

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**Hemocromatose hereditária: associação entre as mutações no gene *HFE* e o estado de ferro em doadores de sangue e pesquisa de mutações nos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* em pacientes com sobrecarga de ferro primária**

**Paulo Caleb Júnior de Lima Santos**

**Tese para obtenção do grau de**

**DOUTOR**

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara**

**São Paulo**

**2010**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**Hemocromatose hereditária: associação entre as mutações no gene *HFE* e o estado de ferro em doadores de sangue e pesquisa de mutações nos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* em pacientes com sobrecarga de ferro primária**

**Paulo Caleb Júnior de Lima Santos**

**Tese para obtenção do grau de**

**DOUTOR**

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara**

**São Paulo**

**2010**

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Paulo Caleb Júnior de Lima  
S237h Hemocromatose hereditária : associação entre as mutações no gene *HFE* e o estado de ferro em doadores de sangue e pesquisa de mutações nos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* em pacientes com sobrecarga de ferro primária / Paulo Caleb Júnior de Lima Santos. -- São Paulo, 2010.  
139p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.  
Orientador: Shinohara, Elvira Maria Guerra

1. Hematologia 2. Diagnóstico de laboratório : Medicina 3 : Mutação : Genética I. T. II. Shinohara, Elvira Maria Guerra, orientador.

616.15 CDD

Paulo Caleb Júnior de Lima Santos

Hemocromatose hereditária: associação entre as mutações no gene *HFE* e o estado de ferro em doadores de sangue e pesquisa de mutações nos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* em pacientes com sobrecarga de ferro primária

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara  
orientadora/presidente

---

1°. examinador

---

2°. examinador

---

3°. examinador

---

4°. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## DEDICATÓRIA

*À minha querida esposa Silmara,  
pelo amor dedicado à nossa união  
e pelo companheirismo constante.*

*À minha mãe Regina, pelos exemplos de fé e sabedoria.*

*Ao meu pai Caleb, pelos exemplos de trabalho e dedicação.*

*À minha tia Dita, também mãe, pelo exemplo de fraternidade.*

*Ao tio Celeste, pelo exemplo de caridade.*

*Aos irmãos Paula e Frederico, aos queridos Benê e Dulcinéia, aos parceiros  
Gustavo e Simone e aos demais familiares, pelo apoio.*

## **AGRADECIMENTOS**

***A tese é desenvolvida por um longo caminho e, neste caminho, diversas pessoas e instituições participam com sua contribuição. Graças a estas, a tese se finaliza e, neste espaço, eu lhes agradeço...***

***À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade no Programa de Pós-Graduação em Farmácia.***

***À Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, pela orientação e pelo aprendizado.***

***Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração, pela contribuição com seus conhecimentos e pela disponibilidade da realização de ensaios neste laboratório.***

***Ao Prof. Dr. Carlos Sérgio Chiattoni, diretor do Hemocentro da Santa Casa de São Paulo, pela participação do centro no projeto.***

***Aos pacientes e aos doadores de sangue, por colaborarem no projeto.***

***Aos clínicos responsáveis, Dr. Rodolfo Cançado e Dr. Isolmar Schettert, pelo apoio médico na condução do projeto.***

***Ao Dr. Alexandre da Costa Pereira, pelos ensinamentos e pelas oportunidades.***

***À Profa. Dra. Rosário Hirata, pela atenção pessoal.***

***Aos colaboradores, Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo e Prof. Dr. Mário Hirata.***

***Aos colegas Ana, Suely, Jorge, Elaine, secretários da pós-graduação, pelo prestativo atendimento.***

***Às colegas Marina França e Renata Soares, pelas contribuições técnicas prestadas.***

***Aos colegas que participaram destes anos de estudo, que me ensinaram e colaboraram no estudo e aqueles que tornaram-se amigos: Alexandre, Alessandro, Rafael, Amanda, Renata, Noely, Marina, Samanta, Diogo, Ana Carolina, Cléber, Diogo Biagi, Luciana Turola, Alessandra, Sílvia, André, Áshila, Léa, Lívia, Flávia, Vaquero, Júlia, Luciana Araújo, André Martelini, Maúde, Silvana, D. Antônia, Arruda, Márcio, Andréia, Tiago, Gustavo, Leo, Karina, Théo, Samuel, Íris, Fernanda, Rodrigo, Thaiomara, Ananka, Kelma, Luciene, Carol, Cristiane, Douglas e Robson.***

***Aos participantes de minha banca de qualificação, Profa. Dra. Elvira Guerra Shinohara, Profa. Dra. Cláudia Bonini Domingos, Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo, Prof. Dr. Paulo Silveira e Profa. Dra. Ana Campa, pela atenção, pela disponibilidade e pela contribuição no âmbito científico.***

***E, finalmente, o mais importante, ao Pai, pela saúde, força e sabedoria.***

## **NORMATIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese foi elaborada de acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT-NBR. Rio de Janeiro, 2002.

Norma 6023/2002, preconizada pela ABNT, para as referências bibliográficas.

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo. Diretrizes para apresentação de teses e dissertações. São Paulo: SIBi/USP, 2004.

Interpretação e descrição das variações genéticas de acordo com American College of Medical Genetics (RICHARDS et al., 2008).

## RESUMO

SANTOS, P. C. J. L.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. **Hemocromatose hereditária: associação entre as mutações no gene *HFE* e o estado de ferro em doadores de sangue e pesquisa de mutações nos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* em pacientes com sobrecarga de ferro primária.** 2010. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A hemocromatose hereditária é caracterizada pelo aumento da absorção intestinal de ferro, acarretando progressivo acúmulo no organismo. Os objetivos foram: 1- determinar as frequências das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* e avaliar os efeitos nas concentrações dos parâmetros do ferro em doadores de sangue; 2- pesquisar mutações nos genes: 2.1- *HFE*, 2.2- *HJV* e *HAMP*, 2.3- *TFR2* e *SLC40A1*, em pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária. Participaram 542 doadores de sangue provenientes do Hemocentro da Santa Casa de São Paulo. Foram incluídos 51 pacientes que apresentavam saturação de transferrina  $\geq 50\%$  (para mulheres) e  $\geq 60\%$  (para homens) e ausência de causas secundárias. Os genótipos para as mutações nos genes *HFE* foram avaliados pela PCR-RFLP. Foi realizado sequenciamento direto bidirecional para cada éxon dos genes, utilizando o sequenciador Genetic Analyzer 3500XL<sup>®</sup>. Nos doadores de sangue, as frequências dos alelos *HFE* 282Y, *HFE* 63D e *HFE* 65C foram 2,1, 13,6 e 0,6%, respectivamente. Os homens que doaram pela primeira vez, portadores do genótipo *HFE* 282CY, apresentaram maiores valores de saturação de transferrina; e também os portadores dos genótipos *HFE* 63DD e 63HD apresentaram maiores concentrações de ferritina sérica, em relação aos de genótipo selvagem. Para os pacientes, 72,5% (37/51) apresentaram ao menos 1 alteração no gene *HFE* e 11 foram identificados como homocigotos para a mutação p.C282Y. Uma mutação não descrita na literatura (p.V256I) foi identificada no gene *HFE* e a modelagem molecular (análises de ligação e estrutural) detectou que a mutação não reduziu a afinidade entre as proteínas *HFE* e  $\beta$ 2-microglobulina. No sequenciamento dos éxons dos genes *HJV* e *HAMP* foram identificadas as alterações já descritas: *HJV* p.E302K, *HJV* p.A310G, *HJV* p.G320V e *HAMP* p.R59G. Para o gene *TFR2*, foram identificados 3 polimorfismos já descritos (p.A75V, p.A617A e p.R752H). No gene *SLC40A1* foram observados 6 polimorfismos (rs13008848, rs11568351, rs11568345, rs11568344, rs2304704 e rs11568346) e 1 alteração não descrita previamente na

literatura (p.G204S). As conclusões foram: 1- em relação aos doadores de sangue, a presença dos alelos *HFE* 282Y e *HFE* 63D foi associada ao maior aporte de ferro nos homens que não doaram sangue anteriormente. 2.1- Para os pacientes com sobrecarga de ferro, a mutação p.C282Y em homozigose, ou em heterozigose composta com a p.H63D, foi a mais frequente alteração encontrada (33,3%). 2.2- O diagnóstico molecular de hemocromatose juvenil (HJ) no Brasil (*HJV* p.G320V em homozigose) foi relatado. As mutações funcionais *HJV* p.E302K e *HAMP* p.R59G foram identificadas, sendo possível que estas alterações possam estar contribuindo para consequências fenotípicas juntas as outras mutações em regiões intrônicas ou regulatórias dos genes. 2.3- Mutações funcionais nos genes *TFR2* e *SLC40A1* não foram identificadas.

**Palavras-chave:** Hemocromatose hereditária. *HFE*. Doadores de sangue. Sobrecarga de ferro. Mutações.

## ABSTRACT

SANTOS, P. C. J. L.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. **Hereditary hemochromatosis: relationship between *HFE* gene mutations and iron status in blood donors and *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* and *SLC40A1* gene sequencing in primary iron overload patients.** 2010. School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

Hereditary hemochromatosis (HH) is characterized by increased intestinal iron absorption, which leads to a progressive accumulation of iron in the body. The aims were: 1- to assess the frequency of *HFE* gene mutations (p.C282Y, p.H63D and p.S65C) and to identify their relationship to iron status in blood donors; 2- to search in primary iron overload patients: 2.1- *HFE*, 2.2- *HJV* and *HAMP*, 2.3- *TFR2* and *SLC40A1* gene mutations. Blood donors (n=542) were recruited from Hemocentro of Santa Casa Hospital, Sao Paulo, Brazil. The study included 51 patients with transferrin saturation  $\geq 50\%$  (women) and  $\geq 60\%$  (men) and absence of secondary causes. The genotypes for *HFE* mutations were evaluated by PCR-RFLP. Subsequent bidirectional sequencing for each gene was performed using the Genetic Analyzer sequencer 3500XL<sup>®</sup>. The frequencies of *HFE* 282Y, *HFE* 63D and *HFE* 65C alleles were 2.1, 13.6 and 0.6% in blood donors, respectively. The first time male donors carrying heterozygous genotype for the p.C282Y mutation had higher transferrin saturation values; and men carrying *HFE* 63DD and 63HD genotypes had higher serum ferritin concentrations when compared to the wild genotype. Thirty-seven (72.5%) out of the 51 patients presented at least one *HFE* mutation and 11 were identified as homozygous for the mutation p.C282Y. One novel mutation (p.V256I) in the *HFE* gene was indentified and molecular modeling (free energy and structural analysis *in silico*) showed that p.V256I mutation did not reduce the affinity binding between HFE and  $\beta 2$ -microglobulin. Sequencing in the *HJV* and *HAMP* genes revealed *HJV* p.E302K, *HJV* p.A310G, *HJV* p.G320V and *HAMP* p.R59G alterations. Sequencing in the *TFR2* gene observed 3 polymorphisms (p.A75V, p.A617A e p.R752H); and sequencing in the *SLC40A1* gene identified 6 polymorphisms (rs13008848, rs11568351, rs11568345, rs11568344, rs2304704 e rs11568346) and 1 p.G204S non-described mutation. The conclusions were: 1- for blood donors, the presence of *HFE* 282Y and *HFE* 63D alleles were associated with

alterations on iron status only in first time male blood donors. 2.1- For patients with iron overload, the p.C282Y mutation in homozygous or in compound heterozygous with p.H63D, was the most frequent molecular change found (33.3%). 2.2- The molecular diagnosis of Juvenil Hemochromatosis (JH) in Brazil (homozygous genotype for the *HJV* p.G320V) was reported. The *HJV* p.E302K and *HAMP* p.R59G functional mutations were found and, it is conceivable that they may be contributing to phenotypic consequences together to other mutations in intronic or regulatory regions. 2.3- Functional mutation in the *TFR2* and *SLC40A1* genes were not identified.

**Key words:** Hereditary hemochromatosis. *HFE*. Blood donors. Iron overload. Mutations.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do enterócito duodenal.....27
- Figura 2.** Papel das proteínas associadas ao metabolismo do ferro nos enterócitos, eritroblastos, macrófagos e hepatócitos.....30
- Figura 3.** Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.C282Y no gene *HFE*.....54
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição enzimática para a mutação p.C282Y.....54
- Figura 5.** Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.H63D no gene *HFE*.....55
- Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da restrição enzimática para a mutação p.H63D.....55
- Figura 7.** Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.S65C no gene *HFE*.....56
- Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição enzimática para a mutação p.S65C.....56
- Figura 9.** Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.Q690P no gene *TFR2*.....57
- Figura 10.** Eletroforese em gel de poliácridamida 8%, corado com nitrato de prata, dos produtos de restrição enzimática para a mutação p.Q690P.....57
- Figura 11.** Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.Y250X no gene *TFR2*.....58

<b>Figura 12.</b> Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição enzimática para a mutação p.Y250X.....	58
<b>Figura 13.</b> Resultado do sequenciamento demonstrando a mutação p.V256I encontrada no gene <i>HFE</i> .....	85
<b>Figura 14.</b> Gráfico da energia de ligação entre HFE e $\beta$ 2M e HFE e TR .....	85
<b>Figura 15.</b> Estruturas dos complexos HFE- $\beta$ 2M.....	86
<b>Figura 16.</b> Resultado do sequenciamento do gene <i>HJV</i> : p. E302K e p.A310G .....	89
<b>Figura 17.</b> Sequência do paciente com hemocromatose juvenil .....	89
<b>Figura 18.</b> Resultado do sequenciamento do gene <i>HAMP</i> .....	89
<b>Figura 19.</b> Resultado do sequenciamento do gene <i>TFR2</i> .....	92
<b>Figura 20.</b> Resultado do sequenciamento do gene <i>SLC40A1</i> : p.R561G.....	92
<b>Figura 21.</b> Resultado do sequenciamento do gene <i>SLC40A1</i> : p.G204S .....	93
<b>Figura 22.</b> Gráfico dos resultados das alterações nucleotídicas para a mutação p.G204S (c.G610A, éxon 6) utilizando análise da curva de <i>melting</i> .....	93

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Proteínas envolvidas na absorção intestinal de ferro, sua função, sua expressão nas criptas e vilos e seu efeito na depleção de ferro.....29
- Tabela 2.** Alterações genéticas relacionadas à fisiopatologia da hemocromatose hereditária.....35
- Tabela 3.** Iniciadores, tamanho do fragmento gerado e temperatura de hibridização para a amplificação dos éxons dos genes *HFE*, *HJV* e *HAMP*.....61
- Tabela 4.** Iniciadores, tamanho do fragmento gerado e temperatura de hibridização para a amplificação dos éxons dos genes *TFR2* e *SLC40A1*.....62
- Tabela 5.** Características gerais dos doadores de sangue.....69
- Tabela 6.** Análise da correlação entre a idade e o número de doações nos últimos 12 meses e as concentrações de hemoglobina, ferro sérico, CTLF, saturação de transferrina e ferritina sérica em doadores de sangue femininos e masculinos.....73
- Tabela 7.** Frequências de genótipos e de alelos para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* e para as mutações p.Y250X e p.Q690P no gene *TFR2* no grupo total, nas mulheres e nos homens doadores.....74
- Tabela 8.** Frequências das combinações de genótipos para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* em doadores de sangue.....75
- Tabela 9.** Concentrações dos parâmetros que avaliam o estado do ferro e genótipos para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C nos doadores homens .....78
- Tabela 10.** Influência das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C, da idade e do grupo étnico nas concentrações dos parâmetros que avaliam ferro para os doadores homens de primeira vez pela análise da regressão linear múltipla.....79

