis com HH, MNP e pacientes sem qualquer mutação <i>HFE</i> , NM) e fenótipo quanto à capacidade total de ligação de ferro	54
Figura 17 -	Relação entre os grupos de portadores dos genótipos HH-HFE (MP, mutação padrão) e o grupo sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos <i>HFE</i> não compatíveis com HH, MNP e pacientes sem qualquer mutação <i>HFE</i> , NM) e fenótipo quanto à transferrina	55
Figura 18 -	Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de saturação de transferrina	56
Figura 19 -	Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de ferritina	57
Figura 20 -	Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de ferro.....	58
Figura 21 -	Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de CTLF	59
Figura 22 -	Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de transferrina.....	60
Figura 23 -	Associação entre HH-HFE, sobrecarga de ferro não-HH com os graus de siderose.....	66

Figura 24 -	Curva ROC para o encontro das mutações <i>HFE</i> C282Y/C282Y, C282Y/H63D em hepatopatas com sobrecarga de ferro a partir da ST.....	67
Figura 25 -	Curva ROC para o encontro das mutações <i>HFE</i> C282Y/C282Y, C282Y/H63D em hepatopatas com sobrecarga de ferro a partir da ferritina	68
Figura 26 -	Curva ROC para o encontro das mutações <i>HFE</i> C282Y/C282Y, C282Y/H63D em hepatopatas com sobrecarga de ferro a partir do ferro	69

RESUMO

Evangelista AS. *Caracterização fenotípica e genotipagem HFE em portadores de doença hepática crônica com sobrecarga de ferro* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A doença hepática associada a sobrecarga de ferro pode ocorrer devido a causas genéticas ou secundárias. Esse estudo avaliou pacientes com hepatopatia crônica com sobrecarga de ferro submetidos à pesquisa das mutações *HFE* no período de 2007-2009 e classificou como portadores de hemocromatose hereditária *HFE* (HH-*HFE*) aqueles que apresentavam as mutações C282Y/C282Y ou C282Y/H63D e como sobrecarga de ferro não *HFE* aqueles que apresentavam outras mutações no gene *HFE* como C282Y/-, H63D/- e H63D/H63D ou pacientes sem qualquer uma dessas mutações mencionadas. Os objetivos do estudo foram 1) analisar e correlacionar os aspectos fenotípicos e genotípicos de grupo de indivíduos com doença hepática crônica e sobrecarga de ferro; 2) caracterizar o quadro clínico, laboratorial e anatomopatológico, em busca de achados compatíveis com o fenótipo de hemocromatose; 3) Correlacionar o quadro clínico com as mutações no gene *HFE*. Foram analisados 108 indivíduos portadores de hepatopatia crônica selecionados a partir de saturação de transferrina (ST) > 45% e ferritina sérica > 350 ng/mL. Foram estudados e comparados 16 pacientes no grupo HH-*HFE* com 92 no grupo sobrecarga de ferro não *HFE*. Da casuística geral, a idade média ao diagnóstico da doença foi de 46,69 anos (16-77), com 70,73% constituída por indivíduos de cor branca, 77,57% do sexo masculino e 64,8% tinham cirrose hepática. A frequência de cirrose hepática não diferiu entre os grupos, entretanto, artropatia, carcinoma hepatocelular, diabetes e osteoporose foram mais frequentes no grupo HH-*HFE* (53,8% x 15,9%, 31,2% x 7,06%, 56,2% x 30%, 72,7% x 32,1%, respectivamente, $p < 0,05$). Os pacientes com mutações *HFE* diagnósticas de HH apresentaram maior chance de ter carcinoma hepatocelular (OR= 5,0, $p= 0,032$) quando comparados com os portadores de outros genótipos *HFE* e aqueles sem mutação. Os níveis de ST, ferro e ferritina também foram maiores naquele grupo, bem como os graus de siderose 3 e 4 ($p= 0,026$). A ST foi a variável que se correlacionou independentemente com o diagnóstico das mutações C282Y/C282Y e C282Y/H63D. A frequência de fatores de risco para sobrecarga de ferro não diferiu entre os grupos. Observou-se, entretanto, que no grupo HH-*HFE* havia maior número de pacientes sem qualquer fator de risco detectado ($p= 0,019$). Níveis de ST > 82% apresentaram maior valor preditivo negativo para o diagnóstico de HH-*HFE* do que os de ferritina, ferro, capacidade total de ligação de ferro e de transferrina. Concluímos que os portadores de HH-*HFE* têm maiores graus de sobrecarga de ferro quando comparados ao grupo de sobrecarga de ferro não-*HFE*; em indivíduos com doença hepática crônica. ST > 82% tem maior acurácia para diagnóstico de HH-*HFE*; portadores de mutações C282Y em homozigose ou em heterozigose composta com H63D têm maior chance de apresentar carcinoma hepatocelular do que os portadores de outras mutações no gene *HFE* e pacientes sem mutação.

Descritores: 1.Sobrecarga de ferro 2.Sobrecarga de ferro/genética
3.Fenótipo 4.Hemocromatose 5.Hemocromatose/etiologia 6.Genótipo
7.Mutação/genética 8.Hepatopatias 9.Gene HFE 10.Carcinoma
hepatocelular/etiologia

SUMMARY

Evangelista AS. *Phenotypic characteristics and HFE genotyping in patients with liver disease and iron overload* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Chronic liver disease related to iron overload may occur due to genetic or secondary causes. This study analyzed patients with chronic liver diseases and iron overload who were tested for *HFE* mutations from 2007 to 2009. Patients with C282Y/C282Y or C282Y/H63D mutations were diagnosed with HFE hereditary hemochromatosis (HFE-HH) and those with other HFE genotypes (C282Y/-, H63D/- or H63D/H63D) or individuals without *HFE* mutations (wild type) were designed as non-HFE iron overload. The aims of this study were: 1) to analyze and to establish correlations between phenotypic and genotypic aspects of individuals with chronic liver disease and with iron overload; 2) to characterize the clinical manifestations, laboratory and histological findings consistent with the phenotype of hemochromatosis; 3) to verify associations between clinical manifestations and *HFE* mutations. One hundred and eight patients with chronic liver diseases and with iron overload, defined as transferrin saturation (TS) > 45% and serum ferritin levels > 350 ng/mL were included. Sixteen patients had HH-HFE and were compared with 92 patients with non-HFE iron overload group. The average of age at diagnosis was 46.69 years (16-77), 70.73% were Caucasians, 77.57% were male and 64.8% had hepatic cirrhosis. The proportion of hepatic cirrhosis was similar in both groups, nevertheless arthropathy, hepatocellular carcinoma, diabetes and osteoporosis were more frequent in the HFE-HH group (53,8% x 15,9%, 31,2% x 7,06%, 56,2% x 30%, 72,7% x 32,1%, respectively, $p < 0,05$). The HFE C282Y/C282Y or C282Y/ H63D genotypes had a higher chance to develop hepatocellular carcinoma (OR= 5.0, $p= 0.032$) when compared with the other HFE genotypes and with those wild type. The levels of TS, serum iron and ferritin were greater in HFE-HH group, as well as hepatic siderosis grade 3 and 4 ($p= 0.026$). TS was the biochemical marker of iron overload with the higher independent correlation with the presence of C282Y/C282Y and C282Y/H63D mutations. The frequency of risk factors for iron overload was not different between the groups, however, in HFE-HH group a greater number of patients without any risk factor was detected ($p= 0.019$). TS > 82% had a higher predictive negative value for diagnosing HFE-HH when compared to the levels of ferritin, serum iron, total iron binding capacity and transferrin. We concluded that the HFE-HH patients had a greater iron overload than patients with chronic liver diseases with non-HFE iron overload. TS > 82% had more accuracy to diagnose HFE-HH. The carriers of C282Y/C282Y or C282Y/H63D mutations had a higher probability to develop hepatocellular carcinoma, when compared to the patients with HFE genotypes and patients wild type.

Descriptors: 1.Iron overload 2.Iron overload/genetics 3. Phenotype 4.Hemochromatosis 5.Hemochromatosis/etiology 6.Genotype 7.Mutation 8.Liver diseases 9.HFE gene 10.Carcinoma, hepatocellular/etiology

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA POR SOBRECARGA DE FERRO

O ferro é elemento essencial devido a sua participação em processos metabólicos envolvidos no transporte de oxigênio, síntese de DNA e transporte de elétrons. Os níveis sanguíneos e teciduais de ferro são mantidos em concentrações adequadas para a sua utilização. Ao primeiro sinal de diminuição da concentração sanguínea e dos estoques corporais de ferro, desencadeia-se uma sequência altamente regulada de síntese de proteínas que agem de maneira integrada e levam a recomposição dos níveis de ferro do organismo¹.

Quando as perdas superam os mecanismos compensatórios, manifesta-se a anemia por deficiência de ferro. Por outro lado, quando o seu aporte excede as perdas ou sobrepuja o mecanismo regulatório, ocorre a sobrecarga. O acúmulo do ferro pode levar a doença devido a toxicidade tecidual. O conhecimento detalhado da fisiologia do ferro e da sua homeostase é fundamental para o reconhecimento das doenças que se associam a esse desequilíbrio^{1,2}.

1.1.1 Fisiologia

1.1.1.1 Homeostase do ferro

Estima-se que, num adulto de 70Kg, o conteúdo corporal total de ferro seja de 4g, distribuídos da seguinte maneira: 2,5g nas hemácias; 1g estocado principalmente no fígado; 0,3g contido na mioglobina e em outras enzimas da cadeia respiratória e cerca de 0,04g ligado a transferrina circulante. O restante, representado pelo ferro não ligado a transferrina, consiste em ferro ligado a outras proteínas plasmáticas, com baixo grau de

afinidade. Essa apresentação do ferro plasmático é altamente tóxica e, portanto, em condições normais, rapidamente removida da circulação.^{2,3}

Cerca de 1-2mg de ferro são absorvidos da dieta para assegurar o equilíbrio metabólico. A reciclagem diária de eritrócitos senescentes é de 0,8%, com a liberação de aproximadamente 20mg de ferro, que são reutilizados na medula óssea para a produção de novas hemácias. Esse fluxo plasmático é eficientemente mantido pela excreção de 1-2mg ao dia, havendo maior ou menor absorção e utilização do ferro de acordo com as necessidades do organismo.^{4,5}

1.1.1.2 Absorção e captação

O ferro não heme (Fe^{+3}) da dieta é absorvido pelo enterócito, reduzido ao estado ferroso (Fe^{+2}) pela enzima reductase férrica duodenal (Dcytb) e proteína transmembrana do antígeno prostático epitelial 3 (STEAP3).^{4,5}

Após absorção, O Fe^{+2} é captado pelo transportador de metal divalente 1 (DMT1) e conduzido ao citoplasma, podendo ser utilizado pela célula, estocado como ferritina ou liberado para o plasma. A ferroportina (FPN), molécula presente na membrana basolateral das células do sistema retículo-endotelial (SRE) e nos enterócitos, desempenha importante papel na exportação do ferro para o plasma. A hefestina, enzima oxidase transmembrana, atua na conversão Fe^{+2} para Fe^{+3} , capacitando-o, assim, para a captação pela transferrina.^{1,2,4,6,7}

O ferro heme, por sua vez, é captado pela borda apical da célula duodenal por um transportador específico ainda não identificado e, dentro da célula, após a degradação do anel pirrólico, segue as vias metabólicas já descritas no item anterior (Figura 1).^{2,4,5}

O ferro ligado a transferrina é captado pelas células através da interação com o receptor 1 da transferrina (TfR1), liberado em endossomas, onde é reduzido pela ferorredutase "STEAP3" que, por sua vez, atua como facilitadora da dissociação do complexo ferro-transferrina. Outro receptor da

transferrina (TfR2) é expresso na membrana dos hepatócitos e se liga ao complexo ferro-transferrina com menor grau de afinidade quando comparado a interação HFE/TfR1 (Figura 1).⁸⁻¹⁰

FONTE: Adaptado de Deugnier Y et al. Iron and the liver: update 2008

Figura 1 - Absorção e captação do ferro. Em condições normais, o ferro é absorvido da dieta pelo enterócito duodenal e, após ser oxidado a Fe^{+2} é lançado no plasma pela ferroportina. O ferro plasmático em sua maior parte é ligado à transferrina. O complexo ferro-transferrina é reconhecido pelos receptores da transferrina, o que possibilita a captação do ferro para o meio intracelular, onde é estocado em forma de ferritina

1.1.1.3 Regulação

Atualmente, reconhece-se o fígado como órgão central na manutenção da homeostase do ferro no organismo, através do controle da quantidade absorvida da dieta pelo intestino, e da sinalização aos sítios de depósito.

O aumento na concentração de ferro no plasma induz sinalização a "sítios de comando" para a redução dos seus níveis por meio da produção de hepcidina; havendo redução do ferro plasmático, observa-se o efeito reverso, ou seja, a sinalização para a síntese de hepcidina é interrompida e ocorre a diminuição dos seus níveis (Figura 2).^{2,10,11}

A hepcidina é um peptídeo de 25 aminoácidos, produzido principalmente pelos hepatócitos e, em menor grau, pelos adipócitos e macrófagos. Interage diretamente com a FPN que então é internalizada e subsequentemente degradada, o que reduz a liberação de ferro dos enterócitos e macrófagos para a circulação sanguínea.^{2,11,12}

O gene responsável pela transcrição da hepcidina, *HAMP*, do termo "*hepcidin antimicrobial peptide*", refere-se à redução do suprimento de ferro aos microrganismos induzida por essa proteína. A sua produção é acentuada na sobrecarga de ferro e em condições inflamatórias, induzida pelas interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6). A hipóxia e a eritropoiese, por outro lado, reduzem a expressão do seu RNAm.^{13, 14}

A transcrição do gene *HAMP* está relacionada à ação das proteínas HFE, Tfr2 e hemojuvelina. Em condições normais, a síntese de hepcidina reduz o aporte excessivo de ferro para a circulação e garante a manutenção do equilíbrio de ferro no organismo. O ferro intra-hepatocitário excedente aumenta a expressão das BMPs (*bone morphogenic proteins*), que por via parácrina, ligam-se a HJV, coreceptor transmembrana. Subsequentemente, ocorre ativação intracelular das proteínas SMAD que levam ao aumento da transcrição da hepcidina.^{15,16}

O ferro plasmático em excesso, por sua vez, induz a ativação da proteína HFE, MHC classe I-símile, expressa na membrana dos hepatócitos

através da interação com a β 2-microglobulina. Após ativada, a proteína HFE liga-se ao receptor 1 da transferrina (TfR1), reconhecendo o complexo ferro-transferrina circulante. A proteína HFE então dissocia-se do TfR1 e liga-se ao TfR2, ativando por conseguinte, a transcrição da hepcidina por sinalização via ERK ou BMP/SMAD (figura 2).^{9, 10, 16, 17}

FONTE: Adaptado de Babbitt JL *et al.* The molecular pathogenesis of hereditary hemochromatosis, 2011.

Figura 2 - Regulação fisiológica da hepcidina. Em condições de sobrecarga de ferro, a hiperferremia e a concentração elevada de ferro hepático são percebidas e sinalizadas pelos receptores TfR1/HFE e TfR2 e proteínas BMPs. Ocorre ativação das vias de transdução de sinal por meio dos complexos Smad e da via alternativa ERK

Quando ocorrem alterações em uma das vias de síntese de proteínas envolvidas na regulação do ferro, ou interferências ambientais que prejudicam a adequada expressão da hepcidina, como hipóxia, inflamação, eritropoiese ineficaz ou aporte excessivo de ferro, ocorre aumento da absorção de ferro e consequente elevação da sua concentração sanguínea.

11-14

Nas condições em que há sobrecarga de ferro, à medida que a transferrina é saturada, ocorre aumento da concentração de ferro não ligado a transferrina. O ferro livre induz a formação de radicais livres de oxigênio, como hidroxil e ferril e, portanto, é provavelmente o principal responsável pelos efeitos deletérios sobre os tecidos.¹⁸

A compreensão do metabolismo do ferro em toda a sua complexidade, desde a absorção até a regulação dos seus níveis, favoreceu o entendimento fisiopatológico das doenças relacionadas a sobrecarga de ferro. Essas são de origem primária, cujo protótipo é a hemocromatose hereditária, nas quais a genética é o principal fator desencadeante, ou de origem secundária, na qual outras doenças ou condições ambientais são fatores de interferência nas vias de regulação do ferro (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Causas hereditárias de sobrecarga de ferro^{2,19}

Hemocromatose hereditária relacionada ao gene *HFE*

Hemocromatose hereditária não relacionada ao gene *HFE*

- Hemocromatose juvenil
 - Hemocromatose relacionada ao gene da transferrina 2
 - Doença da ferroportina
-

Tabela 2 – Sobrecarga de ferro secundária a outras doenças^{2,19}

SOBRECARGA DE FERRO SECUNDÁRIA
Doença hepática crônica
Hepatite C, B
Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)
Doença hepática alcoólica
Anemias com sobrecarga de ferro
Talassemia
Anemia hemolítica crônica
Anemia sideroblástica
Anemia aplásica
Deficiência de Piruvatoquinase
Iatrogênica
Transfusões sanguíneas crônicas
Hemodiálise crônica
Outras causas
Aceruloplasminemia
Sobrecarga de ferro africana
Sobrecarga de ferro neonatal

1.1.2 Fisiopatologia das doenças por sobrecarga de ferro

A sobrecarga de ferro é resultante principalmente de defeitos na síntese da hepcidina. Os quadros hereditários ilustram caracteristicamente as alterações nas principais vias de regulação do ferro.

Mutações nos genes *HAMP* e *HJV* afetam diretamente a produção de hepcidina, o que leva a extrema redução dos seus níveis. Consequentemente, há hiperfunção da ferroportina e liberação maciça de ferro dos enterócitos e macrófagos para o compartimento plasmático, independente dos níveis sanguíneos de ferro. O resultado desse defeito

consiste em quadros juvenis e graves, corroborando a hipótese de que essas proteínas exercem efeito central na regulação do ferro.^{16,17,19-21}

Mutações nos genes *HFE* e *TfR2* resultam em produção limitada de hepcidina, porém os seus níveis sanguíneos são maiores quando comparados àqueles que ocorrem com as mutações anteriormente descritas. Nesses casos, a liberação de ferro dos enterócitos e SRE é gradual, ocorre ao longo da vida, e as manifestações resultantes são tardias, embora alguns casos de mutações *TfR2* tenham sido caracterizados como semelhantes às formas juvenis.¹⁹⁻²¹

Na sobrecarga de ferro secundária, a sua causa subjacente resulta em interferência com as vias regulatórias do ferro ou diretamente com o aumento dos seus estoques. Nas doenças hematológicas com eritropoiese ineficaz o indivíduo torna-se dependente de transfusões sanguíneas. Considerando que uma unidade de concentrado de hemácias contém cerca de 200-250 mg de ferro, sobrecarga de ferro significativa ocorre após longo período de transfusões sanguíneas de repetição.¹⁹ Além disto, a deficiência de ferro e a hipóxia crônica induzem o aumento da eritropoietina e das moléculas sinalizadoras, TWSG1 (*Twisted gastrulation 1*) e GDF 15 (*Growth Differentiation Factor 15*), que levam a diminuição na síntese de hepcidina.¹⁹⁻

23

As doenças hepáticas crônicas associam-se relevantemente a aumento dos estoques de ferro e a sobrecarga crônica pode agravar ainda mais a doença de base. Na hepatite C, cerca de 30-40% dos portadores apresentam níveis elevados de ferro no sangue.^{24,25} A sobrecarga de ferro ocorre pela liberação de ferro dos hepatócitos necróticos, por efeito direto do VHC na redução da síntese de hepcidina e pela interferência das mutações *HFE*.²⁶ Estudo realizado em portadores de hepatite C demonstrou que a inibição da expressão hepática da hepcidina pode intensificar a toxicidade do ferro e promover progressão da doença. Esse achado foi corroborado pela demonstração da recuperação dos níveis de hepcidina após o tratamento bem sucedido do vírus C.²⁷

Algumas publicações sugerem que a presença de mutações dos genes *HFE*, *HAMP* e daquele responsável pela síntese de beta-globina favoreceriam a progressão da hepatite crônica C. Tais mutações têm sido associadas a parâmetros séricos aumentados de ferro, deposição hepática e graus avançados de fibrose.^{24, 25, 28,29}

No Brasil, Martinelli e cols. identificaram, em uma série de 135 portadores de hepatite C crônica, a associação de sobrecarga de ferro com maiores escores de fibrose e inflamação hepática; entretanto, a associação com mutações no gene *HFE* não foi estabelecida.³⁰ Mais recentemente, um levantamento realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) com 320 casos de portadores de hepatite C apontou que as mutações *HFE* ocorrem em associação com maiores graus de fibrose, porém não foi possível estabelecer que a agressão hepática fosse secundária a sobrecarga de ferro.³¹

Qualquer que seja a causa da sobrecarga de ferro na hepatite C, as evidências sugerem maior gravidade da fibrose hepática, sendo a deposição de ferro tecidual o principal fator apontado na progressão da doença e no desenvolvimento de complicações como o carcinoma hepatocelular.³²⁻³⁴

Doença hepática gordurosa não alcoólica é uma das principais causas de doença hepática no mundo. O espectro de manifestações pode variar desde esteatose hepática benigna, passando pela esteatohepatite não alcoólica e culminando na cirrose hepática e no carcinoma hepatocelular (CHC). Níveis brandos a moderados de ferro podem ser vistos nesses pacientes.³⁵ A síndrome da sobrecarga metabólica de ferro ("*dysmetabolic iron-overload syndrome – DIOS*"), descrita como associação entre obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia, anormalidades no metabolismo da glicose e sobrecarga de ferro, pode se associar a resistência à hepcidina, devido à observação de hiperhepcidinemia e hepcidinúria em obesos ou ainda devido à diminuição da transcrição da hepcidina, semelhante ao que ocorre nos indivíduos com hepatite C crônica.^{17, 35-37} Em contrapartida, embora a expressão da hepcidina pelo tecido adiposo possa ser aumentada,

níveis elevados de insulina podem induzir a efeitos opostos. Aumento da ferritina sérica é detectado em cerca de 30% dos pacientes com DHGNA, entretanto, o seu papel como marcador de sobrecarga de ferro ainda é controverso.³⁸

Diversos autores demonstraram que os heterozigotos *HFE* possuem graus intermediários de sobrecarga de ferro e desenvolvem lesões hepáticas mais graves quando apresentam doença hepática gordurosa não alcoólica.^{38,39} Os dados acerca da influência das mutações *HFE* são conflitantes. Estudos têm demonstrado que a siderose hepatocelular é mais prevalente em pacientes com mutações *HFE* e que o acúmulo hepatocitário de ferro foi associado com maior fibrose, entretanto, não há associação significativa entre a presença de mutações *HFE* e a gravidade da lesão hepática.⁴⁰ No HC-FMUSP foi conduzida análise de 32 portadores de esteatohepatite não alcoólica, dos quais apenas três apresentaram siderose em tecido hepático, sem associação, contudo, da intensidade de fibrose ou atividade inflamatória com a sobrecarga de ferro, tampouco com as mutações do gene *HFE*.⁴¹ O papel da sobrecarga de ferro na doença hepática gordurosa ainda necessita ser melhor elucidado, uma vez que a sua contribuição para a evolução da doença pode ser interrompida pela detecção precoce e realização de flebotomia.