**Tabela 11.** Concentrações de ferro sérico, CTLF, saturação de transferrina, ferritina sérica, AST, ALT, glicose e creatinina séricas nos pacientes.....83

**Tabela 12.** Frequências das combinações de genótipos e dos alelos encontrados pelo sequenciamento do gene *HFE* nos pacientes com sobrecarga de ferro primária.....83

**Tabela 13.** Concentração de ferritina sérica e saturação de transferrina de acordo com os genótipos para as mutações p.C282Y e p.H63D no gene *HFE* em pacientes com sobrecarga de ferro primária .....84

**Tabela 14.** Dados genotípicos para a alteração *SLC40A1* p.G204S, idades e valores dos exames bioquímicos para a paciente e as duas filhas.....91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMBER99	Programa de simulação molecular
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apo-Tf	Apotransferrina
AST	Aspartato aminotransferase
$\beta$ 2M	$\beta$ 2-microglobulina
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> - correceptores de moléculas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTLF	Capacidade total de ligação com ferro
DcytB	<i>Duodenal cytochrome b</i> - citocromo b duodenal
DNA	Ácido desoxiribonucleotídeo
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i> - transportador de metais divalentes
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fe	Ferro
FPN	Ferroportina
<i>HAMP</i>	Gene que codifica a hepcidina
Haem	Heme
Hb	Hemoglobina
HCP1	<i>Heme carrier protein</i> – proteína carreadora de heme
<i>HFE</i>	Gene que codifica a proteína HFE
HH	Hemocromatose hereditária
HJ	Hemocromatose juvenil
<i>HJV</i>	Gene que codifica a proteína hemojuvelina
HO	Heme oxigenase
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
NTBI	Ferro não-ligado à transferrina

NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Base</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Potencial de dissociação do ácido
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> - restrição enzimática
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> – medida média de distância
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>SLC40A1</i>	Gene que codifica a ferroportina
SMAD	Moduladores da atividade de transcrição
ST	Saturação de transferrina
STEAP3	<i>Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3</i>
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tf	Transferrina
<i>TFR1</i>	Gene que codifica receptor de transferrina 1
<i>TFR2</i>	Gene que codifica receptor de transferrina 2
TR	Receptor de transferrina
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
WT	<i>Wild-type</i>

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1 Proteínas envolvidas no metabolismo do ferro.....	23
1.2 Metabolismo do ferro.....	27
1.3 Sobrecarga de ferro.....	31
1.4 Alterações nos genes <i>HFE</i> , <i>HJV</i> , <i>HAMP</i> , <i>TFR2</i> e <i>SLC40A1</i> .....	35
1.5 Estudos realizados no Brasil.....	40
1.6 Justificativa.....	43
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	44
2.1 Objetivos do estudo realizado com os doadores de sangue.....	44
2.2 Objetivo do estudo realizado com os pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária.....	44
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
3.1 Casuística.....	45
3.2 Amostras Biológicas.....	47
3.3 Metodologia Laboratorial.....	48
3.3.1 Determinações hematológicas e bioquímicas.....	48
3.3.2 Extração e avaliação do DNA genômico.....	49
3.3.3 Análises das mutações.....	50
3.3.3.1 Mutação p.C282Y no gene <i>HFE</i> .....	51
3.3.3.2 Mutações p.H63D e p.S65C no gene <i>HFE</i> .....	51
3.3.3.3 Mutações p.Q690P e p.Y250X no gene <i>TFR2</i> .....	52
3.3.4 Rastreamento das mutações nos genes <i>HFE</i> , <i>HJV</i> , <i>HAMP</i> , <i>TFR2</i> e <i>SLC40A1</i> por sequenciamento.....	59
3.4 Análise da curva de <i>melting</i> para a mutação <i>SLC40A1</i> p.G204S .....	63

3.5 Estudos <i>in silico</i> .....	63
3.6 Análises Estatísticas.....	66
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>68</b>
4.1 Resultados no grupo de doadores de sangue.....	68
4.1.1 Características gerais do grupo de doadores de sangue.....	68
4.1.2 Análise da correlação entre idade e número de doações nos últimos 12 meses com as concentrações de hemoglobina e os parâmetros de ferro nos doadores de sangue.....	71
4.1.3 Frequências genotípicas e alélicas para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene <i>HFE</i> e mutações p.Y250X e p.Q690P no gene <i>TFR2</i> nos doadores de sangue.....	71
4.1.4 Frequências das combinações de genótipos para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene <i>HFE</i> nos doadores de sangue.....	72
4.1.5 Associação entre os genótipos das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene <i>HFE</i> e os parâmetros de ferro nos doadores de sangue segundo a frequência de doação.....	76
4.1.6 Preditores da ferritina sérica, da capacidade total de ligação com o ferro, da saturação de transferrina e do ferro sérico.....	77
4.2 Resultados no grupo de pacientes com sobrecarga de ferro primária.....	80
4.2.1 Características gerais dos pacientes com sobrecarga de ferro primária.....	80
4.2.2 Análise das concentrações dos parâmetros que avaliam ferro, enzimas hepáticas e testes bioquímicos segundo gênero.....	80
4.2.3 Sequenciamento do gene <i>HFE</i> nos pacientes com sobrecarga de ferro primária.....	80
4.2.3.1 Frequências das combinações de genótipos e dos alelos para as mutações encontradas no gene <i>HFE</i> nos pacientes.....	80
4.2.3.2 Associação entre os genótipos para a mutação p.C282Y no gene <i>HFE</i> e os parâmetros de ferro nos pacientes.....	81
4.2.3.3 Modelagem molecular para a mutação p.V256I no gene <i>HFE</i> .....	82
4.2.3.3.1 Análise da energia livre de ligação.....	82
4.2.3.3.2 Análise estrutural.....	82

4.2.4 Sequenciamento dos genes <i>HJV</i> , <i>HAMP</i> , <i>TFR2</i> e <i>SLC40A1</i> nos pacientes com sobrecarga de ferro primária.....	87
4.2.4.1 Sequenciamento do gene <i>HJV</i> .....	87
4.2.4.2 Sequenciamento do gene <i>HAMP</i> .....	88
4.2.4.3 Sequenciamento do gene <i>TFR2</i> .....	90
4.2.4.4 Sequenciamento do gene <i>SLC40A1</i> .....	90
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	94
5.1 Discussão para o grupo de doadores de sangue.....	94
5.2 Discussão para o grupo dos pacientes com sobrecarga de ferro primária....	97
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	104
6.1 Conclusões para o grupo de doadores de sangue.....	104
6.2 Conclusões para o grupo de pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária.....	105
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	107
<b>APÊNDICE 1</b>	
<b>APÊNDICE 2</b>	
<b>ANEXO 1</b>	
<b>ANEXO 2</b>	
<b>ANEXO 3</b>	
<b>ANEXO 4</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento químico indispensável aos seres humanos e praticamente encontrado em todos os seres vivos. Apresenta-se na dieta sob duas formas: o ferro heme e o ferro não-heme. O ferro heme está presente em alimentos de origem animal, como carne bovina, frango, peixe e vísceras. Enquanto que o ferro não-heme pode ser encontrado em cereais e em alguns vegetais. De acordo com a sua forma, o ferro pode ser absorvido de diferentes maneiras na mucosa intestinal. O ferro heme é facilmente absorvido, pois é solúvel nas condições do intestino delgado. Em contraste, a absorção do ferro não-heme é bem menor, podendo ser aumentada na presença da vitamina C ou outro ácido, que reduz  $Fe^{+3}$  ao  $Fe^{+2}$  absorvível (FLEMING et al., 2005; BALLA et al., 2007).

O ferro faz parte da molécula de hemoglobina e da mioglobina; participa da formação dos citocromos que atuam na metabolização hepática de fármacos, alimentos e drogas, transformando-as em novas substâncias; está presente na síntese das catalases e peroxidases; na formação do composto ribonucleotídeo redutase, importante na síntese de DNA. Algumas proteínas de ferro atuam na transferência de elétrons nas mitocôndrias (LOMBARD, CHUA e O'TOOLE, 1997; BALLA et al., 2007).

A concentração de ferro em um indivíduo saudável é controlada por várias proteínas participantes de sua homeostasia. De modo geral, o conteúdo de ferro absorvido é semelhante à concentração de ferro perdido na descamação das células epiteliais (PAIVA, RONDO e GUERRA-SHINOHARA, 2000).

Alterações nas concentrações de ferro no organismo estão associadas à deficiência ou à sobrecarga de ferro. A carência de ferro ocorre de forma gradual e progressiva, apresentando três estágios até que a anemia se manifeste. O primeiro estágio, depleção de ferro, afeta os depósitos e representa período de maior vulnerabilidade em relação ao balanço marginal de ferro. O segundo estágio, deficiência de ferro, é referido como uma eritropoese ferro-deficiente e caracteriza-se pela ferritina sérica diminuída, ainda que a concentração de hemoglobina não esteja reduzida. O terceiro e último estágio, anemia ferropriva, caracteriza-se pelas concentrações diminuídas de ferritina sérica, de ferro sérico, de saturação da transferrina e de hemoglobina e pela alta concentração da capacidade de ligação com ferro (PAIVA, RONDO e GUERRA-SHINOHARA, 2000; CLARK, 2009). Já a

sobrecarga de ferro pode ocorrer devido ao aumento de absorção do ferro ou pode estar associada a causas secundárias, como, por exemplo, a história de transfusões sanguíneas repetidas decorrentes de anemias hemolíticas. O excesso de ferro no organismo é prejudicial, pois está associado à geração de radicais livres que podem acarretar danos a diversos tecidos (BEARD, DAWSON e PINERO, 1996; NAGY et al., 2010).

Várias proteínas presentes em enterócitos, eritroblastos, macrófagos e hepatócitos estão envolvidas na regulação da absorção do ferro em seres humanos. Dentre estas, estão as proteínas: HFE, transportador de metais divalentes (*divalent metal ion transporters* - DMT1), receptor de transferrina 1, ferroportina, receptor de transferrina 2, hemojuvelina e o polipeptídeo hepcidina.

## 1.1 Proteínas envolvidas no metabolismo do ferro

### HFE

A proteína HFE é expressa nos enterócitos e hepatócitos e sua função fisiológica está associada ao controle de ferro no organismo (PIETRANGELO, 2006). A hipótese de que HFE poderia regular o metabolismo do ferro surgiu com a descoberta de sua associação ao receptor de transferrina 1 (TFR1). Este sensor de ferro no organismo funcionaria da seguinte maneira: a proteína HFE associada à  $\beta 2M$  ( $\beta 2$ -microglobulina) se liga ao TFR1, reduzindo a afinidade deste pela transferrina e controlando, assim, a entrada de ferro no organismo (FEDER et al., 1998; FLEMING et al., 2005). Segundo esta hipótese, quando há interação anômala no meio TFR1 e HFE na membrana basolateral dos enterócitos, ocorreria deficiência de ferro nos enterócitos e aumento de absorção intestinal, acarretando sobrecarga (ANDREWS, 1999; ROCHETTE et al., 2010). Outra hipótese sugere que a proteína HFE esteja envolvida na regulação da síntese da hepcidina (BRIDLE et al., 2003; NICOLAS et al., 2003), porque esta é restrita às células do fígado, fornecendo forte evidência que as proteínas HFE nos hepatócitos exerçam seus efeitos no fígado e não dentro das criptas (FRAZER e ANDERSON, 2005).

O gene *HFE* (também conhecido como *HFE1*, *HLA-H*), constituído de 6 éxons e que foi localizado por Feder e colaboradores (1996) no cromossomo 6p21.3; codifica uma proteína de membrana de 348 aminoácidos chamada HFE. Mutações

no gene *HFE* foram associadas a alterações na absorção de ferro (FEDER et al., 1996).

### **Receptor de transferrina 1 (*transferrin receptor 1* – TFR1)**

A proteína TFR1 está associada ao complexo HFE -  $\beta$ 2M nos enterócitos sendo importante no controle da absorção intestinal (FEDER et al., 1998). A TFR1 é expressa em quase todas as células, principalmente na superfície de células indiferenciadas e células de placenta. Nos eritroblastos o TFR1 apresenta alta afinidade à transferrina, proteína transportadora de ferro, onde se faz necessária a presença de ferro para a formação da hemoglobina (WEISS, 2010).

O gene TFR (também chamado *TFR1*, *CD71*) está localizado no cromossomo 3q29 e codifica uma proteína de 760 aminoácidos.

### **Receptor de transferrina 2 (*transferrin receptor 2* – TFR2)**

A proteína TFR2 tem elevada homologia com a TFR1, sendo expressa predominantemente no fígado. Comparada com a TFR1, a proteína TFR2 liga-se à transferrina com menor afinidade - aproximadamente 30 vezes (KAWABATA, GERMAIN et al., 2001; KAWABATA, NAKAMAKI et al., 2001). Evidências sugerem que sua função fisiológica esteja relacionada com a absorção de ferro pelos hepatócitos através de um mecanismo de endocitose e funcionaria como um sensor da saturação da transferrina no plasma, sinalizando para controlar a síntese de hepcidina (FRAZER e ANDERSON, 2003; WALLACE et al., 2005; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007).

O gene *TFR2* (também conhecido como *HFE3*, *TFRC2*), constituído de 18 éxons, codifica uma proteína de 355 aminoácidos, está localizado no cromossomo 7q22 e foi descrito por Kawabata e colaboradores (1999) (KAWABATA et al., 1999).

### **Ferroportina**

A ferroportina (FPN) é expressa na porção basolateral dos enterócitos, em macrófagos e em células de Kupffer. Esta localização é consistente com sua função fisiológica de exportar o ferro das células (DONOVAN et al., 2000). Um estudo

sugeriu que a regulação da FPN pela hepcidina pode completar um ciclo homeostático que regula as concentrações plasmáticas de ferro (NEMETH et al., 2004). Outro estudo observou que a FPN tem localização intracelular significativa nos enterócitos de camundongos sem deficiência de ferro, visto que os camundongos com depleção de ferro têm localização mais pronunciada de FPN na membrana basolateral (ABBOUD e HAILE, 2000).

O gene *SLC40A1* (também chamado *FPN1*, *HFE4*, *MTP1*, *IREG1*, *SLC11A3*), constituído de 8 éxons, codifica a proteína ferroportina de 571 aminoácidos. Está localizado no cromossomo 2q32 e foi descrito por Donovan e colaboradores (2000) (DONOVAN et al., 2000).

### **Hemojuvelina**

A proteína hemojuvelina (HJV) é expressa no fígado, coração e músculos esqueléticos (PAPANIKOLAOU et al., 2004). Alguns estudos, *in vitro* e em pacientes portadores de hemocromatose, demonstraram que alterações no gene da *HJV* acarretam falha na síntese de hepcidina, indicando seu possível papel fisiológico (PAPANIKOLAOU et al., 2004; LIN, GOLDBERG e GANZ, 2005; DE DOMENICO, MCVEY WARD e KAPLAN, 2008). Pacientes portadores de mutações no gene da *HJV* apresentaram menores concentrações de hepcidina em relação aos indivíduos saudáveis (PAPANIKOLAOU et al., 2004).

O gene *HJV* (também chamado *HFE2*), constituído de 4 éxons, codifica uma proteína de 426 aminoácidos. Foi identificado no cromossomo 1q21 por Papanikolaou e colaboradores (2004) (PAPANIKOLAOU et al., 2004).

### **Hepcidina**

A identificação da hepcidina mudou a compreensão da fisiopatologia das desordens do ferro em que ocorre sobrecarga. A hepcidina tem sido descrita como a principal reguladora da homeostase do ferro e esta regula a FPN, inibindo a exportação de ferro proveniente dos enterócitos e dos macrófagos (RIVERA et al., 2005). Em estudos com cultura de células foi demonstrado que a hepcidina se liga à FPN e, na sequência, acarreta degradação da proteína exportadora de ferro (NEMETH et al., 2004; WEISS, 2010).

O conhecimento sobre os processos celulares que regulam a produção de hepcidina e a secreção nos hepatócitos ainda é limitado (LIN, GOLDBERG e GANZ, 2005; ZHANG et al., 2005). Alguns estudos sugerem que a proteína HFE interage com TFR1 e TFR2, controlando a síntese da hepcidina e que esta interação estaria associada às alterações na cinética do ferro nos hepatócitos (FRAZER e ANDERSON, 2005; LEE e BEUTLER, 2009).

Baixas concentrações urinárias de hepcidina foram encontradas em pacientes portadores de HH associadas a mutações nos genes *HFE*, *TFR2* e *HJV* (BRIDLE et al., 2003; LEONG e LONNERDAL, 2004; PAPANIKOLAOU et al., 2004; PAPANIKOLAOU et al., 2005; BOZZINI et al., 2008). Também na presença de anemia e hipóxia são encontradas concentrações diminuídas de hepcidina (LEE et al., 2004). Outro estudo correlaciona o aumento da síntese de hepcidina com as citocinas liberadas em processos infecciosos e inflamatórios (PIGEON et al., 2001).

Estudo realizado com camundongos submetidos à dieta pobre em ferro reportou menores concentrações de hepcidina; enquanto que animais submetidos à dieta rica em ferro apresentaram maiores concentrações desse polipeptídeo. O estudo também descreveu que camundongos nocautes para o gene *HFE* apresentaram baixas concentrações de hepcidina quando comparados com animais normais (LEONG e LONNERDAL, 2004).

O gene *HAMP* (também chamado *HFE2B*, *LEAP1*), constituído de 3 éxons, codifica um polipeptídeo de 84 aminoácidos e está localizado no cromossomo 19q13. O gene é expresso no coração, no cérebro e, em alta concentração, no fígado (PARK et al., 2001).

### **Diferenciação nos enterócitos e expressão das proteínas**

As células epiteliais do duodeno exercem papel importante na homeostasia do ferro por detectarem mudanças nas demandas do organismo. Existem, dentro das criptas do intestino, células multipotentes precursoras, que migram até o vilos, diferenciando-se. Primeiramente, as células das criptas se modificam a enterócitos altamente especializados na absorção de micronutrientes. Após isso, as células migram ao ápice vilar e são esfoliadas e excretadas (Figura 1) (DANIELE e D'AGOSTINO, 1994; HOCKER e WIEDENMANN, 1998; MUNOZ, VILLAR e GARCIA-ERCE, 2009).

No que diz respeito à absorção nos enterócitos, várias proteínas são conhecidas e suas expressões modificam em relação à maturidade do enterócito, com finalidade de ótima passagem de ferro através da célula para chegar à corrente sanguínea. A Tabela 1 demonstra algumas proteínas envolvidas na absorção intestinal de ferro, sua função fisiológica, sua expressão nas criptas e vilos e seu efeito frente à depleção de ferro (DANIELE e D'AGOSTINO, 1994; HOCKER e WIEDENMANN, 1998; MUNOZ, VILLAR e GARCIA-ERCE, 2009).

## 1.2 Metabolismo do ferro

A funcionalidade das proteínas envolvidas no metabolismo de ferro é essencial para o equilíbrio do mineral no organismo. As principais células relacionadas à homeostasia são os enterócitos, os eritroblastos, os macrófagos e os hepatócitos (Figura 2).

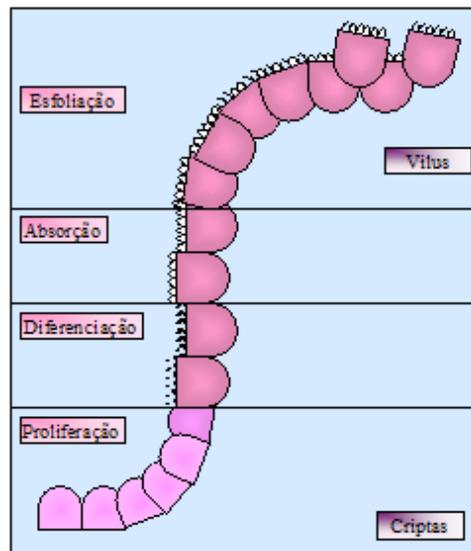


Figura 1. Ciclo de vida do enterócito duodenal. Adaptado de: MORGAN & OATES, 2002.

Nos enterócitos, o ferro do alimento pode estar na forma inorgânica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou como hemoglobina ou mioglobina. O  $\text{Fe}^{3+}$  em complexo solúvel é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por uma proteína redutora chamada citocromo b duodenal (*duodenal cytochrome b* - DcytB) e transportado para os enterócitos duodenais através da proteína DMT1. Já a absorção do ferro heme está menos estabelecida. Presumivelmente, a internalização

do heme no enterócito, após a digestão enzimática da hemoglobina e da mioglobina, é realizada através de uma proteína de transporte do heme chamada de HCP1 (*heme carrier protein*). No entanto, foi demonstrado que a HCP1 também transporta folato no enterócito. Dentro da célula, o heme é degradado pela heme oxigenase e o  $\text{Fe}^{2+}$  é liberado da protoporfirina (NEMETH et al., 2004; SHAYEGHI et al., 2005; QIU et al., 2006; WEISS, 2010).

Em condições fisiológicas, o ferro no enterócito pode ser armazenado como ferritina, se a taxa de saturação de transferrina estiver normal ou aumentada no sangue periférico, ou pode ser transportado através da membrana basolateral a caminho da circulação, se os valores da saturação da transferrina estiverem baixos no sangue periférico. O transporte do ferro através da membrana basolateral é mediado pela ferroportina, que transporta  $\text{Fe}^{2+}$  ao plasma, sendo oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  pela hefaestina, facilitando a ligação do ferro à transferrina. A hepcidina regula a função da ferroportina, inibindo a exportação de ferro; então, em caso de maiores concentrações de hepcidina no plasma, a maior parte do ferro absorvido será retida como ferritina no enterócito e perdida na luz intestinal com as fezes (NEMETH et al., 2004; SHAYEGHI et al., 2005; NEMETH e GANZ, 2009; WEISS, 2010).

Os eritroblastos recebem o ferro através do ciclo da transferrina, que disponibiliza, seja via enterócitos ou macrófagos, o mineral essencial para a formação do eritrócito. A transferrina liga-se ao TFR1 na superfície da célula e o complexo formado invagina-se para formar o endossomo. Neste, ocorre diminuição do pH, induzindo a liberação do ferro da transferrina. Neste momento, o  $\text{Fe}^{3+}$  é convertido a  $\text{Fe}^{2+}$ , possivelmente por uma proteína redutora chamada STEAP3 (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3*), permitindo o transporte do ferro para fora dos endossomos através da DMT1. Subsequentemente, as apotransferrinas e as TFR1 retornam à superfície da célula para um ciclo posterior. O ferro é transportado principalmente para as mitocôndrias para síntese do grupo heme, a fim de formar a hemoglobina. O ferro adicional é armazenado como ferritina e hemossiderina (OHGAMI et al., 2005; NEMETH e GANZ, 2009; WEISS, 2010).

Tabela 1. Proteínas envolvidas na absorção intestinal de ferro, sua função, sua expressão nas criptas e vilos e seu efeito na depleção de ferro

<b>Proteína</b>	<b>Função</b>	<b>Expressão nas criptas</b>	<b>Expressão nos vilos</b>	<b>Efeito na depleção de ferro</b>
DMT1	Transportador de ferro	-	+	Aumento
Ferroportina	Exportador de ferro	-	+	Aumento
DcytB	Redução do ferro	-	+	Aumento
Hefaestina	Oxidação do ferro	-	+	Sem alteração
Ferritina	Estoque de ferro	+	+	Diminuição
HFE	Regulador	+	-	Sem alteração
Hepcidina*	Regulador	-	-	Provável diminuição
TFR1	Receptor para transferrina	+	+	Aumento
Transferrina	Transporte de ferro	-	-	Aumento

- Ausente; + Presente

DMT1: transportador de metais divalentes; DcytB: citocromo b duodenal; TFR1: receptor de transferrina 1. \*Hepcidina é um polipeptídeo. Adaptado de: MORGAN & OATES, 2002.

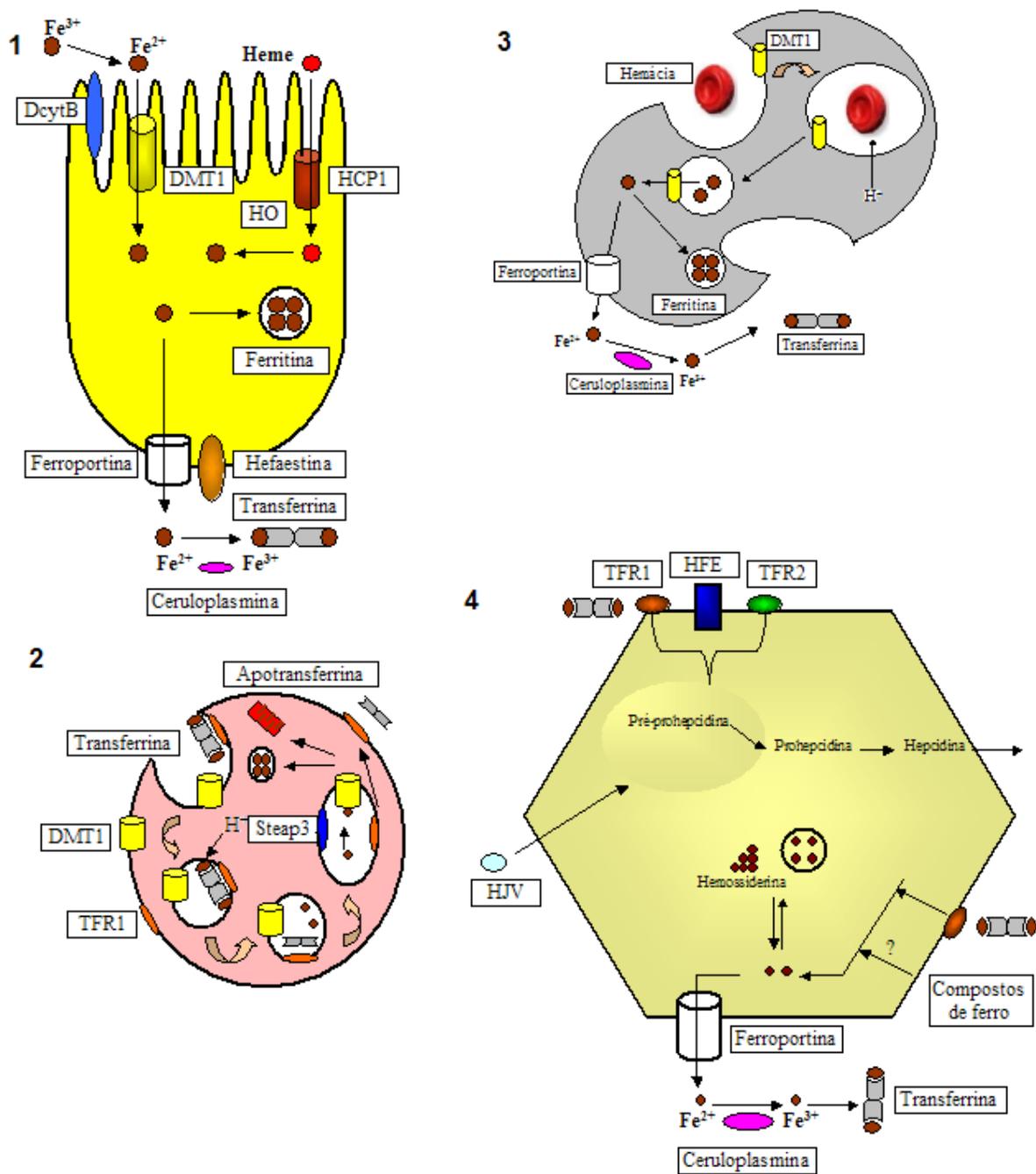


Figura 2. Papel das proteínas associadas ao metabolismo do ferro nos enterócitos (1), eritroblastos (2), macrófagos (3) e hepatócitos (4).

HCP1: proteína de transporte do heme; DcytB: citocromo b duodenal; DMT1: transportador de metais divalente; HO: Heme oxigenase; TFR1: receptor de transferrina 1; Steap3: proteína redutora de ferro; TFR2: receptor de transferrina 2; HJV: hemojuvelina; HFE: proteína HFE; Compostos de ferro (ferritina, hemoglobina, heme e ferro não-ligado à transferrina). Adaptado de: Swinkels *et al.*, 2006.

Nos macrófagos reticuloendoteliais é realizada a reciclagem do ferro. Estes fagocitam os eritrócitos com perda de flexibilidade ou com defeitos intrínsecos e os digerem em um compartimento fagolisossomal no qual a hemoglobina é degradada e o ferro é liberado do grupo heme, com a participação da enzima heme oxigenase. O ferro proveniente dos eritrócitos é armazenado como ferritina ou exportado pela ferroportina. O mineral é oxidado a  $Fe^{3+}$  pela ceruloplasmina, a fim de facilitar a ligação ferro-transferrina, e será reutilizado predominantemente na medula óssea na hemoglobinizacão dos eritrócitos. Também uma quantidade considerável de ferro é liberada do macrófago como ferritina ou hemoglobina, mas este mecanismo não está bem elucidado (MOURA et al., 1998; CHUNG e WESSLING-RESNICK, 2003; NEMETH e GANZ, 2009; WEISS, 2010).

Já os hepatócitos realizam múltiplos mecanismos em relação ao metabolismo do ferro. As vias em que ocorre o transporte dos compostos de ferro (hemoglobina, grupo heme, ferritina e ferro não-ligado à transferrina) nos hepatócitos não foram identificadas. O ferro nos hepatócitos é armazenado como ferritina e hemossiderina ou exportado pela ferroportina. É reconhecida a síntese da hepcidina nos hepatócitos, e esta surgiu como o principal regulador da exportação de ferro celular. A hepcidina circulante interage com a ferroportina, sendo o complexo internalizado nas células, ocorrendo defosforilação, ubiquitinação e degradação de ambas as proteínas. Deste modo, há redução da exportação de ferro para o plasma pela ferroportina nas superfícies de enterócitos e macrófagos. Estudos demonstram que os genes *HFE*, *TFR2* e *HJV* podem modular a síntese de hepcidina (PAPANIKOLAOU et al., 2005; ANDERSON et al., 2007; DE DOMENICO, MCVEY WARD e KAPLAN, 2008; NEMETH e GANZ, 2009; WEISS, 2010;).