A doença hepática alcoólica é associada com deposição de ferro. O consumo de álcool está associado com níveis séricos elevados do ferro e abstinência de cerca de 2-6 semanas reduz significativamente os índices plasmáticos de ferro.⁴² O álcool e seus metabólitos levam a geração de radicais livres e a necrose hepatocitária resultante leva a liberação do ferro. A expressão da hepcidina é também reduzida diretamente pela ação do álcool sobre a C/EBPa com resultante acúmulo de ferro em hepatócitos e posteriormente em macrófagos.⁴³

A porfiria cutânea tarda é uma doença ferro-dependente caracterizada por erupções vesico-bolhosas nas mãos e face. Sobrecarga de ferro pode estar presente em cerca de 60-70% dos pacientes. Para que ocorram as

manifestações clínicas, é necessário que pelo menos 75% da atividade da enzima envolvida na patogênese da doença, a uroporfirinogênio descarboxilase (URO-D) esteja inibida e a presença de fatores de risco é fundamental para que isso ocorra. O ferro excedente interage com essa enzima e a depleção de ferro leva a reversão das manifestações clínicas.^{44,45} A prevalência das mutações *HFE* é elevada nos pacientes com PCT e varia de 9-17% nos estudos. Outras mutações nos genes das proteínas do metabolismo de ferro também têm sido associadas ao desenvolvimento da PCT, pela diminuição da síntese de hepcidina e consequente sobrecarga de ferro.^{44,46,47}

Existe forte associação entre PCT e hepatite C. O vírus da hepatite C é um potente indutor do desequilíbrio no metabolismo das porfirinas e, naqueles pacientes com predisposição, pode levar a manifestação da doença.⁴⁷

Portadores de cirrose hepática também podem desenvolver sobrecarga de ferro pela própria hepatopatia crônica, que pode levar a formação de shunts portossistêmicos, hemólise crônica e necrose hepatocitária subjacente com liberação de ferro. Na maior parte dos casos, a origem do ferro acumulado é multifatorial e pode haver a interação entre doença hepática secundária e causas genéticas de hemocromatose. A distinção entre os quadros primários e o reconhecimento da concomitância de ambos podem influenciar diretamente na adequada condução do manejo clínico dos portadores dessas condições.

1.2 HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

1.2.1 Definição e histórico

A hemocromatose hereditária (HH) é doença autossômica recessiva, resultante de perda da regulação da entrada de ferro na circulação, levando a progressivo acúmulo de ferro que deposita em diversos tecidos, notavelmente no parênquima do fígado, pâncreas, coração e hipófise. A toxicidade tecidual do ferro acumulado leva a cirrose hepática, hepatocarcinoma, diabetes, hipogonadismo hipogonadotrófico, doença articular, cardiomiopatia e hiperpigmentação cutânea.^{20,21,48}

A HH foi inicialmente descrita em 1889 por von Recklinghausen como doença causada pela hiperpigmentação de órgãos parenquimatosos por ferro após a análise *post mortem* de pacientes com diabetes, cirrose hepática e hiperpigmentação cutânea. Em 1935, a partir da revisão de 311 casos publicados, Sheldon¹ apud Cullen⁴⁹, sugeriu que o acometimento de múltiplos órgãos por uma única doença era explicado por erro inato no metabolismo do ferro, de transmissão hereditária e resultante da absorção intestinal acentuada do metal. Simon *et al.*, em 1977, identificaram a associação da doença com o complexo HLA (*human leukocyte antigen*), o que possibilitou a confirmação da sua origem genética e a hereditariedade autossômica recessiva. Em 1996, o gene da hemocromatose, denominado *HFE*, foi identificado no braço curto do cromossoma 6 por Feder *et al.*⁴⁹ Em seu relato inicial, identificou-se a troca do aminoácido cisteína pela tirosina na posição 282 em homozigose (C282Y/ C282Y) em cerca de 80% dos casos de HH, achado confirmado em estudos subsequentes. Uma segunda mutação, resultante da substituição da histidina por aspartato na posição 63 (H63D) também foi descrita por Feder *et al.* Esse alelo foi identificado como causa de HH quando em associação com C282Y (C282Y/H63D) e, raramente, quando em homozigose.⁴⁹⁻⁵¹ Subsequentemente, outras

* Sheldon JH. Haemochromatosis. London: Oxford University Press; 1935.

proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro, hepcidina, hemojuvelina, receptor 2 da transferrina, ferroportina e seus respectivos genes, *HAMP*, *HJV*, *TfR2*, *SCL40A1* foram identificados.⁵²⁻⁵⁵ A HH é, portanto, entidade heterogênea, cuja manifestação está associada a mutações genéticas e contribuição de fatores ambientais. Os avanços na descoberta dos novos genes e proteínas envolvidos na homeostase do ferro levaram a uma revolução no conceito de HH e na compreensão de sua fisiopatologia.

À luz desses novos conhecimentos, Pietrangelo redefiniu a hemocromatose hereditária (HH) como toda doença decorrente da sobrecarga de ferro que tem como características: 1) herança autossômica recessiva; 2) expansão precoce do compartimento plasmático de ferro (elevação da saturação da transferrina); 3) preservação da eritropoese, com boa resposta à flebotomia; 4) causada por mutações genéticas que levam a deficiência na síntese de hepcidina (*HFE*, *TfR2*, *HAMP*, *HJV*); 5) Depósito de ferro preferencial em órgãos parenquimatosos, com o potencial de causar dano em locais como fígado, coração, glândulas endócrinas e articulações.²⁰

O banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&itool=toolbar>) classifica as hemocromatoses hereditárias de acordo com o gene envolvido nos tipos: 1) clássica, 2) juvenil, 3) relacionada ao *TfR2* e 4) relacionada à ferroportina, conforme resume a Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação OMIM da Hemocromatose Hereditária

Tipo	Tipo 1 Forma clássica	Tipo 2 (subtipos A e B) Juvenil		Tipo 3	Tipo 4 (subtipos 4A e 4B)
Gene envolvido	<i>HFE</i>	<i>HJV</i>	<i>HAMP</i>	<i>TfR2</i>	<i>SLC40A1</i>
Produto do Gene	HFE	Hemo Juvelina	Hepcidina	Receptor 2 da transferrina	Ferroportina
Local do gene	6p21.3	1q21	19q13.1	7q22	2q32

Nos três primeiros tipos, a sobrecarga de ferro é resultante da perda ou diminuição da síntese de hepcidina, enquanto que no tipo 4, também conhecido como doença da ferroportina, os níveis de hepcidina são normais. A doença da FPN é dividida em subtipo 4A, no qual há perda de função dessa proteína, sobrecarga de ferro em células do SRE e baixa saturação da transferrina; e subtipo 4B, onde a FPN não responde aos estímulos da hepcidina e há a liberação maciça de ferro para a circulação, com saturação do compartimento sanguíneo do ferro, semelhante ao que ocorre com os casos associados às mutações *HFE*, *TfR2*, *HJV* e *HAMP*.⁵⁶

A doença da FPN, por ser de herança autossômica dominante e cursar, em sua forma 4A, com anemia e pobre resposta à flebotomia, é excluída da definição atual de HH proposta por Pietrangelo.⁴⁸ Outros autores, contudo, incluem o subtipo 4B na classificação de hemocromatose hereditária, pela semelhança das características fenotípicas entre ambas. Devido a falta de consenso na literatura acerca da classificação da doença da FPN, aceita-se como HH, para fins de estudo, as formas de sobrecarga de ferro associadas às mutações *HFE*, *TfR2*, *HJV* e *HAMP*.^{56-58,59}

Excetuando-se a pesquisa da mutação *HFE*, a realização do sequenciamento dos demais genes associados ao metabolismo do ferro ainda é limitada a centros de pesquisa. Assim, a classificação OMIM é pouco prática para utilização de rotina e recomenda-se, portanto, o seu uso para a referência em publicações.

1.2.2 Epidemiologia

1.2.2.1 Distribuição geográfica e frequência alélica

Cerca de 80-90% dos casos de HH na população de origem nórdica são associados à homozigose C282Y.^{50,60} A mutação H63D, outro alelo conhecido no gene *HFE*, raramente associa-se a sobrecarga de ferro, exceto quando em heterozigose composta com C282Y (responsável por cerca de 5% dos casos de HH) ou na presença de fatores de risco adicionais para essa condição.^{60,61}

A distribuição geográfica da HH é similar ao padrão de migração dos Celtas, indivíduos do norte da Europa, local de provável origem das mutações *HFE* e dos casos de hemocromatose. Na Europa, as frequências do alelo C282Y variam entre as diferentes regiões geográficas, sendo as maiores frequências alélicas documentadas em países do norte da Europa e variam desde 12,5% na Irlanda até 0-4% no sudeste europeu (Figura 3).⁴⁴ O estudo HEIRS (*haemochromatosis and iron overload screening*), que envolveu 101.168 indivíduos de diversas etnias, demonstrou que o genótipo C282Y/C282Y ocorre mais comumente em brancos nórdicos (0,44%) do que em hispânicos (0,027%), negros (0,014), habitantes das ilhas pacíficas (0,012%) e asiáticos (0,000039%).⁶¹ A mutação H63D, embora considerada minoritária nos casos de HH, ocorre com maior frequência nos portadores de sobrecarga de ferro quando comparados a controles saudáveis, apresenta frequências alélicas maiores que o alelo C282Y em todos os grupos étnicos, tem ampla distribuição por toda a Europa, onde atinge frequências de até 40% em algumas regiões.^{44,61,62}

FONTE: EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis, 2010

Figura 3 - Frequências alélicas do alelo C282Y entre as diferentes regiões da Europa

No Brasil, as mutações C282Y e H63D ocorrem em 1-3,7% e 16-20,3%, respectivamente, nos caucasianos, e em menores frequências quando se analisam mestiços, e não são detectadas nos nativos.^{63,64} Esses dados evidenciam menor frequência das mutações no gene *HFE* em pacientes brasileiros, quando comparados a caucasianos de origem celta, entretanto demonstram concordância com a literatura, pela maior prevalência em indivíduos de origem nórdica. Em 2009, uma publicação de 19 pacientes brasileiros recrutados em dois centros de referência evidenciou a presença de mutações *HFE* C282Y e H63D em 50% dos casos clássicos de HH, sugerindo a hipótese da existência de outros genes ainda não pesquisados.⁵⁹

1.2.2.2 Penetrância

O genótipo C282Y/C282Y está presente aproximadamente em 1 a cada 200 indivíduos de origem norte-europeia entretanto, nem todos os portadores da mutação C282Y em homozigose apresentam doença clinicamente manifesta. Cerca de 30-50% dos homozigotos apresentam sobrecarga de ferro e uma proporção ainda menor, 10-30% expressam clinicamente a hemocromatose, com dano tecidual e morbidade.^{18,19} Considerando que a mutação C282Y é marcador da doença e a homozigose é necessária para o desenvolvimento da hemocromatose, a expressão da sobrecarga de ferro depende da interação entre fatores modificadores genéticos e ambientais.^{20,48}

O sexo masculino apresenta maior expressão clínica da sobrecarga de ferro e morbidade a ela relacionada quando comparado ao sexo feminino. Os homens homozigotos para C282Y apresentam maiores taxas de ferritina, de sobrecarga de ferro tecidual e frequência de doença hepática com relação às mulheres homozigotas.^{44; 65} Elevação de enzimas hepáticas, fibrose e cirrose hepática foram presentes em 30, 18 e 6% dos homens versus 6, 5 e 2% das mulheres homozigotas para C282Y.⁶⁶ As perdas menstruais e a gestação são prováveis fatores protetores contra acúmulo de ferro nas mulheres.

A identificação dos genes e das mutações permitiu o estabelecimento do diagnóstico em familiares assintomáticos de portadores conhecidos da doença. A observação desses indivíduos possibilitou a constatação de diferentes estádios clínicos da doença nos homozigotos C282Y, desde a ausência de sobrecarga de ferro no momento da investigação (“geneticamente susceptíveis”), até elevação dos níveis sanguíneos de ferro em fase assintomática ou em fase tardia com dano de órgãos.^{67, 68}

1.2.3 Manifestações clínicas

O conhecimento acerca das manifestações clínicas relacionadas à sobrecarga de ferro são oriundas dos estudos em pacientes com HH associada ao gene *HFE*. A clássica associação de diabetes, escurecimento de pele e cirrose hepática é raramente vista hoje, devido ao reconhecimento dessa doença em fases menos avançadas e à intervenção terapêutica precoce.

A hemocromatose costuma manifestar-se após os 40 anos de idade, sendo na mulher a apresentação ainda mais tardia, devido a proteção natural pelas perdas menstruais.⁴⁸

O quadro clínico na HH é relacionado ao grau de sobrecarga de ferro e pode variar desde a fase assintomática no portador das mutações até lesões de órgãos-alvo. Testes laboratoriais que refletem o diagnóstico de sobrecarga de ferro são a saturação de transferrina (ST) e ferritina sérica. Níveis de ST e ferritina sérica acima de 45% e 300 ng/mL refletem graus brandos a moderados de sobrecarga férrica (2-5g). Os indivíduos nessa fase geralmente estão assintomáticos ou apresentam sintomas inespecíficos. Os estádios mais avançados traduzem graus avançados de sobrecarga (15-40g) com dano de órgãos alvo e significativa morbidade.⁶⁹

A tabela 4 a seguir resume as principais manifestações clínicas relacionadas a hemocromatose.

Tabela 4 – Manifestações clínicas relacionadas a hemocromatose hereditária *HFE*

ALVO ACOMETIDO	MANIFESTAÇÕES	%
Pele ^{70,71}	Hiperpigmentação	90
Pâncreas ⁷²	Diabetes	70
Articulações ⁷³ 2ª e 3ª MCF/ IFP/ punhos/ ombros/ quadris/ cotovelos	Artrite/artralgia Depósito de cristais de pirofosfato de cálcio	25-50
Coração ⁷⁴	Cardiomiopatia/ arritmia/ ICC	30-35
Ossos ⁷⁵	Osteoporose	25
Fígado ^{76,77}	Hepatomegalia	10-25
	Alteração de enzimas	
	Cirrose hepática	4-6
	Carcinoma hepatocelular	6% dos cirróticos
Hipotálamo/ hipófise ⁷⁸	Hipogonadismo	6-10
Tiróide ⁷⁹	Hipo ou hipertireoidismo	10

1.2.4 Diagnóstico e manejo da HH

O diagnóstico e manejo da HH a partir de indivíduos sintomáticos, assintomáticos ou parentes em primeiro grau de portadores da doença deve ser realizado de acordo com o algoritmo.⁸⁰

NOTA: LSN= Limite superior da normalidade

FONTE: Adaptado de "Diagnosis and Management of Hemochromatosis". AASLD, 2011.

Figura 4 - Algoritmo diagnóstico e manejo da HH

1.3 OBJETIVOS

São objetivos do trabalho:

1.3.1 Objetivo Geral

Analisar e correlacionar os aspectos fenotípicos e genotípicos de um grupo de indivíduos com doença hepática crônica e sobrecarga de ferro.

1.3.2 Objetivos Específicos

- 1.3.2.1 Caracterizar quadro clínico, laboratorial e anatomopatológico, em busca de achados compatíveis com fenótipo de hemocromatose;
- 1.3.2.2 Correlacionar quadro clínico com mutações C282Y e H63D no gene *HFE*;
- 1.3.2.3 Comparar os grupos de portadores de HH-HFE com portadores de sobrecarga de ferro não-HFE.

2 MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DA CASUÍSTICA

O presente estudo é uma análise exploratória constituída de levantamento retrospectivo de dados de registros hospitalares de indivíduos com sobrecarga de ferro matriculados nos ambulatórios de hepatologia do Serviço de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período entre janeiro de 2007 e dezembro de 2009.

2.1.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos, consecutivamente, todos aqueles que, mediante alterações hepáticas crônicas associadas a níveis séricos de saturação da transferrina > 45% e ferritina > 350 ng/mL, foram submetidos à pesquisa das mutações *HFE* C282Y e H63D no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do HCFMUSP.

2.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos aqueles sem dados clínicos e laboratoriais no prontuário, os casos de hepatite aguda e aqueles sem amostra de DNA viável para análise laboratorial.

2.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela CAPPesq sob o número 1065/05 (Anexo A). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) após leitura e explicação pelo médico assistente, no momento da solicitação da coleta da pesquisa das mutações *HFE*.

2.3 ASPECTOS REVISADOS NOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS

O formulário do Anexo C foi utilizado para registrar os dados obtidos com o levantamento retrospectivo dos prontuários. Foram obtidos os dados demográficos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos, conforme especificado a seguir (Anexos D-G).

2.3.1 Dados demográficos

2.3.1.1 Sexo;

2.3.1.2 Cor: branca, parda, negra, amarela. Essa classificação foi obtida no prontuário, na folha de anamnese inicial; quando não disponível, foi obtida no cadastro médico do paciente no hospital;

2.3.1.3 Naturalidade e procedência: de acordo com o estado de origem;

2.3.1.4 Ascendência: a origem familiar referida pelo paciente;

- 2.3.1.5 Idade ao início dos sintomas: a data da primeira manifestação de doença hepática ou de qualquer sintoma ou sinal que tenha indicado a pesquisa de sobrecarga de ferro;
- 2.3.1.6 História familiar de HH: a partir de dados registrados nos prontuários, sem necessariamente haver a confirmação diagnóstica por exames complementares.
- 2.3.1.7 Índice de Massa Corpórea (IMC): calculado a partir do peso corpóreo em Kg dividido pelo quadrado da altura em m ($IMC=Kg/m^2$).