### **1.3 Sobrecarga de ferro**

A sobrecarga de ferro pode ser classificada em primária ou secundária. Na primária estão incluídas as alterações em genes de proteínas relacionadas à absorção de ferro – a chamada hemocromatose hereditária.

A sobrecarga de ferro pode ocorrer, também, devido a causas secundárias, tais como: transfusões sanguíneas repetidas em decorrência de anemias hemolíticas (talassemias, esferocitose hereditária, anemia autoimune, entre outras), presença de doenças hematológicas (anemia sideroblástica, síndrome mielodisplásica) e doenças

hepáticas (hepatite C, esteatose hepática não-alcoólica, decorrência de etilismo) (SWINKELS et al., 2006; PIETRANGELO, 2010; WEISS, 2010).

### **Hemocromatose hereditária**

A hemocromatose hereditária (HH) é a mais comum doença autossômica recessiva em caucasianos, sendo caracterizada por aumento na absorção de ferro. O primeiro caso de HH foi relatado em 1865 por Trousseau, que descreveu um paciente com cirrose hepática, diabetes mellitus e hiperpigmentação da pele. Todavia, o reconhecimento da doença foi realizado em 1889, por Von Recklinghausen, quem primeiro utilizou a expressão "hemocromatose" (PIETRANGELO, 2003). Após a explicação sobre a natureza hereditária da doença por Sheldon, em 1935, avanços no entendimento da transmissão genética e bases moleculares desta doença ocorreram nos anos 1970 e 1980, por Simon e colaboradores. Posteriormente, foi descrita a herança autossômica recessiva da HH e também a associação com a molécula HLA-A do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* - MHC) classe I no cromossomo 6 (SIMON et al., 1987). Em 1996, Feder e colaboradores localizaram o gene responsável pela maioria dos casos de hemocromatose hereditária, subsequentemente o gene foi chamado de *HFE* (FEDER et al., 1996).

A HH é caracterizada pelo aumento da absorção intestinal de ferro, o qual resulta no acúmulo progressivo no organismo. A expressão clínica é mais comum em homens do que em mulheres que, graças aos ciclos menstruais e gestações, têm maiores perdas de ferro e, assim, tendem a desenvolver sintomas clínicos tardiamente (FRANCHINI, 2005; WORWOOD, 2005; PIETRANGELO, 2010; WEISS, 2010).

O dano tecidual induzido por sobrecarga de ferro é mais frequente no fígado, coração, pâncreas e na pele. O fígado é geralmente o órgão mais envolvido e hepatomegalia está presente na maioria dos pacientes sintomáticos. A manifestação devido ao excesso de ferro no fígado, a fibrose hepática, poderá evoluir para um quadro de cirrose, o que é um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. A deposição de ferro no miocárdio poderá acarretar dilatação ventricular, clinicamente manifestada como insuficiência cardíaca congestiva e arritmias. A seletiva deposição de ferro em células de ilhotas pancreáticas pode

causar diabetes insulino-dependente. Hipogonadismo hipogonadotrópico é comum em ambos os sexos e pode preceder a outras manifestações clínicas da doença. A artropatia se desenvolve em 25-50% dos pacientes e não parece relacionada com os estoques de ferro, uma vez que o paciente pode apresentar sintomas mesmo após a depleção de ferro (BARTON et al., 1998; PIPERNO, 1998; POWELL et al., 1998; NEMETH e GANZ, 2009; PIETRANGELO, 2010).

O diagnóstico laboratorial da sobrecarga de ferro pode ser realizado por meio da determinação das concentrações de ferro sérico, da capacidade total de ligação com ferro (CTLF) e da ferritina sérica. A saturação da transferrina é obtida através da razão entre as concentrações de ferro sérico e CTLF, multiplicado por 100, e é considerada como o teste laboratorial de rotina mais sensível para a avaliação de sobrecarga de ferro no organismo (NEMETH e GANZ, 2009; WEISS, 2010).

A Conferência Internacional em Hemocromatose (*International Consensus Conference on Haemochromatosis*, 2000), foi realizada a fim de estabelecer critérios clínicos, laboratoriais, diagnósticos e tratamentos mais recomendados para a doença. Neste consenso, foram definidos que, geralmente, valores de saturação de transferrina iguais ou superiores a 50% em mulheres e 60% em homens estão presentes na sobrecarga de ferro causada pela hemocromatose genética (ADAMS, 2000; LE GAC et al., 2003; AGUILAR-MARTINEZ, SCHVED e BRISSOT, 2005; BRISSOT et al., 2008).

Além disso, a concentração sérica da ferritina tem valor preditivo para existência de danos hepáticos e inflamatórios. Concentrações séricas da ferritina superiores a 1.000 µg/L podem ser indicativas de fibrose hepática (CAMASCHELLA et al., 2000). A associação entre o quadro clínico e os valores aumentados da saturação de transferrina, ferro sérico e ferritina sérica caracterizam a presença de HH, cujo diagnóstico genético, no entanto, deve ser realizado pela pesquisa de mutações nos genes relacionados à doença (*HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1*). A pesquisa de mutações no gene *HFE* (p.C282Y e p.H63D) é a principal solicitação realizada no intuito de estabelecer o diagnóstico da alteração molecular (CAMASCHELLA et al., 2000; PIETRANGELO, 2010; WEISS, 2010).

A biópsia hepática é um teste de referência para mensurar diretamente a concentração hepática de ferro. Permite uma sensível análise quantitativa e avalia também a histologia hepática. Em contrapartida, consiste em um método invasivo, não isento de complicações, que requer técnicas laboratoriais padronizadas e

profissionais especializados. Tem sido proposto a não indicação da biópsia hepática em pacientes portadores de genótipo homozigoto para a mutação p.C282Y: que apresente atividade normal nas transaminases e concentração de ferritina sérica <1.000 µg/L e que não apresente hepatomegalia. No entanto, quando os testes laboratoriais revelam concentrações de ferritina >1.000 µg/L ou atividade anormal das enzimas hepáticas, a biópsia hepática deve ser realizada para se avaliar o grau de lesão hepática, fibrose ou cirrose (BASSETT, HALLIDAY e POWELL, 1986; GUYADER et al., 1998; NEMETH e GANZ, 2009).

Em relação ao tratamento da HH, a flebotomia terapêutica é mais segura, eficaz e econômica (MCDONNELL et al., 1999). Consiste da remoção inicial de sangue (350-450 mL, contendo 200-250 mg de ferro), uma ou duas vezes por semana, dependendo do paciente e do grau de sobrecarga. O objetivo é obter um estado de depleção de ferro, ou seja, atingir concentrações séricas de ferritina <50 µg/L e saturação transferrina <50%. Quando estas concentrações forem alcançadas, o paciente começa a fase de manutenção (normalmente, uma retirada sanguínea a cada 1-3 meses). É importante destacar que os pacientes que começam a flebotomia antes do início da fase irreversível de danos nos órgãos apresentam expectativa de vida normal (CAMASCHELLA et al., 2000). No entanto, o carcinoma hepatocelular é a causa de morte mais comum nos doentes diagnosticados em estados cirróticos (NJAJOU, ALIZADEH e VAN DUIJN, 2004). Quando a flebotomia não é viável (por exemplo, devido à presença de anemia ou outras doenças, tais como disfunções cardíacas, hepáticas avançadas ou cirrose), agentes quelantes de ferro devem ser utilizados (FRANCHINI, GANDINI e APRILI, 2000; FRANCHINI e VENERI, 2004 PIETRANGELO, 2010).

A classificação da HH é realizada de acordo com a alteração genética encontrada, sendo os casos de HH divididos em tipos: 1, 2A, 2B, 3 e 4 (Tabela 2). No entanto, esta classificação não inclui alterações raras em outros genes, além dos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* (NEMETH e GANZ, 2009).

Tabela 2. Alterações genéticas relacionadas à fisiopatologia da hemocromatose hereditária

Tipo de HH	Gene relacionado	Referência
1	<i>HFE</i>	(FEDER et al., 1996)
2A	<i>HJV</i>	(PAPANIKOLAOU et al., 2004)
2B	<i>HAMP</i>	(PARK et al., 2001)
3	<i>TFR2</i>	(KAWABATA et al., 1999)
4	<i>SLC40A1</i>	(DONOVAN et al., 2000)

*HFE*: codifica a proteína HFE, *HJV*: codifica a proteína hemojuvelina, *HAMP*: codifica o polipeptídeo hepcidina, *TFR2*: codifica a proteína TFR2 e *SLC40A1*: codifica a proteína ferroportina.

#### 1.4 Alterações nos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1*

##### Mutações no gene *HFE*

Várias mutações foram descritas no gene *HFE* (p.C282Y, p.H63D, p.S65C, p.V53M, p.V59M, p.Q127H, p.R330M, p.I105T, p.G93R, p.Q283P), porém as mais pesquisadas e frequentes em pacientes portadores de HH são as p.C282Y e p.H63D. Pacientes com sobrecarga de ferro e com presença de mutações no gene *HFE* são caracterizados como portadores de HH tipo 1 (WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007; ALEXANDER e KOWDLEY, 2009; CAMASCHELLA e POGGIALI, 2009; ROCHETTE et al., 2010).

A associação entre a mutação p.C282Y no gene *HFE* e a presença de HH foi elucidada através do estudo de Feder e colaboradores (1996), que identificaram 83% dos pacientes apresentando genótipo homozigoto mutado 282YY (FEDER et al., 1996). Esta mutação acarreta a troca da tirosina por cisteína na posição 282 da proteína HFE. Já a mutação p.H63D consiste na troca de histidina por ácido aspártico na posição 63 da proteína HFE (FEDER et al., 1996).

A prevalência da p.C282Y é alta nas populações caucasianas, especialmente no norte europeu, apresentando frequência do alelo mutado (282Y) de aproximadamente 10%. Estima-se que 5 em 1.000 pessoas (0,5%) apresentem o genótipo homozigoto mutado (282YY) (WAALLEN, NORDESTGAARD e BEUTLER,

2005). Já na população africana e asiática, a mutação p.C282Y é rara (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1997; ROCHETTE et al., 2010).

Estudos demonstraram que o genótipo homocigoto para a mutação p.C282Y (p.C2822Y / p.C282Y) é encontrado em mais de 90% dos doentes com HH no norte europeu e em mais de 80% dos norte-americanos (BRISSOT et al., 1999; CAZZOLA, 2002). A prevalência desta mutação, em pacientes com sobrecarga de ferro primária, diminui do norte para o sul da Europa, apresentando frequências de 96% na Grã-Bretanha (BRISSOT et al., 1999), de 64% na Itália (CARELLA et al., 1997) e de 39% na Grécia (PAPANIKOLAOU et al., 2004).

A mutação p.H63D tem distribuição mundial, com frequência alélica de aproximadamente 20% na Europa (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1997). Esta mutação não foi associada ao maior risco de HH quando o indivíduo apresenta apenas esta alteração genética em heterocigose. Entretanto, quando em heterocigose composta com a mutação p.C282Y (p.C2822Y / p.H63D), o indivíduo apresenta risco elevado de desenvolver HH, sendo muitas vezes comparados ao risco de um indivíduo portador do genótipo p.C2822Y / p.C282Y (BEUTLER, 1997; CARELLA et al., 1997).

Outra mutação no gene *HFE* é a p.S65C, troca de serina por cisteína, que foi encontrada em pacientes com sobrecarga de ferro em frequência alélica de aproximadamente 1,0%; porém, não há diferença significativa entre as frequências em pacientes portadores de HH e em indivíduos saudáveis (BARTON et al., 1999; MURA, RAGUENES e FEREC, 1999).

O mecanismo pelo qual a mutação p.C282Y está associada à sobrecarga de ferro tem sido explicado por duas hipóteses. Uma delas considera que a proteína HFE forma um complexo com o TFR1 e diminui a afinidade do receptor pela transferrina (FEDER et al., 1998; LEBRON et al., 1998). Deste modo, quando há a mutação p.C282Y, ocorre a troca do aminoácido que interfere na ligação da ponte dissulfeto entre a proteína HFE e a  $\beta 2M$ . Como consequência desta alteração, a transferrina permanece livre para ligar-se ao seu receptor, acarretando a sobrecarga de ferro (FEDER et al., 1997; WEISS, 2010). Esta hipótese tem sido questionada em estudos mais recentes, que sugerem que a associação de HFE com TFR1 não seria essencial para a sua função (ZHANG et al., 2003). A outra hipótese sugere que a mutação p.C282Y isoladamente ou em heterocigose com a mutação p.H63D estaria associada com a diminuição da síntese hepática da hepcidina, que,

consequentemente, aumentaria a absorção de ferro via ferroportina (BRIDLE et al., 2003; NEMETH et al., 2004; PIETRANGELO et al., 2005; VUJIC SPASIC et al., 2008). Um estudo demonstrou que os pacientes com HH e portadores de genótipo p.C2822Y / p.C282Y apresentam menores concentrações urinárias de hepcidina quando comparadas com as concentrações urinárias deste polipeptídeo em indivíduos italianos saudáveis (BOZZINI et al., 2008).

### **Mutações nos genes *HJV* e *HAMP***

A presença da sobrecarga de ferro causada por mutações nos genes *HJV* e *HAMP* caracteriza a HH tipo 2, chamada hemocromatose juvenil (HJ). Apenas os estados homozigóticos estão associados à sobrecarga de ferro, enquanto indivíduos com genótipos heterozigóticos para mutações na hepcidina ou hemojuvelina são assintomáticos e têm parâmetros de ferro normais (DE GOBBI et al., 2002; LANZARA et al., 2004; CAMASCHELLA e POGGIALI, 2009). A causa da sobrecarga de ferro nos indivíduos portadores da HJ pode ser explicada pelas diminuições da síntese e das concentrações de hepcidina (CAZZOLA, 2003; LIN, GOLDBERG e GANZ, 2005; SWINKELS et al., 2006; CAMASCHELLA e POGGIALI, 2009).

A HJ, rara dentre os tipos de HH, geralmente causa danos antes dos 20 anos de idade, sendo os mais frequentes cardiomiopatias, hipogonadismo hipogonadotrófico e doenças endócrinas em geral (WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007). É classificada em subtipos 2A e 2B, quando mutações nos genes *HJV* e *HAMP* são as responsáveis, respectivamente (ROETTO et al., 2003; PAPANIKOLAOU et al., 2004; CAMASCHELLA e POGGIALI, 2009).

Algumas mutações no gene *HJV* associadas à HJ foram descritas: p.G320V, p.R326X e p.I222N (PAPANIKOLAOU et al., 2004); p.I281T (HUANG et al., 2004); p.C80R e p.L101P (BARTON et al., 2002; LEE et al., 2004) e a deleção de 4pb a partir do nucleotídeo 980 (GEHRKE et al., 2005). Porém, a mutação p.G320V é a mais frequente em pacientes portadores da HJ em diversos países (LANZARA et al., 2004; LEE et al., 2004; PAPANIKOLAOU et al., 2004; AGUILAR-MARTINEZ et al., 2007; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007; CASTIELLA et al., 2010).