2.3.2 Dados Clínicos

2.3.2.1 Diagnósticos clínicos relacionados a doença hepática

Foram pesquisados os seguintes parâmetros clínicos do momento do diagnóstico: ascite, icterícia, circulação colateral visível em parede abdominal, aranhas vasculares, ginecomastia, asterixis. Para fins de tabulação dos dados, os pacientes foram classificados em não cirrótico, cirrótico compensado, cirrótico descompensado, ausência ou presença de CHC. Consideraram-se achados compatíveis com hepatopatia crônica:

- a. Alteração de enzimas hepáticas (AST e ou ALT) acima de uma vez e meia o limite superior da normalidade em duas análises consecutivas com diferença entre seis meses entre as duas medidas, sendo tabulada a medida da análise inicial;⁸¹
- b. Análise histológica hepática com alteração arquitetural maior ou igual ao grau 1 (F1), presença de infiltrado inflamatório maior ou igual a 1, de acordo com a classificação da Sociedade Brasileira de Patologia/ Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBP/SBH),⁸² presença de esteatose e de outros achados como balonização hepatocitária, corpúsculos de Mallory, glicogênio nuclear e marcadores etiológicos;

- c. Exame de imagem: sinais de hepatopatia crônica com alteração da textura e ecogenicidade do parênquima, presença de bordas rombas, hipertrofia do lobo caudado, aumento do calibre da veia porta, esplenomegalia, presença de circulação colateral e ascite;

2.3.2.2 Manifestações clínicas compatíveis com HH

- a. *Diabetes mellitus*: duas glicemias de jejum acima de 126 mg/dL ou registro no prontuário de uso de insulina ou hipoglicemiante oral;⁸³
- b. Artropatia: presença de sintomas como artralgia de acometimento preferencial na 2ª e 3ª metacarpofalangeanas e sinais radiológicos como osteófitos, redução dos espaços periarticulares, escleroses e formações císticas, artropatia por cristais (pseudogota);⁷³
- c. Hipogonadismo: essa característica foi atribuída ao paciente que referiu diminuição da libido e impotência, na ausência da dosagem dos hormônios sexuais ou aquele que apresentou níveis reduzidos de testosterona, FSH e LH, quando da sua dosagem;⁷⁸
- d. Cardiomiopatia: anormalidades de condução ou arritmia no ECG, alterações de relaxamento de VE, insuficiência cardíaca descompensada ou fração de ejeção (FE) menor que 50% ao estudo ecocardiográfico;⁷⁴
- e. Carcinoma hepatocelular: o diagnóstico de CHC foi realizado de acordo com os critérios de Barcelona: um exame de imagem trifásico com hipervascularização arterial e clareamento do contraste na fase portal e equilíbrio ou a combinação do exame de imagem compatível e alfafetoproteína > 400 ng/mL, ou biópsia do nódulo hepático compatível.⁸⁴

2.3.2.3 Comorbidades adicionais

Foram pesquisadas as seguintes comorbidades: hipertensão arterial sistêmica (HAS), osteoporose, infecção crônica por vírus da hepatite B, C e

HIV, a presença de doença hepática gordurosa não alcoólica, tireoidopatia, anemias hereditárias, história de politransfusões, etilismo acima de 20-40g por dia por período superior a 10 anos e tabagismo

2.3.2.4 Exames complementares

Os dados de exames coletados foram aqueles realizados concomitantemente à dosagem do primeiro perfil bioquímico de ferro: saturação da transferrina (ST) em %, ferritina em ng/mL, ferro sérico (Fe) em µg/dL, capacidade total de ligação do ferro (CTLF) em µg/dL, transferrina em mg/dL, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gamaglutamiltransferase (GGT), bilirrubina total e frações (BTF), glicemia de jejum, TSH, T4L, FSH, LH, testosterona livre e total (para homens), sorologias para hepatite B, C, HIV, ECG, ecocardiograma bidimensional com doppler colorido, exame ultrassonográfico abdominal, avaliação anatomopatológica hepática e quando disponível, dados do explante.

2.3.2.5 Parâmetros de sobrecarga de ferro

- a. Definiram-se como portadores de hemocromatose HFE todos os pacientes que apresentaram ST > 45% e ferritina > 350 ng/mL associados às mutações *HFE* C282Y em homozigose (C282Y/C282Y) ou em heterozigose composta com H63D (C282Y/H63D). Os demais foram referidos como portadores de sobrecarga de ferro não HFE
- b. No estudo anatomopatológico hepático, para a siderose parenquimatosa, foi considerada a análise semi-quantitativa segundo a coloração de Perls: graus 0, 1, 2, 3 e 4.

2.3.2.6 Aspectos terapêuticos

A realização de sangria foi documentada a partir de relatos do prontuário médico, dos formulários preenchidos no banco de sangue. Foi

analisada a indicação de sangria, a data e o volume inicial retirado, os volumes subsequentes e a periodicidade, naqueles prontuários em que tais informações eram disponíveis. O volume total de sangue retirado foi calculado até o momento da coleta dos dados no prontuário. A obtenção da ferritina dentro dos parâmetros de referência segundo a Divisão do Laboratório Central do HCFMUSP foi documentada a partir de dados no prontuário ou no sistema eletrônico do HCFMUSP (HCmed) obtidos no período da realização da última sangria.

2.4 TÉCNICA DE GENOTIPAGEM HFE

A genotipagem *HFE* foi realizada no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM 07). O DNA foi obtido dos leucócitos do sangue periférico por kit comercial de extração de DNA genômico (Qiaamp DNA Mini 250, Qiagen, Germany).

As mutações *HFE* C282Y e H63D foram pesquisadas pela técnica RFLP (*restriction fragment length polymorphism analysis*) nos produtos de PCR do DNA dos pacientes. A amplificação foi realizada no termociclador Perkin Elmer Gene Amp® 2400.

Para identificação da mutação C282Y, o fragmento de oligonucleotídio de 400 pbs foi amplificado utilizando-se as sequências *primers*: forward 5'-TGG CAA GGG TAA ACA GAT CC e *reverse* 5' CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC. Para identificação da mutação H63D, o fragmento de 207 pb foi amplificado utilizando-se *primers* com sequências *forward* 5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC e *reverse* 5' GCCACATCTGGCTTGAAATT. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 50 µl que contém 5 µl de DNA genômico (1 µg), 10x solução tampão (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 2 mM de cada mistura dNTP (Invitrogen), 0,6 µM de cada *primer*, 1U de *Platinum Taq DNA polymerase*

(Invitrogen). A amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos e 35 ciclos; cada ciclo foi constituído de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão em 72°C por 1 minuto. Adicionalmente, foi realizada extensão final em 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram dissolvidos no gel de agarose a 2 %, submetidos a coloração em brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta. A análise dos fragmentos de restrição foi realizada digerindo os produtos de PCR com as enzimas de restrição *Sna*bl (para C282Y) and *Bcl*l (para H63D) por 2 horas em 37°C e 3 horas em 50°C, respectivamente. Procedeu-se então a eletroforese das amostras digeridas em gel de agarose a 2 % e visualização à luz ultravioleta após coloração em brometo de etídio (Figura 5). Para cada reação de PCR, o DNA de controles saudáveis, homozigotos e heterozigotos foi amplificado e digerido simultaneamente sob condições idênticas às aqui apresentadas⁶⁷.

Figura 5 - Visualização à luz ultravioleta dos alelos C282Y (A) e H63D (B). Digestão com *sna*b

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, utilizou-se o software R – versão 2.15.2. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparação das medianas das variáveis em que não se obteve a distribuição normal, o teste T para comparação entre as médias das variáveis que tiveram distribuição normal. Para avaliar a associação entre as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Fisher. Para testar a associação entre três grupos, as hipóteses da normalidade e igualdade de variâncias foram verificadas pelos testes Anderson/Darling e Levene/Bartlett, respectivamente. Nos casos em que as duas hipóteses foram satisfeitas, empregou-se ANOVA. Nos casos em que somente a segunda hipótese foi satisfeita, utilizou-se o Kruskal-Wallis para a comparação dos grupos. Quando nenhuma das hipóteses foi satisfeita, aplicou-se o procedimento de comparações múltiplas Tukey não-paramétrico para testar as combinações dois a dois das variáveis. Para se verificar a associação entre a presença da mutação diagnóstica da HH e as comorbidades ou a sua relação com os parâmetros bioquímicos do ferro, foram realizadas análises de regressão logística simples e naquelas em que havia significância estatística, aplicou-se a análise de regressão logística múltipla com o método “backward”, com valor p de entrada de 0,10. Os pontos de corte foram definidos pela curva ROC construída pelo método de Youden. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3 RESULTADOS

3.1 CASUÍSTICA

No período de janeiro de 2007 a dezembro de 2009, 231 pacientes foram encaminhados para a pesquisa das mutações *HFE* e 133 casos preencheram os critérios de inclusão. Do banco inicial de 133 casos, 24 foram excluídos por falta de registros de prontuário e um porque se tratava de hepatite aguda. O grupo de estudo, portanto, foi constituído de 108 indivíduos, sendo 84 (77,7%) do sexo masculino, com média de idade de 46,7 (16-77) anos (Figura 6).

Figura 6 - Algoritmo de seleção dos casos

3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os aspectos obtidos por revisão de prontuários constam nos Anexos D - Dados demográficos e resultados de mutações *HFE*; Anexo E - Dados bioquímicos e siderose tecidual; Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas à HH; Anexo G - Comorbidades. Na Tabela 5 estão resumidas as características demográficas do grupo de estudo.

Tabela 5 - Características demográficas do grupo de estudo (n=108)

Características	Resultado
Sexo n (%)	
Masculino	84 (77,57%)
Feminino	24 (22,43%)
Idade em anos	
média (mínima-máxima)	46,69 (16-77)
Índice de massa corpórea	26,40 (19,6-34,9)
Cor n (%)	
Amarelo	4 (3,70%)
Branco	76 (70,37%)
Negro	9 (8,33%)
Pardo	19 (17,59%)

A tabela 6 traz os aspectos laboratoriais e anatomopatológicos de todo o grupo estudado.

Tabela 6 - Aspectos laboratoriais e anatomopatológicos dos casos (n=108)

Aspectos laboratoriais	Resultado
Bioquímica hepática média (mín-máx)	
Alanina aminotransferase	94,45 (16-780)
Aspartato aminotransferase	95,18 (15-638)
Bilirrubina total	3,04 (0,36-27,1)
Bilirrubina direta	1,74 (0,01-8,2)
Perfil de Ferro Sérico média (mín-máx)	
Capacidade total de ligação do ferro	249,2 (98-584)
Ferritina	1873,6 (366-10980)
Ferro	187,3 (79-346)
Saturação da transferrina (%)	78,82
Transferrina	200,9 (80-320)
Aspectos anatomopatológicos n (%)	
Fibrose (n)	74
0	7 (9,45)
1	7 (9,45)
2	15 (20,27)
3	9 (12,16)
4	36 (48,64)
Siderose - técnica de Perls (n)	69
0	22 (31,88)
1	11 (15,94)
2	13 (18,84)
3	12 (17,39)
4	11 (15,94)

A tabela 7 lista os achados clínicos relacionados a HH e respectivas frequências encontradas nesses pacientes.

Tabela 7 - Frequência de manifestações clínicas típicas de hemocromatose hereditária nos casos de sobrecarga de ferro (n=108)

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	n (%)
Doença hepática	
Alteração de enzimas	84 (77,0)
Cirrose hepática	70 (64,8)
Compensada	40 (57,1)
Descompensada	30 (42,9)
Carcinoma hepatocelular	11 (10,0)
Manifestações extra-hepáticas	
Artropatia	14 (12,9)
Cardiopatía	38 (35,0)
Hiperpigmentação cutânea	19 (17,6)
<i>Diabetes mellitus</i>	36 (33,0)
Tireoidopatia	14 (12,9)
Hipogonadismo	14 (12,9)

A frequência de pacientes sem nenhuma comorbidade de risco para sobrecarga de ferro foi de 18,51%. A seguir, estão listadas as frequências das principais comorbidades encontradas no grupo estudado.

Tabela 8 - Frequência das principais comorbidades encontradas no grupo (n= 108)

Comorbidade	N* (%)
Anemia hereditária	7 (6,54)
Dislipidemia	26 (25,24)
Doença hepática gordurosa não alcoólica	36 (34,65)
Etilismo	27 (25,96)
Hipertensão arterial sistêmica	40 (39,22)
Portador HIV	4 (3,7)
Insuficiência renal crônica	2 (1,89)
Porfiria cutânea tarda	9 (8,33)
Hepatite B	2 (1,89)
Hepatite C	26 (24,76)

Nota: * número de pacientes para os quais a informação sobre a variável era disponível

3.2.1 Aspectos terapêuticos

A sangria foi procedimento realizado em 43 pacientes. Houve a normalização da ferritina em 11 casos. O volume médio total de sangue removido foi de 43,98L ($\pm 60,42$).

3.3 GENOTIPAGEM *HFE*

3.3.1 Cálculo da frequência alélica

Do total de 108 indivíduos, a frequência alélica para as mutações C282Y, H63D foi de 0,16 e 0,18, respectivamente. As mutações C282Y e H63D foram mais frequentes nos pardos e brancos em relação aos negros. Os indivíduos de cor amarela não apresentaram mutações *HFE*.

A Tabela 9 demonstra a frequência alélica das mutações de acordo com a etnia.

Tabela 9 - Frequência alélica dos casos segundo a etnia

Etnia	C282Y (n/N)	H63D (n/N)
Branco	0,16 (25/152)	0,18 (28/152)
Pardos	0,23 (9/38)	0,18 (7/38)
Negros	0,11 (2/18)	0,16 (3/18)

n= total de alelos com mutação

N= total de alelos por etnia

3.3.2 Caracterização fenotípica

3.3.2.1 Diagnóstico de HH-HFE

A análise *HFE* demonstrou que 16 pacientes apresentaram diagnóstico da forma clássica de HH: 13 eram homozigotos para as mutações C282Y e três heterozigotos compostos com a mutação H63D. Noventa e dois indivíduos não evidenciaram mutações compatíveis com a forma clássica. A figura 7 demonstra o algoritmo diagnóstico de HH conforme a análise das mutações *HFE*.

Figura 7 - Algoritmo diagnóstico de HH conforme a presença das mutações *HFE*

3.3.2.2 Comparações entre os fenótipos de sobrecarga de ferro

A tabela 10 traz as características demográficas entre os grupos de portadores de HH-HFE e os portadores de sobrecarga de ferro não-HFE.

Tabela 10 - Características demográficas dos grupos HH-HFE versus sobrecarga de ferro não-HFE

Características	HH-HFE (n= 16)	Sobrecarga de ferro não-HFE (n= 92)	p valor
Idade ao início dos sintomas média ($\pm$ DP)	51,07 ($\pm$ 9,6)	45,92 ($\pm$ 13,65)	0,086
Sexo			
Masculino (%)	75	78,02	0,753
Cor			0,901
Branco	68,75	70,65	
Negro	6,25	8,7	
Pardo	25,00	16,3	
Amarelo	-	4,35	

A comparação entre os grupos quanto às manifestações clínicas características de HH está apresentada na tabela 11.

Tabela 11 - Manifestações clínicas relacionadas a HH-HFE versus sobrecarga de ferro não-HFE (n=108)

Características	HH-HFE n=16 (%)	Sobrecarga de ferro não-HFE n= 92 (%)	p valor
Alteração de enzimas hepáticas	43,7	83,7	0,999
Artropatia	53,8	15,9	0,008
Cardiopatía	71,4	63,8	0,500
Cirrose hepática	75,0	63,7	0,316
descompensada	25,0	37,1	1,000
Carcinoma hepatocelular	31,2	7,06	0,008
Hiperpigmentação cutânea	40,0	27,2	0,331
Diabetes mellitus	56,2	30,0	0,040
Hipogonadismo	38,4	14,7	0,056
Osteoporose	72,7	32,1	0,026
Tireoidopatia	25,0	11,3	0,142

HH: hemocromatose hereditária

Entre os portadores de CHC, a idade média de diagnóstico nos grupos HH-HFE versus sobrecarga de ferro não-HFE foi de 57 versus 49,9 anos ($p= 0,65$), sendo todos portadores de cirrose hepática ($p= 1,00$).

As figuras 8, 9 10 e 11 ilustram a comparação entre portadores de HH-HFE versus sobrecarga de ferro não-HFE quanto às manifestações de artropatia, carcinoma hepatocelular, diabetes e osteoporose.

Figura 8 - Comparação entre os grupos HH-HFE (HH) versus sobrecarga de ferro não-HFE (NHH) quanto a artropatia

Figura 9 - Comparação entre os grupos HH-HFE (HH) versus sobrecarga de ferro não-HFE (NHH) quanto a presença de carcinoma hepatocelular

Figura 10 - Comparação entre os grupos HH-HFE (HH) versus sobrecarga de ferro não-HFE (NHH) quanto a presença de *diabetes mellitus*

$p = 0,026$

Figura 11 - Comparação entre os grupos HH-HFE (HH) versus sobrecarga de ferro não-HFE (NHH) quanto a presença de osteoporose

A comparação entre os grupos de portadores de HH-HFE versus os pacientes com sobrecarga de ferro não-HFE demonstrou que as medianas dos níveis de saturação de transferrina, ferritina e ferro foram maiores no grupo HH-HFE, com significância estatística; para a capacidade total de ligação de ferro, embora maior no grupo HH-HFE, não se observou significância estatística. Quando comparada entre os grupos, a mediana da transferrina também não teve significância estatística (Tabela 12).

Tabela 12- Caracterização da sobrecarga de ferro sérica entre o grupo HH-HFE versus o grupo sobrecarga de ferro não-HFE

Variável	HH-HFE média ($\pm$ DP)	Sobrecarga de ferro não-HFE média ($\pm$ DP)	p
ST (%) (VR: 20-40%)	91,02 ($\pm$ 11,26)	76,7 ($\pm$ 17,98)	0,001
Ferro (μ g/dL) (VR: M 37-145 H: 59-158)	212,65 ($\pm$ 30,82)	183,21 ($\pm$ 51,66)	0,003
Ferritina (ng/mL) (VR: M 13-150 H 30-400)	2676,75 ($\pm$ 1928,87)	1733,99 ($\pm$ 1810,31)	0,035
Transferrina (mg/dL) (M 225-380 H 215-365)	200,00 ($\pm$ 27,96)	200,00 ($\pm$ 56,37)	0,806
CTLF (μ g/dL) (VR: 228-428)	229,46 ($\pm$ 29,65)	252,31 ($\pm$ 76,44)	0,808

HH: hemocromatose hereditária

ST: saturação da transferrina/ CTLF: capacidade total de ligação do ferro

M: mulheres/ H: homens

A análise pela coloração de Perls foi disponível em 10 casos de HH-HFE e em 59 portadores de sobrecarga de ferro não-HFE. Siderose tecidual de graus leve e moderado esteve presente no segundo grupo, enquanto os portadores de HH-HFE apresentaram siderose intensa, graus 3 e 4 (Figura 12).

Figura 12- Associação entre grau de siderose hepática e o diagnóstico de HH-HFE

Observa-se que a presença da doença HH tem relação com os graus de siderose 3 e 4, ao passo que o grupo sobrecarga de ferro não-HFE tem maior relação com os graus de siderose 0,1 e 2.

A tabela 13 mostra a comparação entre os grupos de portadores de HH-HFE e portadores de sobrecarga de ferro não-HFE quanto a presença de comorbidades de risco para sobrecarga de ferro. O percentual de pacientes sem pelo menos uma das comorbidades listadas foi de 37,5% no grupo HFE e 11% no grupo não HFE ($p= 0,019$).

Tabela 13 - Comparação entre os grupos HH-HFE versus sobrecarga de ferro não-HFE quanto a presença de comorbidades

Comorbidade	HH-HFE (%)	Sobrecarga de ferro não-HFE (%)	p valor
Anemia hereditária	-	7,69	0,59
Dislipidemia	20,00	26,14	0,75
Doença hepática gordurosa não alcoólica	18,75	37,65	0,16
Etilismo	13,33	28,09	0,34
Hipertensão arterial sistêmica	31,25	40,70	0,58
Portador HIV	-	4,35	1,00
Insuficiência renal crônica	-	2,22	1,00
Porfiria cutânea tarda	6,25	8,7	1,00
Hepatite B	-	2,27	1,00
Hepatite C	6,25	28,09	0,11

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HH: hemocromatose hereditária

3.3.2.3 Análise do genótipo versus fenótipo

A relação entre os níveis bioquímicos de ferro e o genótipo está representada nas tabelas 14 e 15 a seguir e nas figuras 13 a 17. Para se efetuar essa comparação o grupo sobrecarga de ferro não HH-HFE foi subdividido em dois subgrupos: pacientes com mutações HFE em heterozigose (C282Y/-; H63D/-) ou H63D em homozigose (H63D/H63D) e pacientes sem qualquer mutação para o gene HFE. O valor de p foi obtido comparando-se os três grupos através dos testes de ANOVA e Kruskal-Wallis (Tabela 14).

Tabela 14 - Comparação entre os grupos HH-HFE, grupo com mutações HFE não diagnósticas de HH e grupo sem mutações HFE quanto aos parâmetros bioquímicos de ferro

Variável bioquímica mediana (± DP)	HH-HFE (n= 16)	Sobrecarga de ferro não-HFE		p valor
		C282Y/-; H63D/H63D; H63D/- (n= 38)	Ausência de mutações HFE (n=52)	
Ferritina (ng/mL) (VR: M 13-150 H 30-400)	3323,50 (± 1928,87)	1246,5 (± 1486,39)	1354,5 (± 2019,26)	0,192
Ferro (µg/dL) (VR: M 37-145 H: 59-158)	221 (± 30,82)	192 (± 57,34)	178 (± 46,38)	0,008
Transferrina (mg/dL) (M 225-380 H 215-365)	200 (± 27,96)	220 (± 54,95)	190 (± 56,23)	0,201

M: mulheres
H: homens

As variáveis ST e CTLF foram avaliadas pelo método das comparações múltiplas. Os níveis de ST foram maiores no grupo HH-HFE, quando comparado com o grupo dos pacientes com mutações HFE não diagnósticas de HH e com o grupo sem mutação. A comparação entre esses dois últimos grupos não demonstrou diferenças entre si (Tabela 15).

Tabela 15 - Comparação pelo método das comparações múltiplas entre os grupos HH-HFE, grupo com mutações HFE não diagnósticas de HH e grupo sem mutações HFE e os níveis bioquímicos de ferro

Variável bioquímica mediana ($\pm$ SD)	HH-HFE (n= 16)	Sobrecarga de ferro não-HFE	
		C282Y/-; H63D/H63D; H63D/- (n= 38)	Ausência de mutações HFE (n=52)
ST (%) [§] (VR: 20-40%)	96,71 ($\pm$ 11,26) ^a	71,75 ($\pm$ 17,64) ^b	75,44 ($\pm$ 18,36) ^c
CTLF [§] (μ g/dL) (VR: 228-428)	229 ($\pm$ 29,65) ^d	251 ($\pm$ 85,64) ^e	225 ($\pm$ 67,40) ^f

§a $\neq$ b (p= 0,002); a $\neq$ c (p=0,004); b =c (p=0,932)
(d=e (p= 0,136); e=f (p=0,191) ; d=f (p= 0,977)

ST: saturação da transferrina

CTLF: Capacidade total de ligação do ferro

HH: hemocromatose hereditária

As figuras 13 a 17 ilustram as diferenças encontradas nos níveis de marcadores bioquímicos entre os grupos HH-HFE e de sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos HFE não compatíveis com HH e pacientes sem qualquer mutação HFE). Para análise das figuras, NM (nenhuma mutação HFE), MNP (Mutação não padrão, genótipos HFE não compatíveis com HH) e MP (mutação padrão, genótipo HH-HFE).

Figura 13- Relação entre os grupos de portadores dos genótipos HH-HFE, MP, e o grupo sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos HFE não compatíveis com HH, MNP, e pacientes sem qualquer mutação HFE, NM) e o fenótipo quanto a saturação de transferrina

Observa-se que no grupo de portadores do genótipo HH-HFE (MP, mutação padrão), a mediana dos níveis de ST é maior em relação aos demais grupos (portadores de outras mutações *HFE*, MNP, e não portadores de mutações *HFE*, NM, nenhuma mutação). Nota-se um valor discrepante no grupo de portadores do genótipo HH-HFE. Trata-se de paciente do sexo feminino, portadora de heterozigose composta C282Y/H63D (caso 40, Anexos D-G), com ST 64,5%.

Figura 14 - Relação entre os grupos de portadores dos genótipos HH-HFE, MP, e o grupo sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos HFE não compatíveis com HH, MNP, e pacientes sem qualquer mutação HFE, NM) e o fenótipo quanto a ferritina

Observa-se que o grupo HH-HFE (MP, mutação padrão) apresentou níveis maiores de ferritina quando comparados com os demais grupos. Essa tendência demonstrada, entretanto, não apresentou significância estatística. No grupo sem qualquer mutação *HFE* e no grupo com mutações *HFE* sem diagnóstico do HH observaram-se cinco e dois valores discrepantes (*outliers*), respectivamente. Desses sete casos, cinco foram identificados como prováveis portadores de hemocromatose hereditária não-HFE (formas juvenis ou associadas a mutação *TfR2*, casos 7, 38, 78, 99 e 106, Anexos D-G).

Figura 15 - Relação entre os grupos portadores dos genótipos HH-HFE e o grupo sobrecarga de ferro não HH-HFE (pacientes com genótipos *HFE* não compatíveis com HH, MNP, e pacientes sem qualquer mutação *HFE*, NM) e fenótipo quanto ao ferro

Observa-se que o grupo de portadores dos genótipos HH-HFE, MP, apresentou níveis maiores de ferro quando comparados com os demais grupos. No grupo sem qualquer mutação *HFE*, NM e no grupo com mutações *HFE* sem diagnóstico de HH, MNP, observaram-se cinco e dois valores discrepantes (*outliers*), respectivamente. Desses sete casos, dois (um no grupo NM e um no grupo MNP), apresentaram diagnóstico clínico de hemocromatose juvenil. Os demais são portadores de comorbidades como hepatite C e PCT, o que provavelmente explica a variabilidade nos níveis do ferro.

Figura 16 - Relação entre os grupos de portadores dos genótipos HH-HFE (MP, mutação padrão) e o grupo sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos *HFE* não compatíveis com HH, MNP e pacientes sem qualquer mutação *HFE*, NM) e fenótipo quanto à capacidade total de ligação de ferro

Observa-se menor variação entre os grupos quanto a CTLF, não havendo diferença estatisticamente significante.

Figura 17- Relação entre os grupos de portadores dos genótipos HH-HFE (MP, mutação padrão) e o grupo sobrecarga de ferro não-HFE (pacientes com genótipos *HFE* não compatíveis com HH, MNP e pacientes sem qualquer mutação *HFE*, NM) e fenótipo quanto à transferrina

O maior valor de mediana está no grupo com genótipo HH-HFE, mas não houve diferença estatística. Observa-se um valor discrepante no grupo HH-HFE.

Utilizando-se a curva ROC, foram obtidos pontos de corte para as principais variáveis bioquímicas, a fim de se prever o diagnóstico de HH-HFE, pelo encontro dos genótipos responsáveis pelo fenótipo da HH-HFE.

Analisando-se a saturação de transferrina, definiu-se o ponto de corte em 82%, com sensibilidade de 0,87 e especificidade de 0,56, VPP 0,25, VPN 0,96 (Figura 18).

Figura 18 - Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de saturação de transferrina

Analisando-se a ferritina, definiu-se o ponto de corte em 2685 ng/mL, com sensibilidade de 0,5 e especificidade de 0,86, VPP 0,4, VPN 0,9 (Figura 19).

Figura 19 - Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de ferritina

Analisando-se os níveis de ferro, foi obtido o ponto de corte em 178 $\mu\text{g/dL}$, com Sensibilidade 93%, Especificidade 46%, VPP 22 % e VPN 98% (Figura 20).

Figura 20 - Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de ferro

Analisando-se a capacidade total de ligação de ferro, definiu-se o ponto de corte em 199 $\mu\text{g/dL}$, com sensibilidade de 0,92 e especificidade de 0,26, VPP 0,16, VPN 0,96 (Figura 21).

Figura 21 - Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de CTLF

Analisando-se os níveis de transferrina, definiu-se o ponto de corte em 170 mg/dL, com sensibilidade de 0,90 e especificidade de 0,30, VPP 0,16, VPN 0,95 (Figura 22).

Figura 22 - Curva ROC para o encontro do genótipo HH-HFE em hepatopatas com sobrecarga de ferro. Análise quanto ao nível de transferrina

A análise de regressão linear simples dos parâmetros bioquímicos de ferro demonstrou, para cada ponto de corte definido pela curva ROC, em cada variável, a chance de se obter a presença do genótipo para o diagnóstico de HH-HFE (Tabela 16). Quando se complementou com a análise de regressão logística múltipla, apenas a ST manteve significância estatística (Tabela 17).

Tabela 16 - Análise de regressão linear simples entre as variáveis bioquímicas e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE

Variável	C.O	p	OR	IC 95%
Ferritina, ng/mL	2685	0,001	3,82	(1,69 - 8,64)
ST, % (VR: 20-40%)	82	0,005	4,77	(1,61 - 14,14)
Ferro (µg/dL) (VR: M 37-145 H 59-158)	178	0,02	5,71	(1,32 - 24,69)
CTLF (µg/dL) (VR: 228-428)	199	0,145	3,00	(0,69 - 13,11)
Transferrina, (mg/dL) (M 225-380 H 215-365)	170	0,176	2,81	(0,63 - 12,55)

C.O: *cutoff* OR: *odds ratio*, IC: intervalo de confiança; ST: saturação da transferrina; CTLF: Capacidade total de ligação do ferro; HH: hemocromatose hereditária; M: mulheres; H: homens

Tabela 17 - Análise de regressão linear múltipla entre as variáveis bioquímicas e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE

Variável	C.O	p	OR	IC 95%
ST, % (VR 20-40%)	82	0,005	19	(2,25-160,74)

C.O- *cutoff*; OR - *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

A análise de regressão linear simples entre as manifestações clínicas demonstrou que osteoporose, artropatia, diabetes e carcinoma hepatocelular obtiveram maior força de associação com a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE (Tabela 18). Na análise de regressão linear múltipla, o carcinoma hepatocelular permaneceu como a variável com maior chance de prever o diagnóstico de HH-HFE (OR 5,81; $p=0,018$ IC 95% 1,34-25,31), enquanto as alterações das enzimas hepáticas correlacionaram-se com a ausência do diagnóstico de HH-HFE (Tabela 19).

Tabela 18 - Análise de regressão linear simples entre manifestações clínicas relacionadas a HH e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE

Variável	OR	IC 95%	p
Alteração de enzimas hepáticas	0,15	0,05-0,47	0,001
Artropatia	6,17	1,59-23,96	0,009
Carcinoma hepatocelular	5,98	1,56-22,95	0,009
Osteoporose	5,63	1,2-26,41	0,028
<i>Diabetes mellitus</i>	3,00	1,01-8,88	0,047
Hipogonadismo	3,61	0,96-13,55	0,057
Tiroidopatia	2,60	0,7-9,63	0,153
Cirrose hepática	1,71	0,51-5,72	0,386
Hiperpigmentação cutânea	1,78	0,44-7,19	0,420
Cardiopatia	1,41	0,37-5,42	0,614

Tabela 19 - Análise de regressão linear múltipla entre as comorbidades e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE

Variável	p	OR	IC 95%
Alteração de enzimas	0,003	0,17	(0,05 - 0,56)
Carcinoma hepatocelular	0,018	5,81	(1,34 - 25,1)

OD: Odds ratio; IC: intervalo de confiança; HH: hemocromatose hereditária

Considerando-se que o CHC foi a variável com maior chance de se predizer o diagnóstico de HH, foi analisada então a força de associação entre os genótipos HFE com a variável CHC. Mediante análise simples, a chance de se ter CHC foi de cinco vezes para a mutação C282Y em homozigose ou heterozigose composta com H63D quando comparada com os portadores de genótipo selvagem (Tabela 20).

Tabela 20 - Análise simples entre os genótipos e a presença de carcinoma hepatocelular

Variável	OR	IC 95%	p
C282Y/-; H63D/-; H63D/H63D	0,63	(0,11-3,63)	0,604
C282Y/C282Y C282Y/H63D	5,00	(1,15-21,78)	0,032

Nota: OR= *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança

3.4 Características demográficas, bioquímicas, anatomopatológicas, clínicas e terapêuticas dos pacientes com HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HH

A análise do fenótipo mostrou, no grupo de portadores de sobrecarga de ferro não-HFE, que seis pacientes apresentavam possível forma hereditária não associada ao gene *HFE*, baseado em critérios clássicos: sobrecarga sanguínea, siderose grau 4 no anatomopatológico, ausência de outras causas de sobrecarga de ferro e quantidade de ferro removido para alcançar a normalização dos parâmetros plasmáticos. Assim, foi feita a análise dos resultados sem esses pacientes. O grupo 1 permaneceu constituído de portadores de HH-HFE, enquanto que o segundo grupo, com 86 pacientes, foi denominado de sobrecarga de ferro não-HH. A análise comparativa apresentou os seguintes resultados:

Tabela 21- Características demográficas entre os grupos HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HH

Características	HH-HFE (n= 16)	sobrecarga de ferro não-HH (n= 86)	p valor
Idade ao início dos sintomas Média ($\pm$ DP)	51,07 ($\pm$ 9,6)	47,08 ($\pm$ 13,05)	0,17
Sexo Masculino (%)	75	77,38	1,00

HH: hemocromatose hereditária

As tabelas 22 e 23 mostram as características bioquímicas e as manifestações clínicas dos pacientes com e sem sobrecarga de ferro não relacionada a HH.

Tabela 22 - Características bioquímicas em pacientes com HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HH

Variável	HH-HFE	Sobrecarga de ferro não-HH	p valor
ST (%) (VR: 20-40%)	91,02 (± 11,26)	75,56 (± 17,98)	0,001
Ferro (µg/dL) (VR: M 37-145 H: 59-158)	212,65 (± 30,82)	180,13 (± 48,16)	0,001
Ferritina (ng/mL) (VR: M 13-150 H 30-400)	2676,75 (± 1928,87)	1366,85 (± 945,88)	0,012

HH: hemocromatose hereditária

Tabela 23 - Diferenças significantes entre os grupos de portadores de HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HH quanto às manifestações clínicas relacionadas a sobrecarga de ferro

Características	HH-HFE n=16 (%)	sobrecarga de ferro não-HH n= 86 (%)	p
Alteração de enzimas	43,7	82,3	0,002
Artropatia	53,8	7,8	0,001
Carcinoma hepatocelular	31,2	7,6	0,019
<i>Diabetes mellitus</i>	56,2	27,71	0,039
Hipogonadismo	38,4	5,56	0,005
Osteoporose	72,7	21,7	0,008

HH: hemocromatose hereditária

A figura 23 mostra a correspondência entre os fenótipos de sobrecarga de ferro HH-HFE e não-HH com os graus de siderose.

$p = 0,009$

Figura 23 - Associação entre HH-HFE, sobrecarga de ferro não-HH com os graus de siderose

Após a exclusão de pacientes não portadores das mutações *HFE* C282Y/C282Y, C282Y/H63D com fenótipo de HH, os pontos de corte encontrados para o diagnóstico de HH- *HFE* em hepatopatas com sobrecarga de ferro estão ilustrados a seguir (Figuras 24-26).

Figura 24 - Curva ROC para o encontro das mutações *HFE* C282Y/C282Y, C282Y/H63D em hepatopatas com sobrecarga de ferro a partir da ST

Figura 25 - Curva ROC para o encontro das mutações *HFE* C282Y/C282Y, C282Y/H63D em hepatopatas com sobrecarga de ferro a partir da ferritina

S= 83%; E= 57%

VPP= 21%; VPN= 96%

Figura 26 - Curva ROC para o encontro das mutações *HFE* C282Y/C282Y, C282Y/H63D em hepatopatas com sobrecarga de ferro a partir do ferro

A análise de regressão linear simples do perfil bioquímico de ferro mostrou, para cada ponto de corte definido pela curva ROC, significância estatística para ST, ferritina e ferro (Tabela 24).

Tabela 24 - Análise de regressão linear simples entre as variáveis bioquímicas e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE

Variável	C.O	p	OR	IC 95%
Ferritina	2685	<0,001	13,1	(3,65-47,55)
ST	82%	0,003	10,5	(2,24-49,18)
Ferro	185	0,015	13,04	(1,64-103,72)
CTLF	199	0,140	4,82	(0,60-38,95)
Transferrina	170	0,187	4,17	(0,63-12,55)

C.O: *cutoff*; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

ST: saturação da transferrina

CTLF: Capacidade total de ligação do ferro

HH: hemocromatose hereditária

A análise de regressão linear múltipla mostrou, para cada ponto de corte, significância estatística para ST, Ferritina e CTLF (Tabela 25).

Tabela 25 - Regressão linear múltipla entre as variáveis bioquímicas e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE

Variável	p	OR	IC 95%
ST (%) (VR: 20-40%)	0,004	28,22	(3,02-263,59)
Ferritina (ng/mL) VR: M (13-150) H (30-400)	0,004	13,87	(2,33-82,57)

C.O: *cutoff*; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; M: mulheres H: homens

A análise de regressão linear simples para as manifestações clínicas relacionadas ao fenótipo de HH demonstrou os seguintes resultados (Tabela 26).

Tabela 26 - Análise de regressão linear simples entre manifestações clínicas relacionadas ao fenótipo HH e a presença do genótipo diagnóstico de HH-HFE

Variável	OR	IC 95%	p
Alteração de enzimas hepáticas	0,17	(0,05-0,52)	0,002
Artropatia	13,61	(2,73-67,78)	0,001
Carcinoma hepatocelular	5,45	(1,42-20,96)	0,013
Osteoporose	9,60	(1,83-50,31)	0,007
<i>Diabetes mellitus</i>	3,35	(1,12-10,05)	0,031
Hipogonadismo	10,62	(2,12-53,31)	0,004

Após a análise de regressão linear múltipla, as variáveis que permaneceram estatisticamente significantes foram a alteração de enzimas hepáticas, cuja presença evidencia maior associação com a ausência das mutações *HFE*, OR 0,09, IC 95% (0,01-0,63), $p=0,014$ e a osteoporose, com OR 8,17, IC 95% (1,2-55,75), $p=0,031$. O CHC, quando analisado como variável independente em relação a todas as outras manifestações clínicas, obteve OR 5,42, IC 95% (1,27-23,11), $p=0,023$.

O volume médio de sangue removido para se obter a normalização da ferritina foi de 8,51L no grupo sobrecarga de ferro não-HH e 34,4L no grupo HH-HFE. Essa diferença, contudo, não atingiu significância estatística ($p=0,78$).

4 DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

Nessa análise exploratória retrospectiva de portadores de hepatopatia crônica com sobrecarga de ferro, observa-se maior frequência de pacientes do sexo masculino e de cor branca, com idade média de manifestação de sintomas relacionados a doença de 46,6 anos. O grupo de portadores de HH-HFE apresentou maiores graus de sobrecarga de ferro bioquímica e tecidual, quando comparados com o grupo de portadores de sobrecarga de ferro não associada ao gene *HFE*. Entre as variáveis bioquímicas, a saturação de transferrina destacou-se como a variável de maior associação com o diagnóstico de HH-HFE e a curva ROC demonstrou que valores de ST, ferritina e ferro abaixo de 82%, 2685 ng/mL e 178 µg/dL são de alto valor preditivo negativo para o diagnóstico de HH-HFE nessa população.

A elevada frequência de cirrose hepática (64,8%) na casuística geral e entre os grupos, reflete a metodologia de seleção com base em pacientes portadores de hepatopatia.

A artropatia, o CHC, a osteoporose e o DM foram as variáveis de maior associação com a HH-HFE. O CHC destacou-se como a manifestação clínica cuja associação manteve-se relevante quando confrontado com as demais variáveis. Os portadores do genótipo HH-HFE apresentaram chance cinco vezes maior de apresentar CHC quando comparados com os pacientes sem mutações HFE.

Os portadores de sobrecarga de ferro não-HFE apresentaram maiores taxas de comorbidades no que se refere a causas não genéticas de sobrecarga de ferro, como doença hepática gordurosa não alcoólica, etilismo, hepatites virais, doença renal crônica e anemia hereditária com relação aos portadores de HH-HFE. Essa diferença, entretanto, não obteve

significância estatística, o que possivelmente requer maior grupo de estudo para conclusões definitivas.

Os conhecimentos da literatura acerca da fisiopatologia e das manifestações clínicas relacionadas a sobrecarga de ferro são provenientes dos estudos em HH, o protótipo das doenças por sobrecarga de ferro.

4.2 INFLUÊNCIA DO SEXO

Os estudos de correlação genotípica com análise de fenótipo em sobrecarga de ferro são, de maneira geral, populacionais, nos quais foi identificada a proporção de homozigotos C282Y e então definidas as penetrâncias bioquímica e clínica. Nesses estudos, observou-se que os níveis sanguíneos de ferro eram elevados em 70-80% dos homozigotos C282Y do sexo masculino e 30-60% do sexo feminino.^{62,77,86-88}

O sexo masculino tem como único mecanismo de excreção de ferro do organismo a descamação dos enterócitos, o que predispõe a maior acúmulo de ferro e as manifestações clínicas aparecem em idades menos avançadas quando se compara com pacientes do sexo feminino.⁷⁷ Allen *et al* vieram a confirmar essa premissa, quando demonstrou, em seu estudo prospectivo, que no sexo masculino ocorrem maiores graus de sobrecarga de ferro e maior percentual de manifestações clínicas, como cirrose hepática, artropatia e carcinoma hepatocelular.⁸⁹ A predominância do sexo masculino nesse estudo é, portanto, concordante com os relatos da literatura.

4.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS RELACIONADAS A SOBRECARGA DE FERRO, AO GENÓTIPO HH-HFE E FATORES DE RISCO

O presente estudo reporta as características fenotípicas de pacientes pré-selecionados com hepatopatia crônica e sobrecarga de ferro e teve o diagnóstico de HH-HFE em 14,81% dos pacientes, sendo 12% homozigotos C282Y. Esta frequência é, como esperado, superior àquela relatada na população geral.⁴⁴ Estudos semelhantes, que determinaram a frequência dos genótipos *HFE* em pacientes com doença hepática, demonstraram a variabilidade na presença de homozigotos em 3-5% dos pacientes.⁹⁰⁻⁹³ Essa frequência aumentou para 7,7% quando os pacientes hepatopatas foram selecionados com níveis de ST > 45%.⁹² O fenótipo dos pacientes do presente estudo, provenientes de centro de referência em doenças hepáticas, com predomínio de cirróticos em sua população, associadas a sobrecarga de ferro definida não apenas na elevação dos níveis de ST, mas também na dos níveis de ferritina, favorece a maior possibilidade de encontro de portadores de HH-HFE, o que pode justificar a maior frequência do genótipo HH-HFE quando comparada com os relatos da literatura.