Mutações no gene *HAMP* são causas raras da HJ. Entretanto, desde a primeira descrição, algumas mutações foram encontradas: 93delG, p.R56X, p.R59G, p.C70R, p.G71D e p.C78T (ROETTO et al., 2003; JACOLOT et al., 2004; PORTO et

al., 2005; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007; CASTIELLA et al., 2010). Um estudo descreveu a deleção da guanina na posição 93 do gene *HAMP* (93delG) em duas irmãs afetadas com o tipo 2B da HH, apresentando genótipos homocigotos e seus pais heterocigotos. Em homocigose, esta deleção resulta na formação do peptídeo pró-hepcidina, que tem função anormal (ROETTO et al., 2003). Também foram descritas, em pacientes portadores do subtipo 2B, as mutações p.R56X (ROETTO et al., 2003) e p.G71D no gene *HAMP* (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 2003).

Além disso, alguns estudos suportam um conceito de interação digênica entre os genes *HJV* e *HAMP* e o gene *HFE*, onde mutações se somariam, acarretando ou agravando o fenótipo da sobrecarga de ferro (BIASIOTTO et al., 2004; JACOLOT et al., 2004; LEE et al., 2004; ROCHETTE et al., 2010).

O conhecimento das vias moleculares que regulam a síntese da hepcidina ainda é limitado, porém a análise da origem genética de pacientes com hemocromatose do tipo juvenil tem permitido algumas conclusões. A proteína hemojuvelina foi identificada como membro da família dos correceptores de moléculas BMP (*bone morphogenetic protein*) (BABITT et al., 2006) e vários estudos têm reportado que principalmente BMP6 são eficientes indutores de hepcidina *in vitro* (LIN et al., 2007; TRUKSA et al., 2007; ANDRIOPOULOS et al., 2009; MEYNARD et al., 2009). A hemojuvelina age como correceptor de BMP, aumentando a fosforilação das proteínas SMAD (sinalizadoras que são ativadas por receptores BMP) e a formação da proteína complexa SMAD que estimula a transcrição da hepcidina (WANG et al., 2005; BABITT et al., 2007; KAUTZ et al., 2008). Deste modo, mutações nos genes *HJV* e *HAMP* acarretam alterações na sinalização via BMP/SMAD e na síntese de hepcidina, resultando em grave sobrecarga de ferro no organismo (DE DOMENICO, WARD e KAPLAN, 2007; DE DOMENICO, MCVEY WARD e KAPLAN, 2008; PAGANI et al., 2008; LEE e BEUTLER, 2009; NEMETH e GANZ, 2009; ZHANG et al., 2009; ROCHETTE et al., 2010).

### **Mutações no gene *TFR2***

A HH tipo 3 apresenta herança autossômica recessiva, assim como a HH relacionada ao gene *HFE*, e é causada por mutações no gene *TFR2* (GANZ, 2004). Foi sugerido que a proteína TFR2, expressa seletivamente no fígado, esteja

relacionada com a absorção de ferro nos hepatócitos, através de um mecanismo de endocitose mediado por receptor, podendo, assim, regular a síntese de hepcidina (KAWABATA et al., 1999; FRAZER e ANDERSON, 2005). Estudos mostraram que pacientes portadores de HH tipo 3 apresentam menores concentrações urinárias de hepcidina em relação aos indivíduos controles (KAWABATA et al., 2005; NEMETH et al., 2005; CAMASCHELLA e POGGIALI, 2009).

Algumas mutações foram descritas no gene *TFR2* em pacientes com fenótipo da sobrecarga de ferro (p.Y250X, p.E60X, p.M172K, p.R455Q e p.Q690P) (CAMASCHELLA et al., 2000; ROETTO et al., 2001; HOFMANN et al., 2002; MATTMAN et al., 2002; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007; CASTIELLA et al., 2010), porém as alterações mais descritas são as p.Y250X e p.Q690P (ROETTO e CAMASCHELLA, 2005).

A mutação nonsense p.Y250X, identificada em duas famílias da Sicília, acarreta a síntese de uma proteína de menor tamanho, comprometendo a função desta (CAMASCHELLA et al., 2000).

A mutação missense p.Q690P foi descrita em homozigose em um paciente português que apresentava quadro grave de sobrecarga de ferro (ferritina 34.000µg/L) e foi detectada também em homozigose em duas irmãs do paciente (MATTMAN et al., 2002). Nesta família, tanto o homem (35 anos) como uma das irmãs (25 anos) apresentavam genótipo homozigoto para p.Q690P e heterozigoto para p.H63D no gene *HFE*. A outra irmã, de 30 anos, apresentava genótipo homozigoto mutado para p.Q690P e genótipo selvagem para p.H63D. Todos os três irmãos apresentavam valores elevados da saturação de transferrina, porém apenas o homem apresentava concentração sérica de ferritina superior a 1.000µg/L (MATTMAN et al., 2002).

### **Mutações no gene *SLC40A1***

A HH tipo 4 apresenta herança autossômica dominante e é causada por mutações no gene *SLC40A1*, que acarretam alterações funcionais na ferroportina, principalmente a diminuição da exportação de ferro por macrófagos do sistema reticuloendotelial. A consequência inicial geralmente é a indisponibilidade de ferro circulante para a transferrina, o que acarreta anemia discreta. No entanto, posteriormente, ocorre a sobrecarga nos tecidos devido ao aumento compensatório

na absorção nos enterócitos pela não liberação de ferro a partir de macrófago. Este estágio mais avançado da HH tipo 4 geralmente ocorre entre a terceira e a quarta décadas de vida (PIETRANGELO, 2006; CAMASCHELLA e POGGIALI, 2009; MAYR et al., 2010).

Desde a descoberta do gene *SLC40A1*, diversas mutações foram descritas, tais como: p.N144H, p.A77D, p.V162X, p.D157G, p.Q182H, p.G323V, p.D181V, p.G80V e p.G267D (MONTOSI et al., 2001; WALLACE et al., 2002; HETET et al., 2003; NJAJOU, ALIZADEH e VAN DUIJN, 2004; CREMONESI et al., 2005; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007; SUSSMAN et al., 2008; CASTIELLA et al., 2010).

### **1.5 Estudos realizados no Brasil**

Alguns estudos avaliaram as frequências das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* em doadores de sangue ou indivíduos saudáveis (AGOSTINHO et al., 1999; PEREIRA, MOTA e KRIEGER, 2001; BARBOSA et al., 2005; BUENO, DUCH e FIGUEIREDO, 2006; TORRES et al., 2008).

Pereira e colaboradores (2001) demonstraram diferenças significativas entre as frequências alélicas para as mutações p.C282Y e p.H63D em indivíduos de 3 grupos étnicos de São Paulo. Os descendentes europeus apresentaram frequências alélicas de 3,7% e 20,3%; os mestiços de 0,7% e 13,0% e os descendentes africanos de 0,5% e 6,4%; para os alelos 282Y e 63D, respectivamente.

Agostinho e colaboradores (2002) avaliaram as frequências das mutações p.C282Y no gene *HFE* em 227 indivíduos: 71 caucasianos, 91 mestiços, 85 descendentes africanos e 75 índios Parakanã. A frequência alélica da mutação p.C282Y foi de 1,4% na população caucasiana, 1,1% nos descendentes africanos, 1,1% nos mestiços e 0% nos índios Parakanã.

Torres e colaboradores (2008) pesquisaram as mutações p.C282Y e p.H63D em indivíduos de 4 estados da região amazônica brasileira e encontraram frequências alélicas de 0,3% e 7,0%, respectivamente.

Barbosa e colaboradores (2005) avaliaram 1.050 doadores de sangue em Minas Gerais, com intuito de identificar aqueles portadores de saturação de transferrina superiores a 45%, os quais foram reavaliados. Doze doadores apresentaram saturação de transferrina >45% após a segunda coleta (realizada em

jejum) e dez fizeram a pesquisa das mutações p.C282Y e p.H63D no gene *HFE*. Quatro doadores apresentaram mutações no gene *HFE*, sendo um homocigoto para mutação p.C282Y, um homocigoto para p.H63D e dois heterocigotos para mutação p.H63D.

Bueno e colaboradores (2006) encontraram frequências alélicas de 1,4%, 10,8% e 1,0% para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C, respectivamente, em 148 doadores de sangue na cidade de São Paulo.

Alguns estudos avaliaram as frequências das mutações em pacientes portadores de hepatite C crônica (MARTINELLI et al., 2000), em cardiomiopatas (PEREIRA et al., 2001), em talassêmicos (OLIVEIRA et al., 2006), em portadores de hemoglobina S (BONINI-DOMINGOS e ZAMARO, 2007) e em portadores de malária (TORRES et al., 2008). Outros estudos foram realizados em pacientes portadores de sobrecarga de ferro (BUENO, DUCH e FIGUEIREDO, 2006; CANÇADO et al., 2007; BITTENCOURT et al., 2009).

Martinelli e colaboradores (1999) avaliaram a prevalência das mutações p.C282Y e p.H63D no gene *HFE* em 135 homens portadores de hepatite C crônica e relacionaram com os parâmetros de ferro e com a gravidade da doença hepática. Destes 135 pacientes, 6 (4,4%) apresentaram a mutação p.C282Y e 32 (23,7%) apresentaram p.H63D. No entanto, estas frequências foram semelhantes às observadas em controles saudáveis.

Pereira e colaboradores (2001) observaram maior prevalência do genótipo heterocigoto para a mutação p.C282Y em pacientes com cardiomiopatia isquêmica em relação aos pacientes com cardiomiopatia de etiologias não-isquêmicas em São Paulo.

O efeito das mutações no gene *HFE* em pacientes portadores de alterações qualitativa (HbS) e quantitativa (talassemias) das globinas, bem como em pacientes portadores de malária, foi estudado em indivíduos brasileiros (OLIVEIRA et al., 2006; BONINI-DOMINGOS e ZAMARO, 2007; TORRES et al., 2008). Elevada frequência da mutação p.C282Y foi observada em portadores de beta talassemia, sugerindo que esta interação pode estar associada com o pior quadro clínico nestes pacientes (OLIVEIRA et al., 2006). A frequência do alelo Y da mutação p.C282Y foi alta em portadores de HbS (8,3%) (BONINI-DOMINGOS e ZAMARO, 2007). Foram identificados apenas 5 portadores de genótipo heterocigoto para a mutação p.C282Y

em 400 portadores de malária e 400 doadores de sangue da região amazônica brasileira (TORRES et al., 2008).

Bueno e colaboradores (2006) estudaram as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C em 8 pacientes com sobrecarga de ferro, identificando 3 pacientes portadores do genótipo homozigoto para a mutação p.C282Y, 1 heterozigoto composto (p.C282Y/p.H63D), 1 heterozigoto para a p.C282Y e 3 que não apresentaram as mutações pesquisadas.

Cançado e colaboradores (2007) encontraram mutações no gene *HFE* (p.C282Y, p.H63D e p.S65C) em 38 de 50 pacientes pesquisados, sendo que as concentrações de ferritina sérica e saturação da transferrina foram significativamente maiores em pacientes com genótipo homozigoto para a mutação p.C282Y. Também a coexistência de hepatite C, do consumo excessivo de bebida alcoólica ou da anemia hemolítica hereditária foi associada ao aumento dos estoques de ferro e indicada como fator de risco adicional em pacientes com mutação no gene *HFE*.

Bittencourt e colaboradores (2009) pesquisaram, pelo Haemochromatosis StripAssay<sup>®</sup>, 12 mutações no gene *HFE* (p.V53M, p.V59M, p.H63D, p.H63H, p.S65C, p.Q127H, p.P160delC, p.E168Q, p.E168X, p.W169X, p.C282Y e p.Q283), 4 mutações no gene *TFR2* (p.E60X, p.M172K, p.Y250X, AVAQ594-597del) e 2 mutações no gene *SLC40A1* (p.N144H e p.V162X) em 19 indivíduos portadores de sobrecarga de ferro. Nenhuma alteração nos genes *HFE*, *TFR2* e *SLC40A1* foi encontrada, além das mutações p.C282Y e p.H63D no gene *HFE*. Para a mutação p.C282Y, 9 pacientes apresentaram genótipo homozigoto e 1 apresentou genótipo heterozigoto. Dois pacientes apresentaram genótipo heterozigoto para a p.H63D e 1 apresentou o genótipo p.C282Y / p.H63D.

## 1.6 Justificativa

Até o momento não é conhecido o efeito genotípico para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C sobre os fenótipos parâmetros bioquímicos que avaliam o estado de ferro em brasileiros doadores de sangue. Além disso, existem poucos estudos que avaliam o potencial da alteração p.H63D em acarretar distúrbios no metabolismo de ferro em indivíduos considerados saudáveis.

No estudo de Cançado e colaboradores (2007) é possível observar maior frequência de pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária não-relacionados à mutação *HFE* p.C282Y, em comparação a estudos realizados em países onde a doença é frequente. Além disso, no Brasil, não há estudos que rastrearam mutações em genes associados à HH (genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1*) por sequenciamento genético. Neste contexto, faz-se necessária a identificação das características genéticas desta população, uma vez que mutações nos genes da hemojuvelina, da hepcidina, do receptor de transferrina 2 e da ferroportina podem estar presentes. Achados que auxiliariam no entendimento da fisiopatologia e no diagnóstico genético da HH.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos do estudo realizado com os doadores de sangue**

Determinar as frequências das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* e das mutações p.Q690P e p.Y250X no gene *TFR2* em doadores de sangue.

Avaliar os efeitos das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* nas concentrações dos parâmetros do ferro em doadores de sangue.

### **2.2 Objetivo do estudo realizado com os pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária**

Pesquisar mutações nos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* em pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

Foram selecionados, randomicamente, 542 doadores de sangue provenientes do Hemocentro da Santa Casa (São Paulo, SP).

Foram incluídos 51 pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária provenientes do Ambulatório do Hemocentro da Santa Casa (São Paulo, SP) e do Hospital Novo Atibaia (Atibaia, SP).

Foram convidados a participar da pesquisa os familiares de pacientes que apresentaram mutações ainda não descritas na literatura e com possível efeito funcional.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; pelo CEP da Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo (Dr. Rodolfo Delfini Cançado, colaborador vinculado à instituição); e pelo CEP do Hospital Novo Atibaia (Dr. Isolmar Tadeu Schettert, colaborador vinculado à instituição) (Anexo 1).

Os doadores e os pacientes foram informados sobre o projeto e consultados quanto à vontade de participar deste estudo. Sendo favoráveis, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). Posteriormente, foi aplicado um questionário a cada participante para se obter as seguintes informações: idade, sexo, nacionalidade, naturalidade, descendência, escolaridade, ocupação, número de doações nos últimos 12 meses, sinais e sintomas de sobrecarga de ferro (palidez, fraqueza, dor abdominal, hepatomegalia, palpitação, etc), histórico de transfusão sanguínea, consumo de bebida alcoólica, uso de medicamentos com ferro e outros medicamentos. Para as mulheres, ainda foram avaliados os dados referentes à história reprodutiva e à perda sanguínea (Anexo 3).

Para a classificação étnica, cada indivíduo se autoidentificou como branco, pardo (mestiço), negro, amarelo ou índio, de acordo com o Censo Demográfico brasileiro ([www.ibge.gov.br/home/estatística/população/](http://www.ibge.gov.br/home/estatística/população/) acesso em 23 de agosto de 2010) (PARRA et al., 2003; VARGENS et al., 2008).

Os doadores foram classificados em três grupos, de acordo com a frequência de doação de sangue. O grupo 1 foi formado por indivíduos que nunca doaram sangue, no grupo 2 foram incluídos os indivíduos que doaram sangue, porém a

última doação foi há mais de 12 meses, e no grupo 3 foram incluídos os doadores regulares de sangue, ou seja, aqueles indivíduos que doaram uma ou mais vezes nos últimos 12 meses.

### **Crítérios de inclusão e de exclusão**

Foram incluídos os doadores de sangue que aceitaram participar do estudo e que preencheram os critérios legais para doação de sangue vigentes no país (ANVISA, RDC 153, 2004). Os voluntários participantes, com idade, no mínimo, de 18 anos e, no máximo, de 65 anos 11 meses e 29 dias, apresentaram valores de hematócrito maiores que 39% e 38% para homens e mulheres, respectivamente; e cumpriram todos os demais critérios da resolução acima.

Foram incluídos os pacientes com sobrecarga de ferro primária que apresentaram valores de saturação de transferrina  $\geq 50\%$  para mulheres e  $\geq 60\%$  para homens, resultados estes obtidos antes de iniciadas as flebotomias (ADAMS, 2000; LE GAC et al., 2003; AGUILAR-MARTINEZ, SCHVED e BRISSOT, 2005; BRISSOT et al., 2008).

Foram excluídos os pacientes que apresentaram sorologia positiva para hepatite C, hepatite B, hepatopatia alcoólica, anemias hemolíticas (talassemias, esferocitose hereditária, anemia falciforme, entre outras), transfusões sanguíneas repetidas e resistência insulínica não resultante da HH. Também foram excluídos os pacientes que apresentaram quaisquer indícios e/ou conhecimento de patologias associadas à sobrecarga secundária, segundo avaliação médica do histórico clínico, dos exames clínicos e laboratoriais (Quadro 1).

A hemocromatose hereditária pode acarretar alterações em enzimas hepáticas, gerar resistência insulínica, além de outros sintomas; portanto, seu diagnóstico diferencial foi realizado pelo médico responsável, de acordo com a sintomatologia e as características específicas de cada doença - não sendo a alteração laboratorial o único critério para a exclusão ou inclusão do paciente.

Quadro 1. Causas secundárias de sobrecarga de ferro e testes laboratoriais utilizados para sua identificação

<b>Causas secundárias</b>	<b>Identificação clínica e/ou laboratorial</b>
Hepatite C	Sorologia - Kit Murex anti-HCV <sup>®</sup> (Murex Biotech S.A, South Africa).
Hepatite B	Sorologia - Kit Hepanostika anti-HBc Uni-Form <sup>®</sup> (BioMérieux, Boxtel, Netherlands) e kit Hepanostika HbsAg Uni-FormII <sup>®</sup> (BioMérieux, Boxtel, Netherlands).
Hepatopatia alcoólica ou etilismo	GGT, AST, ALT, albumina, proteínas totais, histórico detalhado de abuso de álcool (consumo excessivo: >60,0 g/dia, (SCOTET et al., 2003).
Anemias hemolíticas (talassemias, esferocitose hereditária, anemia falciforme, entre outras)	Pesquisas de hemoglobinas variantes e talassemias (eletroforese quantitativa e qualitativa) em pH alcalino; eletroforese em pH ácido; hemograma, taxa de reticulócitos e provas específicas adicionais se necessárias para diagnóstico diferencial (NAOUM et al., 1980; PIPERNO, 1998).
Transfusões repetidas	Histórico do paciente.
Resistência insulínica	Glicose, insulina, histórico e clínica do paciente (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006).

A identificação destas causas secundárias foi interpretada pelo médico responsável, através das avaliações do histórico clínico e dos exames clínicos e laboratoriais de cada paciente.

### **3.2 Amostras biológicas**

Foram coletados 20 mL de sangue de cada indivíduo por punção venosa em jejum. Dois tubos a vácuo BD Vacutainer System<sup>®</sup> com anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA (0,15 mg/mL, Becton Dickinson, USA) foram utilizados para as análises genéticas e para a pesquisa de hemoglobinas variantes e talassemias. Tubo a vácuo BD Vacutainer

System<sup>®</sup> sem anticoagulante foi utilizado para obtenção de soro e para realização dos seguintes exames laboratoriais, quando necessários: ferro sérico (FS), capacidade total de ligação com ferro (CTLF), ferritina sérica, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, glicose e provas sorológicas para detecção de hepatites B e C.

### **3.3 Metodologia laboratorial**

#### **3.3.1 Determinações hematológicas e bioquímicas**

A determinação do hemograma foi obtida por um contador eletrônico Cell-Dyn<sup>®</sup> (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA), calibrado regularmente com controles interno (fornecido pela Abbott) e externo (PNCQ - Programa Nacional de Controle de Qualidade da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas). As pesquisas de hemoglobinas variantes e talassemias foram realizadas por eletroforese quantitativa e qualitativa em acetato de celulose em pH alcalino (tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6) (MARENGO-ROWE, 1965); e eletroforese em pH ácido (pH 6,2, ágar como suporte) (VELLA, 1968) pela pesquisadora científica Regina Alexandre Pagliusi, no Laboratório I do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, SP.

As determinações séricas de ferro, creatinina e glicose e as atividades das enzimas AST e ALT foram realizadas pelo sistema automatizado ADVIA 1650<sup>®</sup> (Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, EUA).

O método de Goodwin modificado (GOODWIN e MURPHY, 1966) foi utilizado para dosar a CTLF e a saturação de transferrina foi obtida através da divisão dos valores de FS pela CTLF, expressa em percentagem. A concentração da ferritina sérica foi realizada pelo kit AxSYM System<sup>®</sup> (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA) que utiliza o ensaio imunoenzimático.

Para os testes imunológicos foram utilizados: kits Hepanostika anti-HBc Uni-Form<sup>®</sup> e Hepanostika HbsAg Uni-FormII<sup>®</sup> (BioMérieux, Boxtel, Netherlands) para a determinação da hepatite B e kit Murex anti-HCV<sup>®</sup> (Murex Biotech S.A, South Africa) para a determinação da hepatite C.

### 3.3.2 Extração e avaliação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico pelo método de precipitação salina proposto por Salazar e colaboradores (1998), segundo o protocolo descrito abaixo.

As amostras de sangue total foram submetidas à lise celular com tampão Tris1 (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; KCl 1M; MgCl<sub>2</sub> 1M; EDTA 0,5M; adicionado de Triton X-100 a 2,75%), homogeneizando várias vezes por inversão. Posteriormente e após centrifugação, os núcleos dos leucócitos foram lisados com tampão Tris2 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; KCl 1M; MgCl<sub>2</sub> 1M; EDTA 0,5M; NaCl 5M), adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e incubado a 56°C por 15 minutos. As proteínas foram removidas por precipitação salina com NaCl 5M e a suspensão foi centrifugada durante 5 minutos a 12.000 rpm. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado com a adição de etanol absoluto gelado por inversão do tubo. O tubo foi colocado -20°C por no mínimo 30 minutos para auxiliar a precipitação do DNA. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 12.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70% três vezes e ressuspenso em tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 1M; EDTA 0,5M). Finalmente, as amostras foram incubadas a 56°C por 15 minutos, a fim de hidratar o DNA, e armazenadas a -20°C.

As amostras de DNA foram submetidas à análise quantitativa por espectrofotometria em ultravioleta (Beckman, Fullerton, CA, EUA) a 260nm; e a pureza do DNA foi determinada pela relação das absorbâncias  $A_{260nm}/A_{280nm}$  (SAMBROOCK e RUSSEL, 2001).

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (ácido bórico 90mM; EDTA 2M, pH 8,0; Tris-HCl a 90mM) em cuba de eletroforese horizontal a 100 V, 60 mA e 30 minutos de migração (Gibco BRL, Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD, EUA). Em cada poço do gel foram aplicados 5µL de solução - 5µL de amostra de DNA junto a 2µL de tampão de amostra de DNA (glicerol a 30%, azul de bromofenol a 0,25%). Marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb foi utilizado como referência (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz ultravioleta, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5mg/mL) (SAMBROOCK e RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagens (Chemilmager® 4400 v5.5), parte integrante do sistema de digitalização de imagens Multimage® Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

### 3.3.3 Análises das mutações

As análises dos genótipos para as mutações no gene *HFE* (p.C282Y, p.H63D e p.S65C) e no gene *TFR2* (p.Q690P e p.Y250X) foram realizadas por amplificação do DNA genômico, através da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase chain reaction*), e os produtos gerados foram submetidos à restrição enzimática alelo-específica (RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*).

As reações foram otimizadas no termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, German).

Nos ensaios da PCR foram utilizados 50-200 ng de DNA, iniciadores a 10 µM (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil; Imprint Genetics Corporation, Miami/FL, EUA), dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) a 0,2 mM (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), 1,0 U de Taq DNA polimerase e tampão específico da enzima (Biotools, Madri, Espanha; Fermentas Inc., MD, EUA); em volume final de 50 µL completado com água ultrapura autoclavada.

Foram utilizados, como previamente descritos, os iniciadores para as mutações *HFE* p.C282Y (BEST, HARRIS e SPRIGGS, 2001) e *TFR2* p.Y250X (ROETTO et al., 2001). Porém, os iniciadores utilizados para as genotipagens das mutações *HFE* p.H63D e *HFE* p.S65C (MURA et al., 1997) e *TFR2* p.Q690P (MATTMAN et al., 2002) foram modificados neste estudo pelo programa Primer Premier® v. 5.0 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) segundo sequências previamente descritas.

### **3.3.3.1 Mutação p.C282Y no gene *HFE***

O tamanho do produto da PCR é de 390 pb e foi analisado em gel de agarose a 1% utilizando-se como referência um marcador molecular de 100 pb (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), a fim de confirmar o tamanho do fragmento.

A digestão enzimática do produto da PCR foi realizada em banho-maria a 37°C por 4 horas utilizando a enzima *RsaI*, em volume final de reação de 20 µL. Após a restrição enzimática foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% em cuba de eletroforese submersa, aplicando-se o produto da restrição enzimática juntamente com tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOCK e RUSSEL, 2001). As condições de migração eletroforética foram de 100 V, 60 mA e tempo de 1 hora. Os fragmentos de DNA foram visualizados e fotodocumentados sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL).

A digestão do produto da PCR da mutação p.C282Y, pela enzima de restrição *RsaI*, gerou 2 fragmentos na presença do alelo selvagem 282C (250 e 140 pb). Na presença do alelo mutado 282Y, a enzima de restrição cliva o produto da PCR em 3 fragmentos (250, 111 e 29 pb). O fragmento de 250 pb, presente em todos os genótipos, é resultante de um sítio constitutivo para a enzima utilizada (Figuras 3 e 4).

### **3.3.3.2 Mutações p.H63D e p.S65C no gene *HFE***

Para as genotipagens das mutações p.H63D e p.S65C no gene *HFE*, as sequências dos iniciadores descritos por Mura e colaboradores (1997) (MURA et al., 1997) foram modificadas utilizando o programa Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, EUA), de modo que o fragmento amplificado apresentasse os 2 sítios polimórficos. Sendo as sequências: 5'-TGTTGCTCTGTCTCCAGGTTCA-3' e 5'-ACAACCACAGCAAGGGTATGT-3'. Os genótipos dessas mutações foram obtidos pelo método da PCR-RFLP e o produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1%, utilizando-se como referência um marcador molecular de 100 pb (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), a fim de confirmar o tamanho do fragmento obtido de 287 pb.

A digestão enzimática do produto da PCR foi realizada em banho-maria a 37° C por 4 horas utilizando a enzima *Mbol*, para a mutação p.H63D e a enzima *Hinfl* para a mutação p.S65C. Após a restrição enzimática foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% em cuba de eletroforese submersa, aplicando-se o produto da restrição enzimática juntamente com tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOCK e RUSSEL, 2001). As condições de migração eletroforética foram de 100 V, 60 mA e tempo de 1 hora. Os fragmentos de DNA foram visualizados e fotodocumentados sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL).

A digestão do produto da PCR da mutação p.H63D, pela enzima de restrição *Mbol*, gerou 3 fragmentos na presença do alelo selvagem 63H (126, 99 e 62 pb). Na presença do alelo mutado 63D, a enzima clivou o produto da PCR em 2 fragmentos (62 e 225 pb). O fragmento de 62 pb, presente nos 3 genótipos, é resultante de um sítio constitutivo para a enzima utilizada (Figuras 5 e 6).

Para a mutação p.S65C, a digestão do produto da PCR, pela enzima de restrição *Hinfl*, gerou, na presença do alelo selvagem 65S, 4 fragmentos (133, 79, 69 e 6 pb). Na presença do alelo mutado 65C, a enzima clivou o produto da PCR em 3 fragmentos (202, 79 e 6 pb). Os fragmentos de 6 e 79 pb estão presentes nos 3 genótipos e são resultantes de sítios constitutivos para a enzima *Hinfl* (Figuras 7 e 8). A fim de confirmar o tamanho de cada fragmento, foi utilizado um marcador molecular de 50 pb (Promega Corporation, Madison, EUA).

### **3.3.3.3 Mutações p.Q690P e p.Y250X no gene *TFR2***

Nas genotipagens da mutação p.Q690P, as sequências dos iniciadores descritas por Mattman e colaboradores (2002) (MATTMAN et al., 2002) foram modificadas utilizando-se o programa Primer Premier® v.5.0 (Premier Biosoft International, EUA), gerando as sequências: 5'-CTCCAGCACTCTGTCCTCGTCTA-3' e 5'-GCGATCAAAGTGATGAAATGGA-3'. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% a fim de confirmar o tamanho do fragmento obtido de 498 pb.

A restrição enzimática do produto da PCR foi realizada em banho-maria a 37° C por 4 horas utilizando dupla digestão, enzimas *Bfal* e *HpaII*; e o tampão utilizado foi o NEB 4 (Tris-acetato a 20 mM; Acetato de potássio a 50 mM; Acetato de magnésio a 10 mM), que acompanha a enzima *Bfal*.

Os produtos da restrição foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em TBE 1X (Tris-HCl 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM, pH8,0) a 120 V, 15 mA (cada placa) e tempo de 4 horas. Posteriormente, o gel foi corado com nitrato de prata (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) e fotodocumentado.

A dupla digestão foi necessária porque os fragmentos obtidos apenas com a enzima *Hpa*II apresentaram tamanhos semelhantes (201 e 203 pb), não sendo possível visualizar os 3 genótipos nas eletroforeses em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida. Com a dupla digestão do produto da PCR da mutação p.Q690P, foram gerados 5 fragmentos (203, 106, 94, 70 e 25 pb) na presença do alelo selvagem 690Q. Na presença do alelo mutado 690P, as enzimas clivaram o produto da PCR em 6 fragmentos (181, 106, 94, 70, 25 e 22 pb). Os fragmentos de 106, 94, 70 e 25 pb são resultantes de sítios constitutivos para as enzimas (Figuras 9 e 10).