Na análise das manifestações clínicas, comparação similar foi realizada em estudo⁹⁴ que analisou retrospectivamente os prontuários de indivíduos encaminhados a um centro de referência em sobrecarga de ferro. Do total de 270 pacientes, aqueles com hemocromatose hereditária foram comparados a portadores de sobrecarga de ferro por diversas causas. Os portadores de HH, à semelhança dos resultados do presente trabalho, obtiveram maiores graus de sobrecarga bioquímica e tecidual de ferro. Nesse grupo, relatou-se tendência a maior apresentação de DM, impotência e hipotireoidismo, sem, contudo, haver significância estatística. Ademais, a frequência de comorbidades como hepatite C, doença hepática gordurosa não alcoólica e alcoólica foi significativamente maior no grupo de portadores de sobrecarga de ferro não-HH.

De acordo com a graduação *Haute Autorité de Santé*, os portadores das mutações típicas para o diagnóstico de HH com dano de órgãos são portadores de doença avançada, pertencentes ao estágio 4 e apresentam as manifestações típicas da doença como cirrose hepática, hepatocarcinoma, artropatia e diabetes. Essas manifestações, entretanto, são morbidades comumente apresentadas na população de hepatopatas, o que tem dificultado a sua caracterização como específica dos portadores de sobrecarga de ferro.⁶⁶

Para se definir quais são as manifestações clínicas que mais se associam ao quadro característico da HH, os estudos avaliam a penetrância clínica da doença, a prevalência do genótipo HH-HFE em determinadas populações, como em portadores de artralgia, DM, hepatopatia, CHC e PCT e a frequência de determinadas manifestações clínicas em portadores do genótipo HH-HFE.⁴⁴

A penetrância de um determinado gene é diferente do seu fenótipo. O fenótipo é a manifestação da doença já instalada, portanto, central. A penetrância é a proporção de portadores da mutação que desenvolverá a doença em um determinado período de tempo.

A penetrância clínica da HH, ou seja a proporção de portadores de genótipo HH-HFE que desenvolverão manifestações clínicas da HH, variam na literatura em 1-90% dos portadores desse genótipo. Esses estudos são, em geral, de corte transversal, com critérios de seleção não homogêneos. Nesses estudos, a penetrância clínica é definida, principalmente, na presença de doença hepática como manifestação definidora de HH em homozigotos C282Y ou heterozigotos compostos C282Y/H63D.⁹⁵⁻⁹⁷

A prevalência de homozigotos C282Y em portadores de artrite inflamatória não foi maior com relação a população controle, mas quando analisada a população de portadores de condrocalcinose houve associação significativa com a presença do genótipo HH-HFE.⁴⁴

A associação de DM tipo 2 com o polimorfismo C282Y não tem sido demonstrada em estudos de corte-transversal e de caso-controle. Adams et

al, no estudo HEIRS observou não haver diferença significativa na incidência de diabetes entre os homozigotos C282Y e aqueles sem mutação *HFE*, sendo esta comorbidade mais frequente naqueles portadores de história familiar. Há de se notar, entretanto, que nesse estudo, os pacientes com sobrecarga de ferro diagnosticada antes da inclusão, portanto já com a doença clinicamente manifesta, tinham sido excluídos.

Maior prevalência da homozigose C282Y, no entanto, foi detectada em portadores de complicações associadas ao DM, como nefropatia e retinopatia, o que pode refletir doença avançada. Em estudo recente, Wood e cols.⁹⁸, observaram que a presença de diabetes foi independentemente associada com maiores graus de fibrose hepática em portadores de HH-HFE. Esse achado reforça a hipótese de que os portadores de doença avançada, mas não os de doença diagnosticada em estádios mais precoces, tenham maior frequência de manifestações clínicas relacionadas a hemocromatose.

No presente estudo, os pacientes apresentam hepatopatia avançada, portanto, são portadores do fenótipo de doença relacionada a sobrecarga de ferro⁸⁹ sendo o grupo de pacientes com HH-HFE classificado como estágio 4. Isto pode justificar a maior associação de manifestações clínicas como diabetes, CHC, artropatia e osteoporose com o grupo HH-HFE. Da mesma maneira, a seleção da casuística pode justificar a não significância estatística nas diferentes frequências das comorbidades encontradas entre os grupos.

Fracanzani e cols.⁹⁹ analisaram, em uma coorte prospectiva, indivíduos encaminhados por sobrecarga de ferro em três centros de referência para HH na Itália, ao longo de 30 anos. Após a definição do fenótipo de HH com base nos níveis bioquímicos e teciduais de ferro e nas características genótípicas, os grupos foram divididos em portadores de HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HFE. Interessantemente, foi observado que aqueles pacientes diagnosticados como HH na primeira década do estudo e tinham, portanto, doença de maior duração e mais avançada quando

comparados com aqueles incluídos nas duas últimas décadas, apresentavam também frequências mais elevadas de manifestações clínicas como cirrose hepática, artropatia, DM, cardiopatia e hipogonadismo.

Não houve diferença entre os grupos quanto a ingestão de álcool, IMC e quantidade de ferro removido para a normalização da ferritina, entretanto, o grupo de portadores de sobrecarga de ferro não-HFE apresentou maiores frequências de hepatites virais B e C. Nesses grupos, cerca de 73% e 61% dos portadores de HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HFE, respectivamente, não apresentaram fatores de risco identificáveis para sobrecarga férrica. Contudo, vale ressaltar que as únicas comorbidades investigadas foram VHB, VHC e uso de álcool. Outras situações em que se pode detectar sobrecarga de ferro, como doença hepática gordurosa não alcoólica, não foram analisadas o que pode ter subestimado a real prevalência dos fatores de risco para sobrecarga férrica. No presente trabalho, apenas 14,81% da casuística geral não apresentou qualquer comorbidade de risco para o desenvolvimento de sobrecarga de ferro e mesmo dentro do grupo de portadores de HH-HFE essa frequência não foi elevada (37,5%). Como os pacientes são provenientes de centro de hepatologia clínica de um hospital universitário e não de centros de referência em HH, há maior probabilidade de serem recrutados portadores de causas diversas de hepatopatia que levam a sobrecarga de ferro.

4.4 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular é reconhecidamente associado com a HH e é uma das principais causas de mortalidade nesses pacientes. De maneira geral, nos portadores de hemocromatose hereditária, o CHC tem sido detectado naqueles com cirrose hepática, o que torna esta variável confundidora para a definição do verdadeiro risco de associação com a sobrecarga de ferro. Adams et al. demonstraram que a prevalência de CHC

na população de portadores de HH foi de 10,7%, e em portadores de cirrose hepática relacionada a HH, 18,5%.^{100,101}

Alguns estudos tiveram como objetivo analisar se o risco de CHC era maior entre pacientes com HH e cirrose hepática quando comparados com cirróticos por outras causas. Fracanzani et al¹⁰² compararam hepatopatas com HH com portadores de doença hepática crônica por outras causas, sendo álcool e hepatites B e C as mais frequentes. Após seguimento de 80 meses, o desenvolvimento de CHC foi observado em 36% dos cirróticos com HH e em 21,64% no outro grupo. Outros pesquisadores, no entanto, não encontraram maior risco de desenvolver CHC entre os pacientes com HH, tendo este sido mais elevado em portadores de comorbidades como VHB, álcool e em indivíduos com idade avançada.¹⁰³

No presente estudo, a frequência de CHC foi de 10,89% no geral, sendo de 31,2% nos portadores de HH-HFE e somente em 7,06% nos portadores de sobrecarga de ferro não-HFE. A idade média ao diagnóstico de CHC foi maior com relação a casuística geral e todos eram portadores de cirrose hepática. Esses resultados devem ser vistos com cautela, uma vez que a frequência maior de pacientes com CHC no grupo HH-HFE desse estudo com relação à literatura pode refletir viés de amostragem na população. O HCFMUSP, além de centro de referência em portadores de doenças hepáticas em geral, é também centro de excelência em transplante hepático. O CHC, complicação de elevada frequência em cirróticos, atualmente determina prioridade para o transplante hepático. Assim, o serviço de Gastroenterologia desenvolveu um grupo especializado em hepatocarcinoma, o que também pode explicar a elevada frequência desta comorbidade na população estudada. Acrescenta-se, também, possível interferência do viés de seleção, pela análise de população de hepatopatas, alta frequência de cirróticos e com elevado número de comorbidades, haja vista que apenas 37,5% dos portadores de HH-HFE não apresentavam nenhum cofator para o desenvolvimento de sobrecarga de ferro.

Por outro lado, a significância estatística obtida na diferença entre os grupos HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HFE foi reforçada pela associação de CHC com a HH-HFE e maior chance de seu surgimento nos portadores das mutações diagnósticas desta doença. Dado que o grau de sobrecarga de ferro está associado com risco elevado para CHC,^{104,105} na população desse estudo, a relação observada dos graus de maior siderose hepática 3 e 4 com o grupo HH-HFE ($p=0,026$) sugere concordância com os dados da literatura. Por outro lado, pacientes com cirrose hepática também apresentam maiores graus de siderose tecidual quando comparados aos não cirróticos,^{91,99} portanto, esses dados devem ser cuidadosamente avaliados. Nota-se, no entanto, que nesse estudo, a frequência de cirróticos não diferiu significativamente entre os grupos, o que favorece a hipótese de maior sobrecarga tecidual no grupo HH-HFE.

A associação de maior risco de CHC com a presença de mutações *HFE* ainda necessita de estudos mais definitivos. Alguns autores demonstraram a associação de mutações *HFE* com CHC quando comparados com controles.^{106,107} Pirisi e cols encontraram maior sobrevida em pacientes sem mutações *HFE* em uma coorte de pacientes com carcinoma hepatocelular submetidos a ressecção.¹⁰⁸ Outros estudos, entretanto, não comprovaram essa associação, sendo as frequências alélicas das mutações elevadas com relação aos controles sem nenhum tipo de mutação.^{108,109}

4.5 ANÁLISE DOS MARCADORES SÉRICOS DE SOBRECARGA DE FERRO

Portadores de cirrose hepática apresentam maiores graus de sobrecarga de ferro.^{91,99} No presente estudo, observou-se que a média dos índices séricos de ferritina foi de 1873,6 ng/mL e ST de 78,82% e no grupo de portadores de HH-HFE, a média de ferritina sérica foi de 2676,75 ng/mL e

ST 91,02%. Em se tratando de casuística com 64,8% de portadores de cirrose hepática e elevada frequência de fatores de risco para sobrecarga de ferro, tais resultados correspondem ao esperado. Sendo a ferritina sérica um marcador de gravidade de doença, de se relacionar com a presença de cirrose hepática e HH clinicamente manifesta, a observância de níveis médios acima de 1000 ng/mL no presente estudo vem ao encontro dos relatos prévios.^{110,111}

Alguns relatos sugerem que até 50% das variações nos marcadores bioquímicos de ferro ocorre devido a fatores genéticos.^{66,112} Estudos populacionais demonstraram níveis médios de ST e ferritina significativamente mais elevados em homozigotos quando comparados com outros genótipos *HFE*.^{66,113} No estudo apresentado, os níveis séricos de ST foram maiores nos portadores das mutações C282Y em homozigose ou heterozigotos compostos, quando comparados com portadores de genótipos *HFE* e pacientes com genótipo selvagem. As medianas de ferro e ferritina, embora mais elevadas no primeiro grupo com relação aos demais, não alcançaram significância estatística. Esses resultados podem refletir o comportamento biológico da ferritina: como é uma proteína de fase aguda, seus níveis podem aumentar em diversas doenças não associadas a sobrecarga de ferro, com valores extremamente elevados.¹¹⁴ Da mesma maneira, o ferro sérico está sujeito a variações circadianas e de cofatores como a dieta, o que o torna menos relevante para o diagnóstico de sobrecarga de ferro quando analisado isoladamente.¹¹⁵

Considerando-se a inespecificidade da ferritina sérica e a relevância da ST como o melhor indicador para a presença de genótipos *HFE* diagnósticos de HH, calcularam-se pontos de corte, a fim de se predizer o diagnóstico de HH-*HFE*, dos indicadores sanguíneos de sobrecarga de ferro.^{90,116} Os valores encontrados foram acentuadamente elevados com relação ao ponto de corte atualmente definido para diagnóstico de sobrecarga de ferro e que servem de base para a solicitação das mutações *HFE*.^{77,117,118} Tais resultados mantiveram-se mesmo após a exclusão de pacientes caracterizados como portadores de provável HH não relacionada

ao gene *HFE* e são concordantes com as recomendações de Brissot et al, que definem como maior probabilidade do diagnóstico de HH em pacientes com sintomas relacionados a sobrecarga de ferro e ST > 80%.¹¹⁹

Moodie e cols,⁹⁰ analisaram 427 pacientes com doença hepática e testaram o genótipo *HFE* independente dos níveis séricos de ferro. ST acima de 60% teve sensibilidade, especificidade, VPP e VPN nesta população de 91%, 93%, 31,3% e 99,6% respectivamente. O ferro sérico teve menor especificidade, 73%, porém elevado VPN 99%, enquanto a ferritina apresentou sensibilidade e especificidade de 73% e 70%. A ST consagrou-se como o marcador de melhor acurácia para o diagnóstico de HH-*HFE*, como demonstrado pela área sob a curva ROC.

Poullis et al⁹² em análise de portadores de doença hepática genotipados para mutações *HFE* quando ST > 45% observaram, à semelhança do encontrado nesse estudo, que os níveis medianos de ST foram maiores nos portadores de homozigose para C282Y e heterozigotos compostos quando comparados a outros genótipos *HFE* e pacientes com genótipo selvagem. Observaram também que, para níveis de ST maiores que 50%, a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram de 92,3%, 89,3%, 24% e 99%, respectivamente. Quando o ponto de corte era elevado para 60%, a sensibilidade era mantida e aumentava-se a especificidade, 93,4%.

Nesse estudo, os elevados pontos de corte verificados para a ST e ferritina, quando comparados aos obtidos nos referidos trabalhos, podem ser justificados pelo maior percentual de doentes hepáticos selecionados, com predomínio de doença avançada. Como sugerido por Nichols,⁹¹ a CTLF em hepatopatias por ser reduzida, devido a menor produção de transferrina e a aumento do ferro sérico. Isto torna a ST marcador menos acurado para o diagnóstico de sobrecarga de ferro. De fato, ele demonstrou menor sensibilidade e especificidade da ST para detecção dos homozigotos C282Y à medida que os portadores de doença hepática apresentavam menores valores de CTLF. Os achados do presente estudo, em parte, são

concordantes. Dado que os portadores de doença hepática podem cursar com menor CTLF, torna-se plausível o encontro de níveis de ST maiores com relação aos estudos publicados em portadores de hepatopatia. Provavelmente a estratificação dos grupos de acordo com a gravidade da doença hepática e níveis de ST poderia responder a esta questão, entretanto esse estudo não se direcionou a este quesito.

O ponto de corte para a ST permaneceu elevado mesmo após a exclusão de pacientes com HH não-HFE. Houve, no entanto, aumento da especificidade da ST que confirmou a sua acurácia em predizer o diagnóstico de HH-HFE pela maior área sob a curva quando comparada com os demais marcadores séricos de sobrecarga de ferro. Além disto, a ST permaneceu como a variável de maior associação com as mutações HFE (C282Y/C282Y ou C282Y/H63D) na análise de regressão múltipla.

Como já dito anteriormente, a ferritina sérica é marcador de doença avançada e correlaciona-se bem com cirrose hepática quando acima de 1000 ng/mL. Nesse estudo, com população heterogênea de doentes hepáticos, nos quais apenas 30% dos homozigotos não eram livres de outros fatores para sobrecarga de ferro, o ponto de corte para a ferritina, também elevado com relação aos relatos da literatura, pode ter essa explicação. Observou-se, entretanto, maior especificidade da ferritina quando comparada com os resultados da literatura, o que pode estar relacionado com o fato de o valor de corte encontrado ser extraordinariamente elevado (2685 ng/mL). A ferritina, no entanto, apresenta menor sensibilidade com este ponto de corte e menor acurácia, quando comparada a ST, para o diagnóstico de HH-HFE.

Esses achados devem ser interpretados com cautela, pois refletem a análise de pacientes com doença sintomática em um estudo de corte transversal, e requer validação dos seus resultados em estudos prospectivos, com maior número de participantes. Além disso, a variabilidade nos níveis séricos de marcadores bioquímicos de ferro pode estar associada a mutações e pleiotropismos em “SNPs” (*single nucleotide*

polymorphisms)”⁶⁶ em outros genes relacionados ao metabolismo do ferro e essas questões devem ser cuidadosamente consideradas ao se analisar os perfis bioquímicos de portadores de sobrecarga de ferro.

Há de se considerar que os valores apresentados nesse estudo sugerem um possível guia para o clínico sobre qual o melhor momento de se pesquisar as mutações *HFE* em um universo de pacientes hepatopatas com diversos fatores de risco para o desenvolvimento de sobrecarga de ferro. É importante ressaltar, entretanto, que esta orientação deve ser considerada em pacientes com doença avançada já estabelecida, quando se faz o necessário o controle de danos, tratamento das complicações reversíveis, a prevenção de outras ainda não desenvolvidas e o rastreamento familiar.

Deve-se ter em mente que os pontos de corte para sobrecarga sanguínea de ferro na população geral são menores do que os apresentados no presente estudo, uma vez que objetivam o diagnóstico precoce, quando a intervenção terapêutica é mais eficaz na prevenção das lesões de órgãos-alvo e da morbimortalidade associada a essa doença.

4.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Antes da descoberta do gene *HFE*, muitos dos casos de sobrecarga de ferro antes atribuídos à doença hemocromatose hereditária eram secundários a fatores de risco que podem levar a quadros similares às formas genéticas e fenotipicamente indistinguíveis da HH. Atualmente, o diagnóstico de HH deve ser fundamentado, sobretudo, na presença de genótipo compatível, naqueles pacientes que apresentam sobrecarga de ferro ou sinais e sintomas da doença.

O rastreamento genético populacional não é recomendado, devido ao alto custo dispendido para o diagnóstico de uma doença cuja presença de genótipos não determina, com 100% de certeza, o desenvolvimento da

enfermidade. Além disso, essa abordagem poderia trazer importantes prejuízos psíquicos aos portadores da mutação, que poderiam sofrer estigmas de uma doença que talvez nunca viessem a desenvolver. Assim, recomenda-se realizar a pesquisa das mutações *HFE* apenas nas populações de risco, como em parentes de primeiro grau dos casos-índice, em portadores de porfiria cutânea tardia e em portadores de hepatopatia crônica com sobrecarga de ferro, pré-selecionados com saturação de transferrina elevada.

O consenso do grupo europeu, EASL,⁴⁴ em sua última revisão, especifica que apenas portadores de doença hepática de etiologia indefinida e com sobrecarga de ferro devam ser genotipados para as mutações *HFE*, enquanto no consenso anterior de 2000, recomendava-se que fosse aplicada em todos os portadores de hepatopatia com sobrecarga de ferro. Essa mudança tem o lado positivo de não se pesquisar as mutações *HFE* em diferentes doenças hepáticas, que, por exemplo, em fases agudas, quando se observa lesão do hepatócito com importante liberação de ferro na circulação, levando a aumento dos níveis de ST. Nesta situação, seguimos o paciente por um período maior de tempo e, com a resolução da doença hepática, há melhora progressiva do perfil de ferro.

Por outro lado, foi partir da recomendação de 2000 que a relação entre doença hepática e sobrecarga de ferro foi melhor estudada. Diversos autores passaram a investigar portadores de hepatopatia crônica associadas a diversas causas e observaram que aqueles com cirrose hepática apresentavam maiores taxas de sobrecarga de ferro. Além disso, também observaram que, ainda que os portadores das mutações *HFE*, especialmente a homozigose C282Y, apresentassem maiores graus de sobrecarga de ferro, diferentes cofatores contribuíam para o desenvolvimento e a gravidade dessa sobrecarga.

A heterozigose composta C282Y/H63D, embora considerada como genótipo definidor de HH por alguns autores, geralmente é associada a

sobrecarga de ferro em menor grau quando comparada àquela induzida pela homozigose C282Y.

Os estudos em portadores de doença hepática com sobrecarga de ferro são poucos na literatura e, em sua maioria, os fatores de risco associados a sobrecarga de ferro são as hepatites virais B e C. A doença hepática gordurosa não alcoólica, em suas diversas formas de expressão, hoje reconhecidamente um fator de elevada prevalência em pacientes com sobrecarga de ferro, não era sistematicamente investigada, assim como outras cofatores como anemia hereditária, doença renal crônica associada, presença de shunts portossistêmicos e outras causas de hepatopatia.