Para a mutação p.Y250X, o tamanho do produto da PCR é de 405 pb e sua digestão enzimática foi realizada em banho-maria a 37° C por 4 horas utilizando a enzima *Bfa*I. Os produtos da restrição enzimática foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, a 100 V, 60 mA e tempo de 1 hora. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo e fotodocumentado.

A digestão do produto da PCR da mutação p.Y250X pela enzima de restrição *Bfa*I gerou 2 fragmentos na presença do alelo selvagem 250Y (282 e 123 pb). Na presença do alelo mutado, a enzima de restrição clivou o produto da PCR em 3 fragmentos (178, 123 e 104 pb). O fragmento de 123 pb é resultante de um sítio constitutivo para a enzima utilizada, estando presente nos 3 genótipos (Figuras 11 e 12).

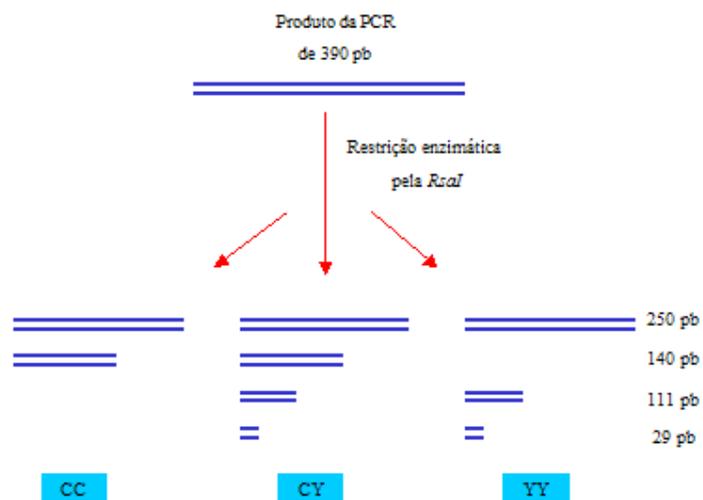


Figura 3. Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.C282Y no gene *HFE*.

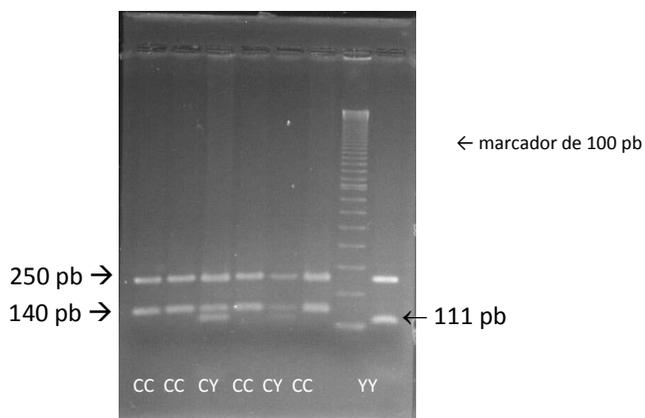


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição enzimática (enzima *RsaI*) para a mutação p.C282Y.

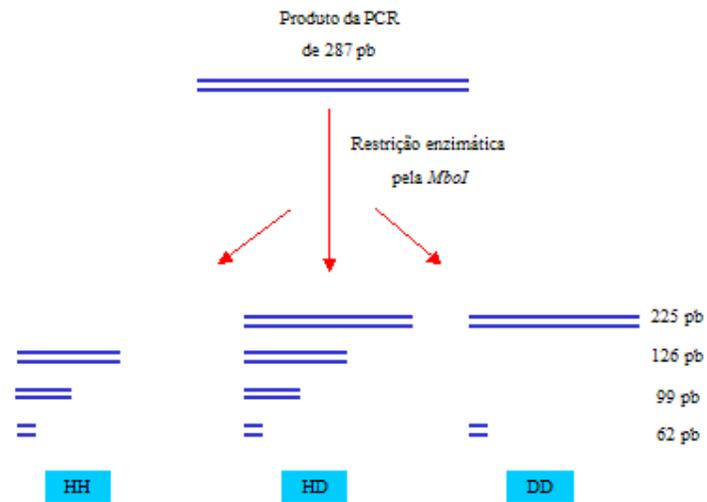


Figura 5. Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.H63D no gene *HFE*.

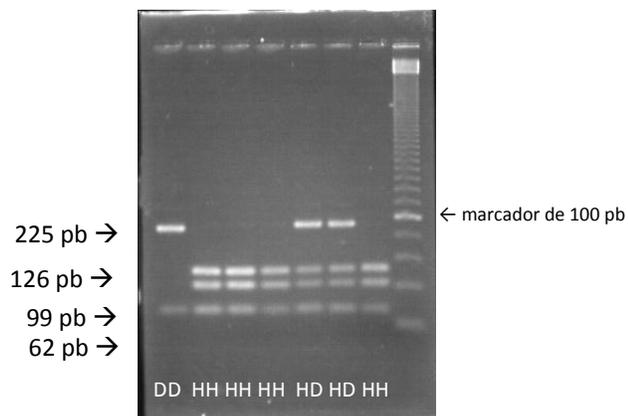


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da restrição enzimática (enzima *MboI*) para a mutação p.H63D.

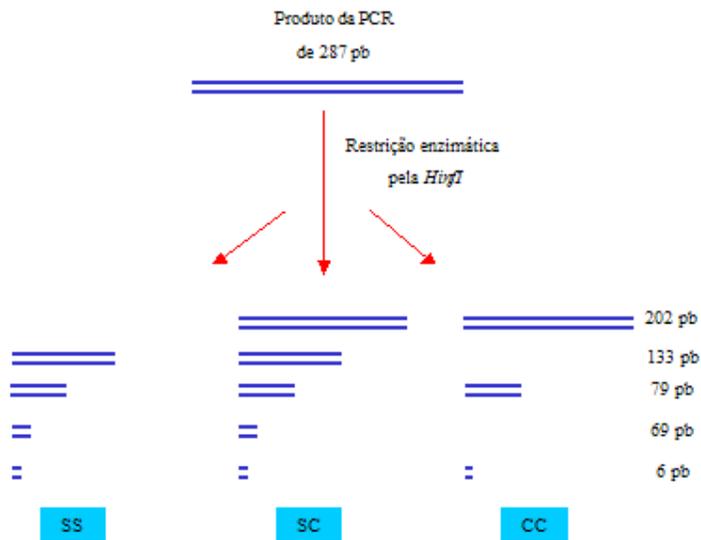


Figura 7. Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.S65C no gene *HFE*.

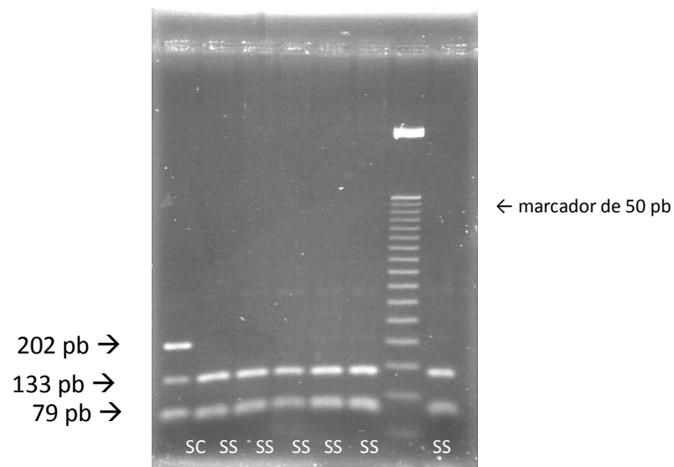


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição enzimática (enzima *HinfI*) para a mutação p.S65C.

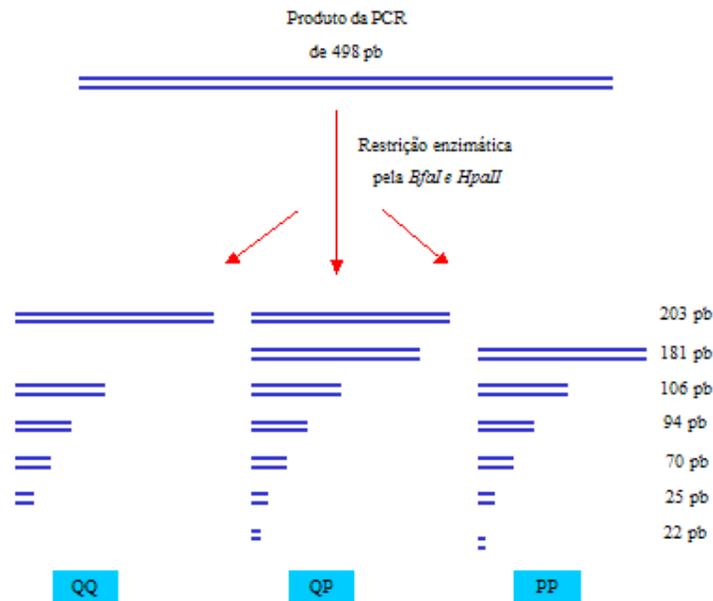


Figura 9. Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.Q690P no gene *TFR2*.

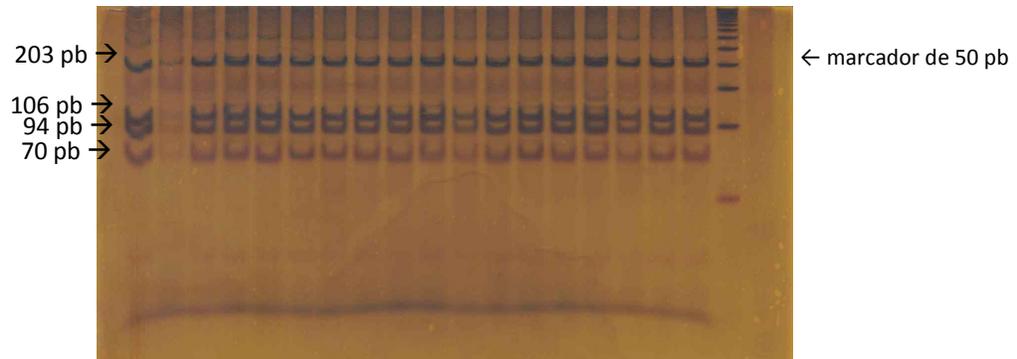


Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, dos produtos de restrição enzimática (enzimas *Bfal* e *HpaII*) para a mutação p.Q690P (apenas o genótipo selvagem foi encontrado).

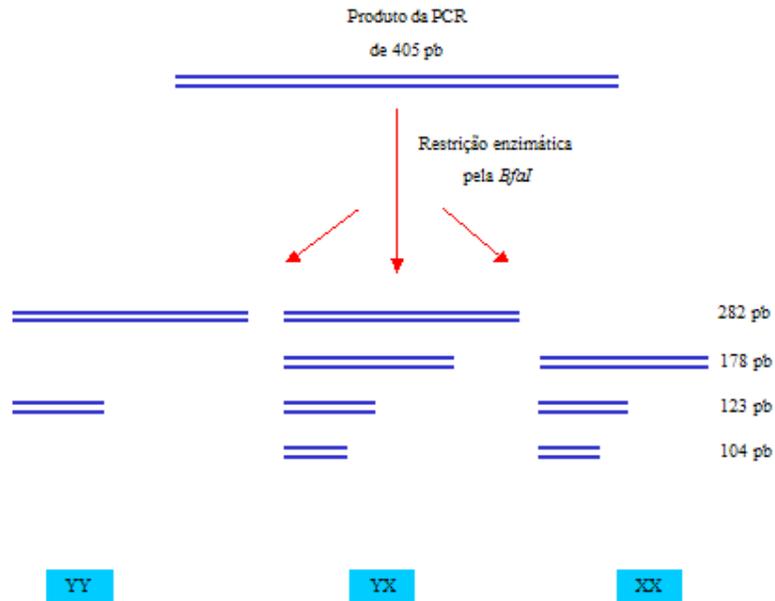


Figura 11. Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção da mutação p.Y250X no gene *TFR2*.

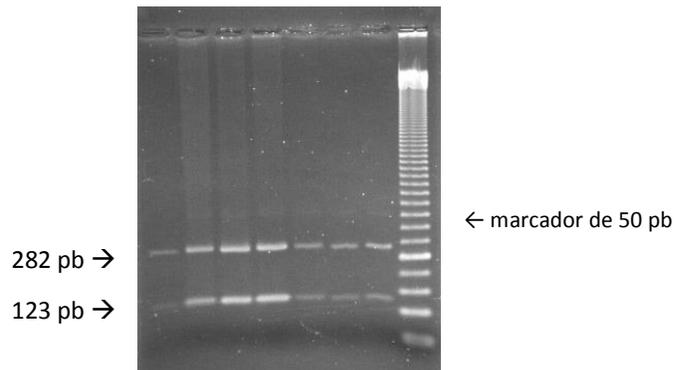


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição enzimática (enzima *BfaI*) para a mutação p.Y250X (apenas o genótipo selvagem foi encontrado).

### **3.3.4 Rastreamento das mutações nos genes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* por sequenciamento**

Os sequenciamentos genéticos foram desenvolvidos em colaboração com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas de São Paulo.

Para a amplificação dos fragmentos dos 6 éxons do gene *HFE* foram utilizados 6 pares de iniciadores. Já para os genes *HJV* (4 éxons), *HAMP* (3 éxons), *TFR2* (18 éxons) e *SLC40A1* (8 éxons) foram utilizados iniciadores previamente descritos (LEE et al., 2004), (ZAAHL et al., 2004), (LEE et al., 2001), (KOYAMA et al., 2005), respectivamente. Os iniciadores, o tamanho do fragmento gerado e as temperaturas de hibridização para cada par dos iniciadores estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Na padronização inicial da PCR, para posterior reação de sequenciamento, foi realizada gradiente de temperatura de hibridação para cada par de iniciadores, utilizando termociclador DNA Engine Tetrad 2<sup>®</sup> (MJ Research, MA, EUA).

Nas PCR foram utilizados 50-200 ng de DNA, iniciadores a 5  $\mu$ M (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil), dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) a 0,2 mM (Amersham Biosciences, NJ, EUA), 0,03 U de Taq DNA polimerase e tampão específico da enzima (Ultra Chem<sup>®</sup>, São Paulo/SP, Brasil) em volume final de 10  $\mu$ L completado com água ultrapura autoclavada.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o reagente ExoSAP-IT<sup>®</sup> (GE Healthcare, NJ, EUA), conforme sugestão do fabricante (2  $\mu$ L do reagente para 5  $\mu$ L de produto da PCR).

O sequenciamento direto bidirecional e as reações sense e antissense para cada éxon foram realizados utilizando-se o kit Big Dye Terminator Sequencing<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o Sequenciador ABI 3500XL Sequencer<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para 3  $\mu$ L de produto da PCR purificados, foram adicionados 2  $\mu$ L da solução reagente Big Dye<sup>®</sup>; 2,4  $\mu$ L do tampão Big Dye; 1  $\mu$ L dos iniciadores (sense ou antissense); 3,6  $\mu$ L de água ultrapura para volume final de 12  $\mu$ L.