O presente estudo, que analisou retrospectivamente portadores de hepatopatia crônica por diversas causas, teve como um dos pontos-chave, o detalhamento das comorbidades apresentadas pelos pacientes e a caracterização de manifestações clínicas atribuíveis à sobrecarga de ferro. Provavelmente, o aprofundamento nos fatores de risco adquiridos para sobrecarga de ferro poderá revelar taxas maiores dessas comorbidades no universo de portadores de HH, o que possivelmente está subestimado nos estudos atuais.

A evolução dos conhecimentos acerca do metabolismo do ferro também permitiu o reconhecimento de formas peculiares de HH. São quadros genéticos raros, entretanto associados a manifestações graves de sobrecarga de ferro, distintamente do que é observado com as formas hereditárias associadas ao gene *HFE*.

Esses quadros, denominados juvenis, resultados das mutações nos genes *HJV* e *HAMP*, são diagnosticados, em sua maioria, presumidamente, com base no quadro clínico. Em tais formas, predominam as manifestações cardíacas e hipofisárias em indivíduos antes dos 40 anos de idade, com níveis de sobrecarga sanguínea de ferro extraordinariamente elevados. Nesses casos, os fatores de risco adicionais parecem exercer menor influência no desenvolvimento da sobrecarga de ferro quando comparados com os quadros *HFE*. Também são conhecidas outras mutações raras,

como as decorrentes de mutações no gene *TfR2*, que se associam a quadros semelhantes a HH-HFE, e de mutações no gene da ferroportina, que, por sua vez, podem ser causa de hiperferritinemia isolada ou causar manifestações clínicas semelhantes aos quadros de HH-HFE.

Em nosso estudo, seis casos se destacaram pela peculiaridade dos achados clínicos. Três deles apresentaram-se antes dos 35 anos com manifestações clínicas associadas a sobrecarga de ferro, com cardiopatia, hipogonadismo e níveis sanguíneos acentuadamente elevados de ferro, sem mutações *HFE*. Um deles, assintomático, porém com sobrecarga sanguínea e tecidual significativa, foi detectado, aos 24 anos, a partir da sua irmã, caso-índice. A biópsia hepática revelou cirrose e deposição de ferro grau 4. Este indivíduo referiu etilismo importante, com mais de 30 g de álcool diariamente.

Os outros três casos também apresentavam características particulares. Eram portadores de cirrose hepática já no diagnóstico e apresentavam diabetes, hiperpigmentação cutânea e outras manifestações associadas, como hipogonadismo, osteoporose e artropatia, sem mutações *HFE*. Dois deles manifestaram-se antes dos trinta e cinco anos e um após os quarenta. Os níveis de sobrecarga de ferro e tecidual eram consideravelmente acentuados, a sangria foi tolerada e removeu quantidades de ferro superiores a 5 g para a normalização da ferritina. A única comorbidade reconhecida foi a esteatose hepática.

Esses casos, provavelmente associados a causas genéticas de HH não relacionadas ao gene *HFE* foram, a princípio, incluídos no grupo sobrecarga de ferro não-HFE, pela adequação aos critérios de inclusão. Após a caracterização fenotípica, uma segunda análise foi empregada, permitindo a observação que mesmo após a exclusão desses pacientes, os graus de sobrecarga de ferro nos grupos HH-HFE e sobrecarga de ferro não-HH mantiveram-se inalterados, presumindo-se que esse pequeno número de pacientes pouco influenciou nas diferenças obtidas entre os grupos. Esses casos foram responsáveis pela maioria dos valores

discrepantes encontrados nas medianas de ferritina e ferro dos gráficos correspondentes (figuras 14 e 15).

Atualmente, a hepcidina está no centro da fisiopatologia da sobrecarga de ferro. O interesse nas alterações genéticas e nas causas secundárias que culminam com a elevação dos níveis de ferro no organismo são crescentes na literatura. Contribuição importante dos estudos foi o estabelecimento do diagnóstico precoce dos quadros de hemocromatose, o melhor conhecimento acerca da sua história natural e a melhora da sobrevida dos pacientes, com a instituição do tratamento em tempo hábil, antes do desenvolvimento das complicações.

Além disso, o paralelo traçado entre o metabolismo do ferro e da glicose tem apontado para a reposição de hepcidina como terapia para os casos de sobrecarga de ferro. O emprego dessa terapia poderá ser uma alternativa quando a sangria não é tolerada, por exemplo, por cardiopatia ou quando existe aderência irregular do paciente à flebotomia. Os estudos sobre o assunto são precoces e não permitem conclusões definitivas.

À luz dos novos conceitos em HH, o reconhecimento de novas mutações no próprio gene *HFE* e em outros elementos do metabolismo do ferro, além da identificação de fatores de risco para sobrecarga de ferro faz-se cada vez mais necessário para o diagnóstico correto dessa entidade.

O papel das diversas mutações nas proteínas relacionadas a homeostase do ferro necessita ser melhor esclarecido. A identificação das comorbidades associadas, em estudos prospectivos e controlados, pode esclarecer qual a sua real influência no desenvolvimento da sobrecarga de ferro. A importância desses novos estudos está no sentido de se definir quais pacientes devem ser rastreados para causas hereditárias e, portanto, ter um diagnóstico correto e tratamento adequado, bem como ter seus familiares identificados. Dessa forma, a sobrecarga de ferro atribuída exclusivamente a causas secundárias ficará restrita a situações especiais, uma vez que a pesquisa de mutações nos diversos genes envolvidos na produção de proteínas envolvidas no metabolismo do ferro permitirá a

identificação de mutações em dois genes simultaneamente ou a presença de formas em heterozigose simples que poderiam explicar algum grau de sobrecarga de ferro, sem contudo, ter o diagnóstico firmado definitivamente de HH.

5 CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Em pacientes com doença hepática crônica com evidências de sobrecarga de ferro:

- 1) Foram observados maiores graus de sobrecarga de ferro quando eram portadores do genótipo diagnóstico de HH-*HFE*, do que aqueles sem esses marcadores genéticos;
- 2) Foi detectada ampla variabilidade nos marcadores bioquímicos de ferro, principalmente na presença de fatores de risco para sobrecarga de ferro. Os níveis de saturação de transferrina, ferritina e ferro tiveram maior associação com o diagnóstico de hemocromatose hereditária nessa população, porém a saturação de transferrina foi a variável de maior acurácia. Esse estudo, entretanto, sugere que a utilização desses marcadores seja melhor empregada em excluir o diagnóstico de HH-*HFE* nesses pacientes;
- 3) Antes de se diagnosticar hemocromatose hereditária por mutações do gene *HFE* deve-se considerar a presença de fatores de risco para sobrecarga de ferro incluindo a gravidade da doença hepática subjacente;
- 4) O grupo de portadores de hemocromatose hereditária por mutações no gene *HFE* apresentou menores índices de comorbidades, quando comparados com os indivíduos portadores de sobrecarga de ferro não *HFE*.
- 5) O diagnóstico de hemocromatose hereditária por mutações no gene *HFE* associou-se significativamente com artropatia, carcinoma hepatocelular, diabetes mellitus e osteoporose, sendo o carcinoma hepatocelular e a

osteoporose as variáveis com a maior força de associação, estando independentemente associadas a esse diagnóstico;

- 6) A mutação *HFE* C282Y em homozigose ou em heterozigose composta com H63D correlacionou-se com maior chance de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (cinco vezes) quando comparados aos pacientes com genótipo selvagem (sem mutações *HFE*).
- 7) A pesquisa de outros genes relacionados a hemocromatose hereditária não-*HFE* deve ser realizada naqueles casos em que as comorbidades e os genótipos *HFE* encontrados não justifiquem os quadros de sobrecarga de ferro.

6 ANEXOS

ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.05.10, **APROVOU** as mudanças abaixo no Protocolo de Pesquisa nº **1065/05** intitulado: **"HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: ANÁLISE DE GENÓTIPO E CORRELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS E ANÁTOMO-PATOLÓGICOS"**, apresentado pelo Departamento de GASTROENTEROLOGIA.

- Comunicado que o protocolo passará a ter como pesquisadora executante a aluna **ANDRÉIA SILVA EVANGELISTA** e que o protocolo será dissertação de mestrado da mesma.
- Relatório de andamento do estudo datado de 01.03.10

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. EDUARDO LUIZ RACHID CANÇADO**

CAPPesq, 12 de maio de 2010

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA . HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: ANÁLISE DE GENÓTIPO E CORRELAÇÃO COM ASPECTOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS
2. PESQUISADOR: ANDRÉIA SILVA EVANGELISTA.....
CARGO/FUNÇÃO: médica..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº ..78966.....
UNIDADE DO HCFMUSP: DISCIPLINA DE GASTROENTEROLOGIA
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 MESES

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

A hemocromatose hereditária pode ser transmitida de pais para filhos, através dos genes. Como ainda é pouco conhecida, sua colaboração é importante para que nós possamos estudar se alterações nos genes (chamadas mutações) são responsáveis pela sua doença. Para isso, realizaremos uma coleta de 10 ml de sangue, de onde extrairemos o DNA. No laboratório, procuraremos as mutações nos genes da hemocromatose. O único desconforto previsto é a picada no braço para colher sangue. Acreditamos que essa pesquisa possibilite descobrir novos casos na família antes que tenham sintomas e temos a esperança de que aumentaremos nossos conhecimentos sobre a doença.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Todo paciente que participa dessa pesquisa tem direito de perguntar sobre o andamento de nossos estudos, nossos resultados e avanços. Tem também nossa garantia de que os resultados são sigilosos e que seu DNA (que poderá ficar armazenado no laboratório para pesquisas futuras) serão somente utilizados com finalidades bem aceitas pelas normas de ética científica mundiais. Além disso, é livre para retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, pode se recusar a doar seu DNA para esse projeto e isso não lhe trará prejuízos no tratamento que recebe de nossa equipe. Quando houver indicação clínica de realizar biópsia do fígado, a análise de amostras do tecido somará informações; entretanto, nenhuma biópsia será indicada apenas por interesse desta pesquisa. Não há riscos de danos à saúde relacionados a essa pesquisa, uma vez que os dados são basicamente obtidos por revisão de prontuário médico e análise laboratorial do sangue coletado. Nossa equipe assiste aos pacientes que são acompanhados no ambulatórios A2MG-400, 402, 403, 404 e AL-37 em suas intercorrências, de acordo com os recursos que nos são disponíveis nesta instituição.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Ambulatórios: 4. andar sala 11, 5. andar 4B, tel (11)3069-7940 e 3069-6380

Secretaria da Disciplina de Gastroenterologia: tel: (11)3069-6447

Dra. Andréia Silva Evangelista (CRM 121815) e-mail: andreia1179@yahoo.com.br

vi. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES: NENHUMA

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome Legível)

ANEXO C - Protocolo utilizado para o levantamento dos dados**1. IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____ RGHC: _____

Ambulatório: _____ Data de Nascimento: _____

Cor: _____ Procedência: _____

Ascendência: _____ Sexo: _____

Altura: _____ Peso: _____

2. MUTAÇÃO HFE

() C282Y/C282Y () C282Y/H63D () H63D/ H63D

() C282Y/- () H63D/- () Não

Em caso negativo, outra _____

3. DADOS CLÍNICOS**3.1. Primeira manifestação / quadro clínico inicial:**

3.2. Idade ao início dos sintomas:

3.3. História Familiar

() Sim () Não

Outra _____

3.4. Cor da pele alterada: () Sim () Não**3.5. Osteoporose:** () Sim () Não**3.6. Artropatia:** () Sim () Não

Se sim, quais os achados?

3.7. Fígado:

3.7.1. Alteração de enzimas () Sim () Não

3.7.2. Cirrose hepática () Sim () Não

Se sim, descompensação? () Sim () Não

3.7.3. CHC () Sim () Não

ΔT _____

3.8. Cardio:

Alterações no ECG () Sim () Não

Em caso afirmativo, descreva _____

Alterações no Eco () Sim () Não

Em caso afirmativo, descreva _____

3.9. Endócrino:

3.9.1 DM (Anormalidades no metabolismo da glicose: hiperglicemia de jejum $\geq$ 126 ou intolerância à glicose em uso de insulina ou anti-diabéticos orais).

() Sim () Não

Se sim, qual o tipo _____

3.9.2. Tiroidopatia:

() Sim () Não

3.9.3. Hipogonadismo:

() Sim () Não

3.10. Comorbidades:

() Etilismo

tipo de bebida _____ quantidade diária _____ tempo de consumo _____
>60 g/dia ()

() VHB () VHC () esteatose () IRC

() Anemia hereditária _____

() Transfusões sanguíneas _____

() HAS () Dislipidemia () Tabagismo

() Outros _____

4. EXAMES COMPLEMENTARES**Perfil de ferro inicial:****Saturação de ferro:** _____**Fe:** _____**Ferritina:** _____**CTLF:** _____**Transferrina:** _____**Anátomo – patológico**☐ Sim☐ Não**PERLS**☐ 1☐ 2☐ 3☐ 4**Padrão de distribuição (deposição preferencial):**☐ Zona 1☐ Zona 2☐ zona 3☐ Kupffer☐ difuso**Esteatose**☐ grau 0☐ grau 1☐ grau 2☐ grau 3☐ grau 4**Classificação Gayotto****Fibrose**_____ **Atividade Inflamatória periportal**_____**Atividade inflamatória periportal/perisseptal**_____ **Atividade inflamatória lobular**_____**Outros achados Mallory** ☐ **Balonização hepatocitária** ☐ **Glicogênio nucleolar**
☐

REMA:☐ Sim☐ Não

5. TRATAMENTO**Sangria**☐ Sim☐ Não

Se não, por qual motivo? _____

Início (Sangria 1) _____

Histórico sangria

Sangria 2 _____

Sangria 3 _____

Sangria 4 _____

Sangria 5 _____

Complementação sangrias

Evolução:

Normalização da ferritina < 50:

Data: _____

ΔT do início da sangria: _____

Saturação na normalização da FTI _____

6. Tratamento inicial CHC

() Sim () Não

7. Transplante hepático

() Sim () Não

Comentários

Anexo D - Características demográficas e resultados de mutações *HFE*

	Cor	Descendência	Sexo	altura	peso	C282Y	H63D
1	B	Italiana	F	1,5	ND	1(HE)	0
2	B	Italiano	M	1,78	63,2	2(HO)	0
3	B	-	M	1,72	80,3	0	1(HE)
4	B	-	F	-	53,8	0	0
5	A	japonês	M	1,67	70	0	0
6	B	-	M	-	-	0	0
7	B	indígena	F	1,54	50,1	0	0
8	B	-	M	1,71	72	0	1 (HE)
9	P	-	M	1,74	88	0	1(HE)
10	B	-	M	1,65	-	0	0
11	P	-	M	-	-	0	1 (HE)
12	B	-	M	1,81	64,2	0	1(HE)
13	B	-	F	1,56	63	2(HO)	0
14	B	-	F	1,65	64	0	0
15	B	Italiano/Português	M	1,65	56	2(HO)	0
16	B	-	M	1,88	104	0	0
17	B	-	M	-	-	0	1(HE)
18	B	Italiano	M	1,73	88,9	2(HO)	0
19	B	-	M	1,84	72	0	0
20	B	-	M	1,64	84	0	1(HE)
21	B	-	M	1,81	87	0	2(HO)
22	B	-	F	1,63	79	0	0
23	B	indígena	F	1,5	50	0	0
24	B	-	M	-	-	0	0
25	B	-	-	-	-	0	0
26	P	pais mineiros	M	1,78	81	2(HO)	0
27	N	-	F	-	-	0	0
28	B	-	M	-	96	0	0
29	P	-	M	-	-	0	0
30	A	japonês	F	-	-	0	0
31	B	-	F	1,51	51,7	0	0
32	B	-	M	-	-	0	0
33	P	européia	M	78	1,80	0	1(HE)
34	N	afro	M	-	80	0	0
35	P	afro	M	1,59	74,5	0	1 (HE)
36	B	-	M	-	-	0	0

continua

Anexo D - Características demográficas e resultados de mutações *HFE*
(continuação)

	Cor	Descendência	Sexo	altura	peso	C282Y	H63D
37	B	boliviano	M	ND	ND	0	HO
38	B	Portuguesa	M	1,67	64	0	1(HE)
39	P	-	M	-	-	0	1(HE)
40	B	-	F	-	68	1(HE)	1(HE)
41	B	Portuguesa	M	1,6	70	2(HO)	0
42	A	chinês	M	1,7	-	0	0
43	N	-	M	1,67	78	0	1(HE)
44	B	-	M	1,62	65	0	0
45	N	-	M	1,73	58	0	0
46	B	-	M	-	-	0	0
47	B	-	M	1,75	78	2(HO)	0
48	B	-	M	1,58	82,7	0	0
49	B	-	M	1,72	83	0	0
50	B	"européia"	M	1,76	81	0	2(HO)
51	P	mineira/índio	M	1,69	77	2(HO)	0
52	N	-	F	-	-	0	1(HE)
53	B	-	M	-	-	0	0
54	A	japonês	M	-	-	0	0
55	B	Portuguesa	M	1,59	77	1(HE)	0
56	P	Italiana	M	1,80	80	1(HE)	0
57	B	Portuguesa	M	1,7	75	0	1(HE)
58	B	-	M	-	-	0	0
59	B	-	M	1,75	80	0	1(HE)
60	B	-	M	1,64	71	0	1(HE)
61	B	Portuguesa	M	1,78	110	1(HE)	0
62	P	-	M	1,62	71	0	0
63	B	Portuguesa	M	1,70	75	0	1(HE)
64	B	-	M	1,59	60	2(HO)	0
65	P	-	M	1,73	75,8	0	0
66	N	AFRO	F	1,55	57,6	0	1(HE)
67	B	-	M	1,8	104	1(HE)	0
68	B	Italiana	M	1,65	65	0	1(HE)
69	B	-	F	1,6	-	0	0
70	B	-	F	-	96	0	1(HE)
71	N	-	F	1,5	56	0	0
72	B	-	F	1,52	53,5	0	0

continua

Anexo D - Características demográficas e resultados de mutações *HFE*
(conclusão)

	Cor	Descendência	Sexo	altura	peso	C282Y	H63D
73	B	-	F	-	-	1(HE)	1(HE)
74	B	-	F	1,53	74,7	0	1(HE)
75	P	-	F	1,63	61	2(HO)	0
76	B	-	F	-	-	0	1(HE)
77	B	-	M	-	-	0	0
78	P	-	M	1,65	65	0	0
79	B	-	M	1,78	66	0	0
80	B	-	M	1,8	113	0	0
81	B	-	M	1,66	83	0	0
82	B	Italiana	M	1,83	100	1(HE)	0
83	N	afro	M	1,62	51,6	2(HO)	0
84	B	-	M	-	-	0	0
85	B	-	M	1,67	65	0	0
86	B	-	M	-	-	0	0
87	P	-	M	1,66	79	0	0
88	B	-	M	1,75	80	0	0
89	B	-	M	1,63	73,6	1(HE)	0
90	B	-	M	1,72	82	0	0
91	P	Espanhola/holandesa	M	1,73	74	2(HO)	0
92	P	-	M	-	-	0	1(HE)
93	B	-	M	-	-	0	0
94	B	Italiana	M		83,9	2(HO)	0
95	B	-	M	1,88	65	0	0
96	B	-	M	1,65	65	1(HE)	1(HE)
97	P	-	M	-	-	0	0
98	B	-	M	-	-	0	1(HE)
99	N	-	M	1,53	46,75	0	0
100	B	-	M	-	-	0	2(HO)
101	B	-	M	1,72	90	0	1(HE)
102	B	-	M	-	72,9	0	0
103	P	-	F	-	-	0	1(HE)
104	B	-	M	-	58,3	0	0
105	B	-	F	1,51	74,7	0	0
106	P	indígena	M			0	0
107	B	-	M	1,75	90	0	1(HE)
108	B	-	F	-	-	0	0

Anexo E - Aspectos laboratoriais e graus de siderose hepática

	AST	ALT	BT	BD	Saturação Fe	Ferritina mg/dL	Fe (mcg/dL)	CTLF (mcg/dL)	Trans- ferrina (mg/dL)	siderose
1	47	34	1,9	0,4	84%	2721	183	216	200	2
2	51	46	0,99	0,28	98,71%	4928	229	231	200	-
3	97	82	2,5	1,8	94,77%	645	163	172	130	-
4	136	300	2,63	1,23	72,06%	936	196	272	250	-
5	84	95	2,1	1,8	97,0%	1483	97	98	80	3
6	98	26	2,6	0,9	91,50%	2178	174	153	150	3
7	89	128	1,0	0,2	100%	8069	179,6	NR	147	-
8	16	20	0,6	0,2	96,00%	1065	339	351	280	2
9	86	47	6,2	2,8	97,0%	651	222	228	180	0
10	40	44	1,66	0,67	96,14%	537	118	259	220	0
11	51	54	1,79	0,64	72,32%	635	107	224	NR	2
12	25	30	0,94	0,35	67,69%	496	176	260	210	1
13	124	113	0,8	0,3	98,0%	3408	195	200	210	3
14	143	123	0,8	0,2	53,13%	520	119	224	200	1
15	62	76	1,01	0,28	93,0%	5401	160	172	130	4
16	223	89	17,52	11,74	97,97%	2323	193	197	NR	-
17	43	33	4,5	1,9	90,72%	1081	176	194	160	-
18	40	27	-	-	96,48%	3931	192	199	170	4
19	134	103	6,3	3,5	53,49%	366	92	172	130	1
20	66	89	1,4	0,6	69,28%	1387	230	332	290	2
21	34	64	1,38	0,29	93,06%	577	228	223	210	1
22	57	28	1,17	0,42	46,64%	596	132	283	240	0
23	78	96	0,64	0,22	58,15%	1507	157	270	-	1
24	116	59	2,56	1,34	90,22%	1300	203	225	180	-
25	56	93	0,64	0,22	48,28%	1407	183	379	320	1
26	81	79	1,57	0,44	98,89%	4316	267	270	220	4
27	41	46	1,87	0,63	50,0%	775	130	260	210	-
28	44	74	0,58	0,17	57,84%	380	177	306	260	2
29	60	16	8,0	0,8	58,74%	1665	84	143	120	-
30	121	261	6,84	4,07	107,59%	1562	156	159	120	-
31	156	209	1,3	0,5	70,22%	3977	158	225	180	-
32	63	59	1,75	0,6	82,82%	1435	241	291	220	-
33	60	107	1,02	0,08	94,0%	3000	346	ND	ND	4
34	63	103	0,9	0,2	45%	643	150	336	270	0
35	164	75	3,43	1,36	96%	2239	175	182	150	3
36	202	75	19,3	17,57	75,63%	2095	121	160	ND	0

continua

Anexo E - Aspectos laboratoriais e graus de siderose hepática (continuação)

	AST	ALT	BT	BD	Saturação Fe	Ferritina mg/dL	Fe (mcg/dL)	CTLF (mcg/dL)	Trans- ferrina (mg/dL)	siderose
37	137	261	0,9	0,3	49,81%	1192	96	267	220	0
38	93	85	0,6	0,15	97,8%	7357	223	228	180	4
39	39	69	2,7	0,4	45,0%	693	117	260	-	-
40	52	61	-	-	64,50%	1288	178	-	-	-
41	23	30	0,6	0,1	82,0%	711	185	226	-	3
42	46	78	0,9	0,2	96,89%	490	218	225	190	0
43	115	52	8,0	4,0	93,53%	2309	202	232	-	-
44	35	29	6,5	1,15	76,36%	1044	168	220	170	-
45	92	87	-	-	91,74%	1678	200	218	-	4
46	38	26	1,6	0,45	64,29%	439	189	294	230	0
47	36	40	0,8	0,2	96,0%	1380	234,8	245,4	-	3
48	77	76	0,5	0,21	66,23%	2219	202	314	-	2
49	41	34	3,0	2,0	75,25%	1147	79	105	80	-
50	102	84	6,75	1,62	99,47%	2912	189	192	170	4
51	15	20	0,6	0,1	89,00%	578	179	202	-	3
52	186	94	13,4	9,3	70,19%	1301	113	161	110	-
53	97	150	1,08	0,3	74,89%	1642	167	223	190	2
54	36	51	-	-	74,46%	1849	137	184	160	4
55	33	49	0,9	0,29	61,63%	1075	151	245	230	2
56	70	127	0,6	0,2	80,7%	2324	192	238	145	4
57	31	69	0,77	0,33	72,0%	1534	219	306	-	3
58	183	57	0,39	0,18	89,47%	1913	221	247	190	3
59	65	77	0,9	0,36	56,86%	511	199	350	-	1
60	638	780	11,4	5,8	66,67%	6322	154	231	200	-
61	63	161	1,2	0,2	97,0%	726	216	224	-	3
62	30	43	1,12	0,28	61,22%	1107	161	263	200	-
63	31	69	0,77	0,33	71,57%	1534	219	306	240	3
64	47	41	0,36	0,1	96,93%	1383	221	228	190	3
65	141	186	1,3	0,4	68,28%	1281	282	413	-	0
66	45	36	0,7	0,3	57,31%	478	192	335	270	0
67	36	70	1,2	0,3	58,0%	844	142	245	270	3
68	18	16	0,8	0,2	53,0%	668	151	286	284	3
69	92	87	1,34	0,49	71,37%	1388	182	223	220	-
70	435	364	5,3	3,2	71,92%	1755	146	203	180	1
71	68	43	1,56	0,47	98,35%	1553	179	170	180	4
72	112	50	2,36	1,14	96,51%	3518	166	172	140	

continua

Anexo E - Aspectos laboratoriais e graus de siderose hepática (conclusão)

	AST	ALT	BT	BD	Saturação Fe	Ferritina mg/dL	Fe (mcg/dL)	CTLF (mcg/dL)	Trans- ferrina (mg/dL)	siderose
73	155	29	3,26	0,01	98,67%	1100	234	225	200	-
74	57	81	0,8	0,44	98,89%	2021	255	270	220	-
75	35	24	1,07	0,45	82,11%	792	202	246	170	-
76	100	46	3,7	2,13	96,85%	1355	123	127	110	-
77	122	129	6,2	5,7	98,95%	779	283	286	240	0
78	108	106	0,8	0,2	96%	10980	233	243	-	4
79	181	336	0,49	0,19	55,83%	1672	182	326	-	-
80	89	63	3,67	1,75	98,31%	2074	174	177	-	-
81	52	71	2,0	0,4	58,74%	1527	205	349	310	-
82	31	57	0,6	0,16	47,0%	519	136	286	240	0
83	48	51	1,11	0,36	98,70%	2685	227	230	190	-
84	122	62	1,1	0,5	84,52%	694	273	323	280	-
85	139	48	2,7	1,5	99,46%	1072	185	188	150	-
86	52	67	1,37	0,47	52,58%	482	153	291	-	1
87	70	126	0,9	0,7	60,00%	538	191	321	270	0
88	115	63	2,4	1,3	97,87%	700	184	188	150	-
89	133	112	0,98	0,38	78,09%	555	196	251	220	1
90	103	56	12,5	8,9	94,55%	946	166	202	160	-
91	29	20	0,5	0,2	97%	6000	-	-	-	-
92	286	128	1,2	0,4	48,92%	422	181	370	290	0
93	113	123	0,66	0,26	64,78%	1321	149	230	190	-
94	55	68	0,8	0,1	98,84%	4438	255	258	210	4
95	30	55	1,0	0,3	50,99%	486	154	302	-	0
96	65	117	0,58	0,44	67,47%	489	231	280	230	2
97	85	92	1,5	0,8	82,49%	1441	212	257	230	2
98	70	103	2	0,5	98,89%	2517	267	584	230	-
99	172	195	1,35	0,36	99,20%	8545	189	194	150	-
100	104	112	2,38	0,73	65,68%	1116	222	338	280	-
101	133	163	0,5	0,2	64,01%	1645	297	464	NR	0
102	197	146	27,1	18,2	94,74%	2179	180	190	160	2
103	81	45	1,1	0,4	67,21%	1362	207	308	260	-
104	187	93	9,7	5,76	90,91%	728	170	187	150	2
105	48	47	0,93	0,29	72,50%	508	203	280	250	1
106	74	124	-	-	96,9%	4202	278	287	230	4
107	359	354	1,44	0,78	65,43%	3442	212	324	290	1
108	31	34	2,95	1,25	61,78%	645	118	191	140	0

Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas a HH (parte I)

	Cor da pele alterada	Osteoporose	Artropatia	Alteração de enzimas	Cirrose hepática	Descompensação de CH	CHC
1	não	não	não	Sim	Sim	Não	Não
2	Não	Sim	Sim	não	Sim	Não	Não
3	Não	não	não	Sim	Sim	sim	Não
4	ND	ND	ND	Sim	ND	ND	ND
5	Não	ND	não	Sim	Sim	sim	Não
6	Não	ND	não	Sim	Sim	sim	Não
7	sim	sim	não	sim	sim	não	não
8	sim	ND	não	não	não	NA	Não
9	Não	ND	não	não	Sim	sim	Não
10	Não	ND	não	não	sim	sim	não
11	Não	não	não	não	Sim	Não	Não
12	Não	ND	não	não	Sim	Não	Não
13	ND	ND	não	Sim	Sim	Não	Não
14	ND	ND	ND	Sim	não	Não	Não
15	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
16	ND	ND	não	Sim	Sim	sim	Não
17	ND	ND	ND	não	sim	sim	não
18	Não	Sim	Sim	não	Sim	sim	Sim
19	Não	Sim	não	Sim	Sim	sim	Não
20	não	ND	ND	Sim	Sim	Não	Não
21	Não	não	não	não	não	não	não
22	Não	não	não	Sim	Sim	Não	Não
23	Não	Sim	não	Sim	não	NA	Não
24	Não	não	não	Sim	Sim	sim	Sim
25	ND	ND	ND	Sim	não	ND	ND
26	sim	sim	não	sim	sim	não	sim
27	sim	ND	ND	não	não	NA	Não
28	Não	ND	não	Sim	não	NA	Não
29	ND	ND	ND	Sim	não	ND	Não
30	Não	não	não	Sim	Sim	sim	Sim
31	ND	ND	ND	Sim	Sim	Não	Não
32	Não	ND	ND	Sim	Sim	Não	Não
33	não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
34	sim	não	não	Sim	não	NA	Não
35	não	não	não	sim	sim	sim	não
36	ND	ND	ND	sim	sim	sim	sim

continua

Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas a HH (parte I) (continuação)

	Cor da pele alterada	Osteoporose	Artropatia	Alteração de enzimas	Cirrose hepática	Descompensação de CH	CHC
37	sim	ND	sim	sim	não	NA	não
38	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
39	não	não	não	sim	não	NA	não
40	ND	ND	sim	sim	não	não	não
41	não	não	não	não	não	não	não
42	não	ND	ND	sim	sim	não	não
43	não	ND	ND	sim	sim	sim	não
44	ND	ND	ND	não	sim	não	não
45	não	ND	ND	sim	não	não	não
46	ND	ND	ND	não	não	NA	não
47	ND	ND	sim	não	não	não	não
48	ND	ND	sim	sim	sim	não	não
49	ND	ND	ND	não	sim	sim	não
50	sim	ND	ND	sim	sim	sim	sim
51	não	não	não	não	não	não	não
52	ND	ND	ND	sim	sim	sim	não
53	ND	ND	ND	sim	sim	não	ND
54	ND	não	não	sim	não	não	não
55	ND	ND	ND	não	sim	não	não
56	não	ND	não	sim	não	não	não
57	não	ND	não	sim	não	não	não
58	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
59	não	não	ND	sim	não	não	não
60	ND	ND	ND	sim	não	não	não
61	não	não	não	sim	não	não	não
62	ND	ND	ND	não	sim	não	não
63	não	ND	não	sim	não	NA	não
64	sim	sim	não	não	sim	não	sim
65	ND	ND	ND	sim	sim	sim	não
66	sim	ND	ND	Sim	não	NA	Não
67	não	ND	não	sim	não	não	não
68	não	sim	não	não	não	não	não
69	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
70	não	sim	sim	sim	sim	sim	não
71	ND	ND	ND	sim	não	ND	não
72	não	ND	ND	sim	sim	sim	ND

continua

Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas a HH (parte I) (conclusão)

	Cor da pele alterada	Osteoporose	Artropatia	Alteração de enzimas	Cirrose hepática	Descompensação de CH	CHC
73	ND	ND	ND	sim	sim	sim	não
74	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
75	ND	sim	ND	não	sim	não	sim
76	não	ND	não	sim	sim	sim	não
77	ND	ND	ND	sim	sim	sim	não
78	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
79	ND	ND	ND	sim	não	ND	ND
80	ND	ND	ND	sim	sim	sim	não
81	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
82	não	ND	não	sim	não	NA	não
83	sim	sim	não	sim	sim	sim	não
84	ND	ND	ND	sim	não	NA	não
85	ND	ND	ND	sim	sim	sim	não
86	sim	não	não	sim	não	não	não
87	ND	ND	ND	sim	não	NA	não
88	não	ND	ND	sim	sim	sim	não
89	ND	ND	ND	sim	sim	não	sim
90	ND	ND	ND	sim	sim	sim	não
91	sim	não	sim	não	sim	sim	não
92	sim	ND	ND	sim	não	NA	não
93	sim	ND	ND	sim	não	ND	ND
94	não	sim	sim	não	sim	não	não
95	não	não	não	sim	não	não	não
96	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
97	sim	não	não	sim	não	ND	não
98	não	não	não	Sim	sim	não	não
99	sim	ND	ND	sim	sim	não	não
100	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
101	ND	ND	ND	sim	sim	ND	ND
102	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
103	não	não	não	sim	sim	não	não
104	não	ND	não	sim	sim	sim	não
105	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
106	sim	não	não	Sim	Sim	Não	Não
107	ND	ND	ND	sim	sim	não	não
108	não	sim	sim	não	sim	não	sim

Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas a HH (parte II)

	ECG Alterações	ECO Alterações	DM	Tiroidopatia	Hipogonadismo
1	Sim	Sim	Sim	Não	não
2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
3	não	não	Sim	Não	ND
4	ND	ND	ND	Não	ND
5	não	sim	sim	não	ND
6	Sim	não	não	Não	ND
7	sim	sim	não	sim	sim
8	Sim	ND	não	sim	não
9	ND	Sim	Sim	Não	ND
10	ND	sim	não	Não	ND
11	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
12	não	ND	Sim	Não	não
13	não	não	não	sim	ND
14	ND	ND	não	Não	ND
15	Não	Sim	Sim	Não	Não
16	Sim	Sim	não	Não	não
17	sim	sim	não	não	ND
18	não	Sim	Sim	Não	não
19	ND	ND	não	Não	não
20	ND	ND	sim	não	não
21	Sim	não	sim	não	não
22	não	não	Sim	Não	não
23	ND	ND	não	Não	não
24	ND	ND	não	Não	não
25	ND	ND	não	Não	ND
26	não	sim	sim	sim	não
27	não	não	não	sim	não
28	ND	ND	Sim	sim	ND
29	ND	Sim	não	Não	ND
30	não	Sim	não	Não	não
31	ND	ND	não	Não	não
32	ND	ND	não	Não	não
33	Não	não	Sim	não	Sim
34	ND	ND	ND	Não	não
35	ND	ND	sim	sim	não
36	não	não	sim	não	ND

continua

Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas a HH (parte II) (continuação)

	ECG Alterações	ECO Alterações	DM	Tiroidopatia	Hipogonadismo
37	ND	ND	não	não	sim
38	sim	sim	sim	não	sim
39	ND	ND	não	não	não
40	sim	sim	sim	nao	ND
41	não	não	não	não	não
42	ND	ND	não	não	não
43	sim	sim	não	não	ND
44	ND	ND	não	não	não
45	ND	sim	não	não	ND
46	ND	ND	não	não	não
47	não	não	não	não	não
48	ND	ND	sim	não	ND
49	sim	sim	não	sim	não
50	sim	sim	não	não	sim
51	sim	não	não	não	não
52	sim	ND	sim	não	ND
53	ND	ND	sim	Não	ND
54	não	não	não	não	não
55	ND	ND	não	não	não
56	não	não	não	não	não
57	não	não	não	não	não
58	ND	ND	sim	ND	ND
59	ND	ND	não	sim	não
60	sim	sim	não	não	não
61	não	não	não	não	não
62	ND	ND	não	não	ND
63	ND	ND	não	não	não
64	não	sim	sim	não	sim
65	ND	ND	não	não	ND
66	ND	ND	sim	ND	ND
67	ND	não	não	não	não
68	não	não	não	não	não
69	ND	ND	não	não	ND
70	não	sim	sim	não	não
71	sim	sim	não	sim	não
72	não	sim	não	não	não

continua

Anexo F - Manifestações clínicas relacionadas a HH (parte II) (conclusão)

	ECG Alterações	ECO Alterações	DM	Tiroidopatia	Hipogonadismo
73	ND	ND	não	não	não
74	sim	não	sim	não	ND
75	sim	não	sim	não	não
76	sim	não	não	não	não
77	ND	ND	não	não	não
78	ND	sim	sim	não	sim
79	ND	ND	não	não	ND
80	ND	ND	não	não	não
81	ND	ND	sim	sim	ND
82	não	sim	não	não	não
83	não	não	sim	não	sim
84	sim	ND	sim	não	ND
85	ND	ND	sim	ND	ND
86	ND	ND	não	não	não
87	ND	ND	não	não	não
88	ND	ND	não	não	ND
89	ND	ND	não	não	ND
90	não	não	não	não	ND
91	não	sim	não	sim	sim
92	ND	ND	não	não	não
93	ND	ND	não	ND	ND
94	não	sim	sim	sim	sim
95	ND	ND	não	não	não
96	ND	ND	não	não	ND
97	ND	ND	não	não	não
98	não	não	sim	não	não
99	sim	sim	sim	sim	sim
100	ND	ND	não	não	não
101	ND	ND	não	não	não
102	ND	ND	não	não	não
103	ND	ND	não	não	não
104	sim	sim	não	não	não
105	sim	ND	não	não	não
106	não	não	não	Não	Não
107	ND	ND	não	não	não
108	não	sim	não	não	sim

Anexo G - Principais comorbidades encontradas nos pacientes

	VHC	VHB	HIV	Etilismo	Esteatose	IRC	Anemia hereditária	Transfusões sanguíneas	HAS	Dislipidemia
1	sim	não	não	não	sim	não	sim	sim	sim	não
2	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
3	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
4	não	não	não	não	não	não	talassemia	não	não	não
5	sim	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
6	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
7	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
8	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
9	não	não	não	sim	sim	não	não	não	sim	não
10	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não
11	não	não	não	sim	não	não	não	não	sim	não
12	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	sim
13	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não
14	não	não	não	não	sim	não	traço talassêmico	não	sim	sim
15	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
16	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não
17	não	não	não	sim						
18	não	não	não	não	não	não	não	não	sim	sim
19	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
20	sim	não	não	não		não	não	não	sim	ND
21	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
22	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	não
23	sim	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
24	sim	não	não	sim	não	não	não	não	não	não
25	sim	não	não	não	sim	não	não	não	ND	ND
26	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
27	não	não	não	não	não	não	não	não	ND	não
28	não	não	não	não	sim	não	não	não	ND	sim
29	não	não	não	não		sim	sim	sim	não	não
30	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	não
31	não	não	não	não	não	sim	não	não	sim	não
32	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	sim
33	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
34	sim	não	não	sim	não	não	não	não	sim	ND
35	não	não	não	sim		não	não	não		sim
36	não	não	não	não	não	não	não	não	não	sim

continua

Anexo G - Principais comorbidades encontradas nos pacientes
(continuação)

	VHC	VHB	HIV	Etilismo	Esteatose	IRC	Anemia hereditária	Transfusões sanguíneas	HAS	Dislipi- demia
37	não	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
38	não	não	não	não	não	não	não	não	sim	sim
39	não	não	não	sim	sim	não	sim	não	sim	não
40	não	não	não	não	sim	no	não	não	sim	não
41	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	não
42	não	sim	não	não	sim	não	não	não	não	não
43	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não
44	não	não	não	não	não	não	não	não	sim	não
45	não	não	não	não	não	não	sim	não	não	não
46	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não
47	não	não	não	não	não	não	não	não	não	ND
48	não	não	não	sim	não	não	não	não	sim	sim
49	não	não	não	não	não	não	não	não	sim	não
50	não	não	não	sim	não	não	não	não	sim	não
51	não	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
52	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
53	não	não	não	não	sim	não	não	ND	sim	não
54	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
55	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	sim
56	não	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
57	não	não	não	sim	sim	não	não	não	sim	não
58	não	não	não	sim		não	não	não	não	não
59	sim	não	não	sim	não	não	não	não	sim	não
60	não	não	não	não	não	não	não	não	sim	não
61	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	sim
62	sim	não	não	não	não	não	não	não	sim	não
63	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	não
64	não	não	não	sim	não	não	não	não	sim	não
65	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não
66	sim	não	não	não	não	não	não	não	sim	não
67	não	não	não	não	sim	não	sim	não	sim	não
68	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
69			não	não	não	não	não	ND	não	sim
70	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	sim
71	sim	não	não	não	não	não	sim	sim	não	não
72	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não

continua

Anexo G - Principais comorbidades encontradas nos pacientes (conclusão)

	VHC	VHB	HIV	Etilismo	Esteatose	IRC	Anemia hereditária	Transfusões sanguíneas	HAS	Dislipidemia
73	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
74			não	não	sim	não	não	não	sim	sim
75	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
76	não	não	não	não		não	não	não	não	não
77	não	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
78	não	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
79	sim	não	não	não		ND	não	não	não	não
80	não	não	não	sim	não	não	não	não	sim	não
81	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	sim
82	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	sim
83	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não
84	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	sim
85	sim	não	não	não	não	não	não	não	sim	não
86	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não
87	não	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
88	sim	não	não	sim	não	não	não	não	sim	não
89	sim	não	não	sim	sim	não	não	não	sim	não
90	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
91	não	não	não	não	não	não	não	não	sim	não
92	sim	não	sim	não	não	não	não	não	ND	não
93	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não
94	não	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
95	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não
96	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
97	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não
98	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não
99	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
100	sim	não	não	sim	não	não	não	não	não	não
101			não	não	não	não	não	não	não	não
102	não	não	não	sim	sim	não	não	não	sim	não
103	sim		não	não	não	não	não	não	não	não
104	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
105	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	sim
106	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não
107	sim	não	não	sim	não	não	não	não	não	sim
108	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não

7 REFERÊNCIAS

1. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med.* 2011; 62: 347-60.
2. Fleming R.E, Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med.* 2012; 366: 348-59.
3. Breuer W, Hershko C, Cabantchik ZI. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci.* 2000; 23: 185-92.
4. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 1999; 341: 1986-95.
5. Gunshin H, Starr CN, Drenzo C, Fleming MD, Jin J, Greer EL, Sellers VM, Galica SM, Andrews NC. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood.* 2005; 106: 2879-83.
6. Graham RM, Chua AC, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. Liver iron transport. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 4725-36.
7. Drake SF, Morgan EH, Herbison CE, Delima R, Graham RM, Chua AC, Leedman PJ, Fleming RE, Bacon BR, Olynyk JK, Trinder D. Iron absorption and hepatic iron uptake are increased in a transferrin receptor 2 (Y245X) mutant mouse model of hemochromatosis type 3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292: 323-8.

8. Graham RM, Reutens GM, Herbison CE, Delima RD, Chua AC, Olynyk JK, Trinder D. Transferrin receptor 2 mediates uptake of transferrin-bound and non-transferrin-bound iron. *J Hepatol.* 2008; 48: 327-34.
9. Fleming RE, Britton RS, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathophysiology of hereditary hemochromatosis. *Semin Liver Dis.* 2005; 25: 411-9.
10. Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1741-4.
11. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol.* 2011; 54: 173-81.
12. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004; 306:2090-3.
13. Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E. The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101: 9263-5.
14. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1271-6.
15. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* 2006; 38: 531-9.

16. Deugnier Y, Brissot P, Loreal O. Iron and the liver: update 2008. *J Hepatol.* 2008; 48 (Suppl 1): 113-23.
17. Babitt JL, Lin HY. The Molecular pathogenesis of hemochromatosis. *Sem Liver Dis.* 2011; 31: 280-92.
18. Caraceni P, Gasbarrini A, Van Thiel DH, Borle AB. Oxygen free radical formation by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation: scavenging effect of albumin. *Am J Physiol.* 1994; 266: 451-8.
19. Siddique A, Kowdley K. Review article: the iron overload syndromes. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 35: 876-93.
20. Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis – A New Look at an Old Disease. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2383-97.
21. Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Gastroenterology.* 2010; 139: 393-408.
22. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NL, Wang RH, Eling TE, Childs R, Ganz T, Leitman SF, Fucharoen S, Miller JL. □High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* 2007; 13: 1096-101.
23. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Seung-Jae Noh, Colleen Byrnes, Ajoy Bhupatiraju, Y. Terry Lee, Julia B. Goodnough, Omid Harandi, Tomas Ganz, Robert F. Paulson and Jeffery L. Miller. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine □and human cells. *Blood.* 2009; 1: 181-6.

24. Valenti L, Pulixi EA, Arosio P, Cremonesi L, Biasiotto G, Dongiovanni P, Maggioni M, Fargion S, Fracanzani AL. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. *Haematologica*. 2007; 92: 1037-42.
25. Corengia C, Galimberti S, Bovo G, Vergani A, Arosio C, Mariani R, Redaelli A, Riva A, Cestari C, Pozzi M, Valsecchi MG, Piperno A. Iron accumulation in chronic hepatitis C: relation of hepatic iron distribution, HFE genotype, and disease course. *Am J Clin Pathol*. 2005; 124: 846-53.
26. Drakesmith H, Prentice A. Hepcidin and the iron-infection axis. *Science*. 2012; 338: 768-72.
27. Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, Tomosugi N, Tanaka H, Takeo M, Iwasa M, Kobayashi Y, Hayashi H, Kaito M, Takei Y. Patients with chronic hepatitis C achieving a sustained virological response to peginterferon and ribavirin therapy recover from impaired hepcidin secretion. *J Hepatol*. 2008; 49: 702-1.
28. Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, Kappert G, Adams O, Donner A, Willers R, Niederau C, Häussinger D. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol*. 2003; 38: 335-42.
29. George DK, Powell LW, Losowsky MS. The haemochromatosis gene: a co-factor for chronic liver diseases? *J Gastroenterol Hepatol*. 1999; 14: 745-9.

-
30. Martinelli AL, Franco RF, Villanova MG, Figueiredo JF, Secaf M, Tavella MH, Ramalho LN, Zucoloto S, Zago MA. Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? *Acta Haematol.* 2000; 102: 152-6.
 31. Silva, ALB. *O papel das mutações do gene HFE e da sobrecarga de ferro na evolução da hepatite crônica pelo VHC* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
 32. Fujita N, Horiike S, Sugimoto R, Tanaka H, Iwasa M, Kobayashi Y, Hasegawa K, Ma N, Kawanishi S, Adachi Y, Kaito M. Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42: 353-62.
 33. Furutani T, Hino K, Okuda M, Gondo T, Nishima S, Kitase A, Korenaga M, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM, Sakaida I, Okita K. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology.* 2006; 130: 2087-98.
 34. Diwakaran HH, Befeler AS, Britton RS, Brunt EM, Bacon BR. Accelerated hepatic fibrosis in patients with combined hereditary hemochromatosis and chronic hepatitis C infection. *J Hepatol.* 2002; 36: 687-91.
 35. Nelson JE, Klintworth J, Kowdley KV. Iron metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012; 14:8-16.
 36. Fujita N, Miyachi H, Tanaka H, Takeo M, Nakagawa N, Kobayashi Y, Iwasa M, Watanabe S, Takei Y. Iron overload is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18: 424-32.

37. Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: A promising therapeutic target. *J Hepatol*. 2011; 55: 920-32.
38. Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K, LeClair P, Cobb J, Lambrecht RW, Banner BF. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 1999; 31: 421-9.
39. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, Jazwinska EC, Powell LW. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology*. 1998; 114: 311-8.
40. Fargion S, Valenti L, Fracanzani AL. Beyond hereditary hemochromatosis: New insights into the relationship between iron overload and chronic liver diseases. *Dig Liver Dis*. 2011 Feb; 43: 89-95.
41. Deguti MM, Sipahi AM, Gayotto LC, Palácios SA, Bittencourt PL, Goldberg AC, Laudanna AA, Carrilho FJ, Cançado EL. Lack of evidence for the pathogenic role of iron and *HFE* gene mutations in Brazilian patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36: 739-45.
42. Bell H, Skinningsrud A, Raknerud N, Try K. Serum ferritin and transferrin saturation in patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Intern Med*. 1994; 236: 315-22.
43. Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, Fein E, Andriopoulos B, Patopoulos K, Gollan J. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress downregulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem*. 2006; 281: 22974-82.

44. European Association for Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol*. 2010; 53: 3-22.
45. Sampietro M, Piperno A, Lupica L, Arosio C, Vergani A, Corbetta N, Malosio I, Mattioli M, Fracanzani AL, Cappellini MD, Fiorelli G, Fargion S. High prevalence of the His63Asp HFE mutation in Italian patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology*. 1998; 27: 181-4.
46. Chemmanur AT, Bonkowsky HL. Hepatic porphyrias: diagnosis and management. *Clin Liver Dis*. 2004; 8: 807-38.
47. Cribier B, Chiaverini C, Dali YN, Schmitt M, Grima M, Hirth C, Lacour JP, Chosidow O. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, uroporphyrinogen decarboxylase and mutations of HFE gene. A case-control study. *Dermatology* (Basel, Switzerland). 2009; 218: 15-21.
48. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Nutr*. 2006; 26: 251-70.
49. Cullen LM, Anderson GJ, Ramm GA, Jazwinska EC, Powell LW. Genetics of hemochromatosis. *Annu Rev Med*. 1999; 50: 87-98.
50. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996; 13: 399-408.
51. Pietrangelo A. Hemochromatosis 1998: is one gene enough? *J Hepatol*. 1998; 29: 502-9.

52. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*. 1999; 30: 20826-32.725. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald MLE, Franchini PL, Dube MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nature Genet*. 2004; 36: 77-82.
53. Park, CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7806-10.
54. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor C C, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest*. 2001; 108: 619-23.
55. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen JWF, Breuning MH, Snijders PJLM, Rutten WPF, Sandkuijl LA, Oostra BA, van Duijn CM, Heutink P. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nature Genet*. 2001; 28: 213-4.
56. De Domenico I, Ward DM, Musci G, Kaplan J. Iron overload due to mutations in ferroportin. *Haematologica*. 2006; 91: 92-5.
57. Gan EK, Powell LW, Olynyk JK. Natural History and management of HFE-hemochromatosis. *Sem Liver Dis*. 2011; 31: 293-301.
58. Pietrangelo A, Caleffi A, Corradini E. Non-HFE hepatic iron overload. *Sem Liver Dis*. 2011; 31: 302-18.

59. Bittencourt PL, Couto CA, Marin MLC, Cançado ELR, Carrilho, FJ. Analysis of HFE and non-HFE gene mutations in brazilian patients with hemochromatosis. *Clinics*. 2009; 64: 837-41.
60. Jazwinska E, Cullen L, Busfield F, Pyper W, webb S, Powell L. Hemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet*. 1996; 14: 249-51.
61. Beutler E. Genetic irony beyond haemochromatosis: clinical effects of HLA-H mutations. *Lancet*. 1997; 349: 296-7.
62. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, Dawkins FW, Acton RT, Harris EL, Gordeuk VR, Leiendecker-Foster C, Speechley M, Snively BM, Holup JL, Thomsom MS, Sholinsky P. Hemochromatosis and Iron-Overload Screening in a Racially Diverse Population. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1769-78.
63. Merrywether-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet*. 1997; 34: 275-8.
64. Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, Bordin S, Soares MC, Menezes RC, Costa FF, Saad ST. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis*. 1999; 25: 324-7.
65. Pereira AC, Mota GF, Krieger JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. *Hum Biol*. 2001; 73:145-51.
66. Rochette J, Le Gac G, Lassoued K, Férec C, Robson KJH. Factors inflencing disease phenotype and penetrance in *HFE* haemochromatosis. *Hum Genet*. 2010; 128: 233-48.

67. Gleeson F, Ryan E, Barrett S, Crowe J. Clinical expression of haemochromatosis mutations in Irish C282Y homozygotes identified through family screening. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 16: 859-63.
68. Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011; 54: 328-43.
69. Brissot P, Bells F. Current approaches to the management of hemochromatosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 36-41.
70. O' Neil J, Powell L. Clinical aspects of hemochromatosis. *Semin Liver Dis*. 2005; 25: 381-91.
71. Chevrant-Breton J, Simon M, Bourel M, Ferrand B. Cutaneous manifestations of idiopathic hemochromatosis. Study of 100 cases. *Arch Dermatol*. 1977; 113: 161-5.
72. Gochee PA, Powell LW. What's new in hemochromatosis. *Curr Opin Hematol*. 2001; 8: 98-104.
73. Hramiak IM, Finegood DT, Adams PC. Factors affecting glucose tolerance in hereditary hemochromatosis. *Clin Invest Med*. 1997; 20: 110-8.
74. Valenti L, Fracanzani AL, Rossi V, Rampini C, Pulixi E, Varenna M, Fargion S, Sinigaglia L. The hand arthropathy of hereditary hemochromatosis is strongly associated with iron overload. *J Rheumatol*. 2008; 35:153-8.

75. Demant AW, Schmiedel A, Buttner R, Lewalter T, Reichel C. Heart failure and malignant ventricular tachyarrhythmias due to hereditary hemochromatosis with iron overload cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol.* 2007; 96: 900-3.
76. Valenti L, Varenna M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S, Sinigaglia L. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int.* 2009; 20: 549-55.
77. Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med.* 1999; 10: 718-24.
78. Falize L, Guillygomarc'h A, Perrin M, Lainé F, Guyader D, Brissot P, Turlin B, Deugnier Y. Reversibility of hepatic fibrosis in treated genetic hemochromatosis: a study of 36 cases. *Hepatology.* 2006; 44: 472-7.
79. Walsh CH, McDermott JH. Hypogonadism in hereditary hemochromatosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 2451-5.
80. Edwards CQ, Kelly TM, Ellwein G, Kushner JP. Thyroid disease in hemochromatosis. Increased incidence in homozygous men. *Arch Intern Med.* 1983; 143: 1890-3.
81. Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2011; 54: 328-43.
82. Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, Vianello L, Zanuso F, Mozzi F, Milani S, Conte D, Colombo M, Sirchia G. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 1-10.

83. Gayotto, LCC, Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *GED*. 2000; 19: 137-40.
84. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2004; 27: S 5-10.
85. Bruix J, Sherman M. Management of Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Hepatology*. 2010; 53: 1020-2.
86. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G→A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *The Lancet*. 2002; 359: 211-8.
87. Deugnier Y, Jouanolle A-M, Chaperon J, Moirand R, Pithois C, Meyer JF, Pouchard M, Lafraise B, Brigand A, Caserio-Schoenemann C, Mosser J, Adams P, Le Gall JY, David V. Gender-specific phenotypic expression and screening strategies in C282Y-linked haemochromatosis: a study of 9396 French people. *Br J Haematol*. 2002; 118: 1170-8.
88. Deugnier Y, Mosser J. Modifying factors of the HFE hemochromatosis phenotype. *Expert Rev of Gastroenterol Hepatol*. 2008; 2: 531-40.
89. Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, McLaren CE, Bahlo M, Nisselle AE, Vulpe CD, Anderson G J, Southey MC, Giles GG, English DR, Hopper JL, Olynyk JK, Powell LW, Gertig DM. Iron-Overload-Related Disease in HFE Hereditary Hemochromatosis. *N Engl J Med*. 2008; 358: 221-30.
90. Moodie SJ, Ang L, Stenner JMC, Finlayson C, Khotari A, Levin G E and Maxwell JD. Testing for haemochromatosis in a liver clinic population: relationship between ethnic origin, HFE gene mutations, liver histology and serum iron markers. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002; 14: 223-9.

91. Nichols L, Dickson G, Phan PG, Kant JA. Iron binding saturation and genotypic testing for hereditary hemochromatosis in patients with liver disease. *Am J Clin Pathol*. 2006; 125: 236-40.
92. Poullis A, Moodie SJ, Ang L, Finlayson CJ, Levin GE, Maxwell JD. Routine transferrin saturation measurement in liver clinic patients increases detection of hereditary haemochromatosis. *Ann Clin Biochem*. 2003; 40: 521-7.
93. Poullis A, Moodie SJ, Maxwell JD. Clinical haemochromatosis in HFE mutation carriers. *Lancet*. 2002; 360: 411-2.
94. Dever JB, Mallory MA, Mallory JE, Wallace D, Kowdley KV. Phenotypic Characteristics and Diagnoses of Patients Referred to an Iron Overload Clinic. *Dig Dis Sci*. 2010; 55: 803-7.
95. Andersen RV, Tybjaerg-Hansen A, Appleyard M, Birgens H, Nordestgaard BG. Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. *Blood*. 2004; 103: 2914-9.
96. Gleeson F, Ryan E, Barrett S, Crowe J. Clinical expression of haemochromatosis in Irish C282Y homozygotes identified through family screening. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 16: 859-63.
97. Asberg A, Hveem K, Kannelonning K, Irgens WO. Penetrance of the C28Y/C282Y genotype of the HFE gene. *Scand J Gastroenterol*. 2007; 42: 1073-7.
98. Wood MJ, Powell LW, Dixon JL, Rann GA. Clinical cofactors and hepatic fibrosis in hereditary hemochromatosis: the role of diabetes mellitus. *Hepatology*. 2012; 56: 904-11.

-
99. Fracanzani, AL, Piperno A, Valenti L, Fraquelli M, Coletti S, Maraschi A, Consonni D, Coviello E, Conte D, Fargion S. Hemochromatosis in Italy in the last 30 years: role of genetic and acquired factors. *Hepatology*. 2010; 51: 501-10.
 100. Hsing AW, McLaughlin JK, Olsen JH, Møller L, Wacholder S, Fraumeni JF Jr. Cancer risk following primary hemochromatosis: a population-based cohort study in Denmark. *Int J Cancer*. 1995; 60: 160-62.
 101. Adams PC. Hepatocellular carcinoma in hereditary hemochromatosis. Observations in 163 patients. *Ann NY Acad Sci*. 1988; 526: 245-57.
 102. Fracanzani AL, Conte D, Fraquelli M, Taioli E, Mattioli M, Losco A, Fargion S. Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron related chronic liver disease. *Hepatology*. 2001; 33: 647-51.
 103. Fargion S, Mandelli C, Piperno A, Cesana B, Fracanzani AL, Fraquelli M, Bianchi PA, Fiorelli G, Conte D. Survival and prognostic factors in 212 Italian patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology*. 1992; 15: 655-59.
 104. vonDelius S., Lersch C. Schulte-Frohlinde E. Fend F, Dobritz M, Schmid RM, Eckel F. Hepatocellular carcinoma associated with Hereditary Hemochromatosis occurring in non-cirrhotic liver. *Z Gastroenterol*. 2006; 44: 39-42.
 105. Kowdley KV, Hassanein T, Kaur S, Farrell FJ, Van Thiel DH, Keeffe EB, Sorrell MF, Bacon BR, Weber FL Jr, Tavill AS. Primary liver cancer and survival in patients undergoing liver transplantation for hemochromatosis. *Liver Transpl Surg*. 1995; 1: 237-41.

106. Hellerbrand C, Poppl A, Hartmann A, Scholmerich J, Lock G. HFE C282Y heterozygosity in hepatocellular carcinoma: evidence for an increased prevalence. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2003; 1: 279-84.
107. Fargion S, Stazi MA, Fracanzani AL, Mattioli M, Sampietro M, Tavazzi D, BERTelli C, Patriarca B, Mariani C, Fiorelli G. Mutations in the HFE gene and their interaction with exogenous risk factors in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis*. 2001 27: 505-11.
108. Cauza E, Peck –Radosavljevic M, Ulrich-Pur H, Datz C, Gschwantler M, Schoniger-Hekele M, Gackl F, Polli C, Rasoul-Rockenschaub S, Muller C, Wrba F, Gangl A, Ferenci P. Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98: 442-7.
109. Boige V, Castera L, de Roux N, Ganne-Carrie N, Ducot B, Pelletier G, Beaugrand M, Buffet C. Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut*. 2003; 52: 1178-81.
110. Adams PC. Population screening for hemochromatosis. *Gut*. 2000; 46: 301-303.
111. Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, Turlin B, Mendler MH, Chaperon J, David V, Brissot P, Adams P, Deugnier Y. Non-invasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous haemochromatosis. *Gastroenterology*. 1998; 115: 929-36.
112. Whitfield JB, Cullen LM, Jazwinska EC, Powell L, Heath AC, Zhu G, Duffy DL, Martin NG. Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background on iron stores in a large community sample of twins. *Am J Hum Genet*. 2000; 66: 1246-58.

-
113. Waalen J, Felitti V, Gelbart T, Ho NJ, Beutler E. Penetrance of hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2002; 29: 418-32.
114. Crook MA, Walker PL. Extreme hyperferritinaemia; clinical causes. *J Clin Pathol*. 2013 Jan 31 [Epub ahead of print].
115. Worwood M. The laboratory assessment of iron status – an update. *Clin Chim Acta*. 1997; 259: 3-23.
116. Adams PC, Kertesz AE, Mc Laren CE, Barr R, Bamford A, Chakrabarti S. Population screening for hemochromatosis: a comparison of unbound iron-binding capacity, transferrin saturation and C282Y genotyping in 5,211 voluntary blood donors. *Hepatology*. 2000; 31: 1160-4.
117. Mc Cullen MA, Crawford DH, Hickman PE. Screening for hemochromatosis. *Clin Chim Acta*. 2002; 314: 169-86.
118. Cogswell ME, Gallagher ML, Steinberg KK. HFE genotype and transferrin saturation in the United States. *Genet Med*. 2003; 5: 304-10.
119. Brissot P, Le Lan C, Troadec MB, Lorho R, Ropert M, Lescoat G, Loral O. HFE hemochromatosis: pathogenic and diagnostic approach. *Transfus Clin Biol*. 2005; 12: 77-82.