Para a reação de sequenciamento foi utilizada a ciclagem de 96 °C por 3 minutos (denaturação inicial) e 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 10 segundos, 60°C por 4 minutos.

Após a reação, as amostras foram precipitadas adicionando-se 80 µL de etanol 70%, mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 4.000 rpm durante 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 120 µL de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi completamente descartado, e as amostras aquecidas a 96 °C por 2 minutos. Foram adicionados 2 µL de uma mistura contendo formamida e tampão na proporção de 4:1, aquecidas a 96 °C por 3 minutos. As amostras permaneceram no gelo até aplicação.

Para preparo do gel utilizado na corrida foram homogeneizados por 15 minutos: 9 g de ureia; 2,5 mL de *long ranger*; 2,5 mL de tampão TBE 10x (Tris, ácido bórico, EDTA; pH 8,0); e 13 mL de água ultrapura. Para polimerização do gel foram adicionados 125 µL de persulfato de amônia a 0,1 mg/µL e 17,5 µL de TEMED.

Para determinação dos genótipos, as sequências foram analisadas por dois indivíduos, em momentos distintos, utilizando-se o programa LaserGene DNA STAR<sup>®</sup> – SeqMan (DNASTAR, Inc., WI, EUA).

Tabela 3. Iniciadores, tamanho do fragmento gerado e temperatura de hibridização para a amplificação dos éxons dos genes *HFE*, *HJV* e *HAMP*

Nome	Sequência	T. F. (pb)	T. H. (°C)
HFE 1F	5' CGGAGATTTAACGGGGACGT 3'	168	56,2
HFE 1R	5' TCGATTTTTCCACCCCGCC 3'		
HFE 2F	5' GGTGTGTGGAGCCTCAACAT 3'	377	61,8
HFE 2R	5' AGCTCTGACAACCTCAGGAA 3'		
HFE 3F	5' GGACCTATTCTTTGGTTGCA 3'	371	63,4
HFE 3R	5' TCCACTCTGCCACTAGAGTA 3'		
HFE 4F	5' AGTTCCAGTCTTCCTGGCAA 3'	368	56,7
HFE 4R	5' AGCTCCTGGCTCTCATCAGT 3'		
HFE 5F	5' GTGAGATGAGGATCTGCTCT 3'	234	56,7
HFE 5R	5' GGCAGAGGTAAGAGACT 3'		
HFE 6F	5' CCTAGTTTTGTGATGCCTCT 3'	186	53,4
HFE 6R	5' TAGGTTCAACTCTCTCTGA 3'		
HJV 1F	5' GACTCTGGCCAGCCATATACT 3'	286	64,5
HJV 1R	5' ACACCTACTTGATGTCTCTCG 3'		
HJV 2F	5' ATCTCCCCAAATTCCAGTCTG 3'	359	64,5
HJV 2R	5' CTAGAGGGTAGGCTGCTATGT 3'		
HJV 3F	5' GCAAACACTACCTCCGATAGAG 3'	669	64,5
HJV 3R	5' CCGATCCACCTCATGAGATTC 3'		
HJV 4AF	5' TAGTCCTGCATCTCTACTTGG 3'	394	59,6
HJV 4AR	5' CAGCTGAACAGGACCTGCA 3'		
HJV 4BF	5' ATGGAGGTGACCGACCTGG 3'	374	64,5
HJV 4BR	5' CCAACTTTACCGTGGCAGCT 3'		
HJV 4CF	5' GCTCTCCTTCTCCATCAAGG 3'	430	59,6
HJV 4CR	5' CCATCAGTCCCATTACTAGTTT 3'		
HJV 4DF	5' TCTGGGCTCTTTGTTCTGTG 3'	407	64,5
HJV 4DR	5' CAAGAGCTGAAAGCAGAAGAC 3'		
HJV 4EF	5' ATAAGTTTAGAGGTCATGAAGG 3'	404	64,5
HJV 4ER	5' CACTCCACTGAAAGAGGGC 3'		
HAMP 1F	5' AGCAAAGGGGAGGGGGCTCAGACCAC 3'	292	60,0
HAMP 1R	5' GTCCTTAGCAGGGCAGCAGGGATGGGA 3'		
HAMP 2-3F	5' TTGCCGGGAGCCAGTCTCAGAGGTCCAC 3'	477	63,1
HAMP 2-3R	5' GCTAAGAGCTTGTCTGACCCTGCCTTGCA 3'		

T. F.: tamanho do fragmento; T. H.: temperatura de hibridização.

Tabela 4. Iniciadores, tamanho do fragmento gerado e temperatura de hibridização para a amplificação dos éxons dos genes *TFR2* e *SLC40A1*

Nome	Sequência	T. F. (pb)	T. H. (°C)
TFR2 1F	5' TGGTGAGGAGCAGCCTTGGT 3'	280	64,6
TFR2 1R	5' TCAGGACACGGTCCAGGAG 3'		
TFR2 2-3F	5' CTCCTGGACCGTGTCCCTGA 3'	712	618
TFR2 2-3R	5' CAGACACCAGAGGCCTGGG 3'		
TFR2 4-6F	5' GCGCTCTTTTCCTAAACTCAG 3'	742	53,4
TFR2 4-6R	5' TTTCTGTCTCCCTCTCACAG 3'		
TFR2 7-8F	5' GGATGGACAGTTGCAAGCAAAG 3'	571	63,4
TFR2 7-8R	5' TCACTGCAGGCTTAAACAAGAG 3'		
TFR2 9F	5' AGCGATCTGGAGCCAGAAAG 3'	350	64,6
TFR2 9R	5' ACCACTCCTGTCCCCTCTTG 3'		
TFR2 10F	5' AGGGTTGCCGGAATTGTGATG 3'	280	64,6
TFR2 10R	5' CCAGTCTGTGTCCCTCACTG 3'		
TFR2 11-13F	5' ACAGAGAAACAGAGACCCTGG 3'	563	64,6
TFR2 11-13R	5' TGGTTGGGAGAATCCACCTG 3'		
TFR2 14-16F	5' TGTCCTGAAGCAGGCAAGAG 3'	729	63,4
TFR2 14-16R	5' GATTGCCAGAGAGGACCTAG 3'		
TFR2 17F	5' CACTCTGTCTCGTCTACCT 3'	387	63,4
TFR2 17R	5' CAGGACTGGGAAGAGAGCAT 3'		
TFR2 18F	5' ACTGGCTGGCGGGAAGGGTG 3'	559	63,4
TFR2 18R	5' ATTGAAGGGATGCTACTCTCTG 3'		
SLC40A1 1F	5' TGCCTTTCCAACCTTCAGCTA 3'	314	63,4
SLC40A1 1R	5' TTTCCACCATATGCTTTTCGG 3'		
SLC40A1 2F	5' CATTAAAGTGACTACCATCGC 3'	297	63,4
SLC40A1 2R	5' CTAACACTCATGGGGAAAGA 3'		
SLC40A1 3F	5' TAATGTAGCCAGGAAGTGCC 3'	322	63,4
SLC40A1 3R	5' AGGTAGCTCAGGCATTGGTC 3'		
SLC40A1 4F	5' ATTGAGAGTAGTTGAGGCAG 3'	344	61,8
SLC40A1 4R	5' CATCCTTTACCACTACCAGA 3'		
SLC40A1 5F	5' GGACATTATGCCCATTTGACT 3'	391	63,4
SLC40A1 5R	5' GCCTCATTATCACCACCGA 3'		
SLC40A1 6F	5' TTGTGTAAATGGGCAGTCTC 3'	440	63,4
SLC40A1 6R	5' TATTTAACCTCATCTGGCCC 3'		
SLC40A1 7AF	5' GGAAGGGGAATAGAAGGAAA 3'	434	59,6
SLC40A1 7AR	5' CATTTCGACGTAGCCAAGT 3'		
SLC40A1 7BF	5' GTGGTTCCATCCTCAGTATT 3'	460	61,8
SLC40A1 7BR	5' AATGGATTCTCTGAACCTAC 3'		
SLC40A1 8F	5' CTTAAGGCAAGGCTATGG 3'	565	63,4
SLC40A1 8R	5' AAACAGAGCAAAACACCCAG 3'		

T. F.: tamanho do fragmento; T. H.: temperatura de hibridização.

### 3.4 Análise da curva de *melting* para a mutação *SLC40A1* p.G204S

A genotipagem da mutação não descrita *SLC40A1* p.G204S foi padronizada pela PCR com os iniciadores: 5'-TGAATGCCACAATACGAAGG-3' e 5'-CCAAGTTCCATCCCGAAATA-3', gerando um fragmento de 124 pb, e seguida da análise da curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*) utilizando o Rotor Gene 6000<sup>®</sup> (Qiagen, Courtaboeuf, França).

A PCR foi realizada com adição do intercalante de DNA fluorescente SYTO9<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Na fase da geração da curva de *melting*, o Rotor Gene 6000<sup>®</sup> mensurou a fluorescência em cada aumento de temperatura de 0,1°C na faixa de 78-84°C. A curva de *melting* foi gerada pela diminuição da fluorescência com o aumento da temperatura e, para a análise, as amostras com alterações nos padrões de curvas são sequenciadas para confirmar os genótipos indicados pelo HRM. Seis amostras pertencentes à curva característica do padrão de genótipo selvagem foram escolhidas aleatoriamente e posteriormente sequenciadas.

### 3.5 Estudos *in silico*: análises estruturais da proteína HFE e potencial de alteração no sítio de *splicing*

Para a análise do alinhamento da sequência das proteínas HFE e ferroportina, na região das mutações encontradas *HFE* p.V256I e *SLC40A1* p.G204S, o programa ClustalX v.2.0 ([www.clustal.org/](http://www.clustal.org/), acesso em 10 de janeiro de 2010) foi utilizado para diferentes espécies (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994) (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Diceros bicornis*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*).

Para avaliar o impacto da mutação p.V256I na proteína HFE, análises da estrutura da proteína foram baseadas em dados da energia livre do complexo HFE -  $\beta$ 2M- receptor de transferrina (TR) (PDBid 1DE4). Estruturas para a proteína HFE nativa, para a mutação p.C282Y e para a mutação p.V256I foram analisadas. As estruturas da HFE e da  $\beta$ 2M (PDBid 1A6Z) foram obtidas no suporte Protein Data Base ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org), acesso em 23 de agosto de 2010) e as mutações dos resíduos 256 e 282 foram construídas utilizando-se o programa YASARA ([www.yasara.org](http://www.yasara.org), acesso em 10 de janeiro de 2010).

Os parâmetros para o campo de força foram obtidos a partir da base AMBER99 (WANG, 2000). Os valores de pKa para os resíduos Ácido aspártico, Ácido glutâmico, Lisina foram previstos. Os estados de protonação, em pH 7, foram atribuídos de acordo com a convenção: Ácido aspártico e Ácido glutâmico foram protonados se o pKa estimado fosse maior do que o pH, e se o pKa estimado fosse maior do que o pH e não aceitasse uma ligação de hidrogênio; e, caso contrário, foram desprotonados.

Uma simulação foi definida em 15 Å em torno de todos os átomos de cada complexo macromolecular. Em seguida, a caixa de simulação foi preenchida com as moléculas de água e íons Na/Cl contador, que foram colocadas nos locais de menor/menor potencial eletrostático, até a neutralização das células, e também foi solicitada a concentração de NaCl a 0,9%. Na dinâmica molecular, a simulação foi realizada em densidade 0,997 g/mL.

Finalmente, a simulação a 40 ns (nanossegundos), a 298 K de temperatura, em 7,86 Å, e com captura de imagem a cada 7,5 ps (picossegundos) foi realizada. A análise gráfica foi realizada utilizando-se o programa VMD (*Visual Molecular Dynamic*), com estruturas e energia de ligação média do programa YASARA (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994).

Para estimar a energia de ligação, os seguintes cálculos foram realizados: inicialmente, o potencial e a energia de solvatação foram obtidos para cada complexo. A energia de solvatação foi calculada utilizando-se o método dos elementos de contorno aplicado (YASARA). A fronteira entre o solvente (constante dielétrica 78) e o soluto (constante dielétrica 1) foi formada pela superfície molecular da mesma, construída com um raio de sonda de solvente de 1,4 Å e os raios a seguir para os elementos do soluto: hidrogênios polares 0,320 Å, outros hidrogênios 1,017 Å, carbono 1,800 Å, oxigênio 1,344 Å, nitrogênio 1,140 Å, enxofre 2,000 Å. As taxas de soluto foram atribuídas com base no campo de força AMBER99.

O componente de energia do solvente foi definido pela equação abaixo:

$$E_{sol\_comp} = E_{solcoulomb} + E_{solvdw} + surfacc * surfcost \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:  $E_{sol\_comp}$  é a energia de solvatação do complexo

$E_{solcoulomb} + E_{solvdw}$  é a energia de solvatação dos componentes de Coulomb e de Van der Waals, ajustado para os efeitos de superfície.

Além dos cálculos acima, foram realizados para cada proteína isolada nos complexos:

$$E_{sol\_prot [i]} = E_{solcoulomb [i]} + E_{solvdw [i]} + surfacc [i] * surfcost \quad (\text{Equação 2})$$

Onde  $i = 1$  a  $N$ , sendo  $N$  o número de componentes dos complexos.

Por último, a energia de ligação ( $E_{lig}$ ) foi estimada pela equação abaixo:

$$E_{lig} = (\sum E_{pot\_prot [i]} + E_{sol\_prot [i]}) - (E_{pot\_comp} + E_{sol\_comp}) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde  $E_{pot\_comp}$  e  $E_{pot\_prot [i]}$  são as energias potenciais para o complexo e para os componentes isolados, respectivamente.

Estes métodos consideram a energia potencial obtida no campo de força, bem como as energias de solvatação eletrostáticas de Van der Waals, porém ignoram alguns componentes entrópicos, o que tornou impossível a comparação quantitativa dos resultados experimentais.

A energia de ligação foi calculada para todas as conformações obtidas nos últimos 30 ns da dinâmica molecular. A análise de ligação foi realizada para a interação entre HFE e  $\beta$ 2M e entre HFE e TR.

Para a avaliação do potencial de modificação do sítio de *splicing* das variantes intrônicas encontradas nos genes *HJV* e *HAMP*, foi utilizado o programa GeneSplicer<sup>®</sup> ([www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/](http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/), acesso em 20 de Janeiro de 2010).

### 3.6 Análises estatísticas

Os bancos de dados foram criados inicialmente no programa Microsoft Excel<sup>®</sup> e posteriormente compartilhados aos programas Statistical Analysis System v. 6.12 (SAS Institute Inc, NC, USA) e SPSS v.16.0 (SPSS Inc, IL, USA), adotando nível de significância estatística de 5% ( $P < 0,05$ ).

Para comparar as variáveis categóricas das características gerais entre os grupos foram utilizados os testes Qui-Quadrado ou exato de Fisher. O primeiro foi também utilizado para comparar a frequência do genótipo homozigoto para a mutação p.C282Y no gene *HFE* (p.C282Y / p.C282Y) encontrada nos pacientes em relação a outros estudos; e para verificar se as distribuições dos genótipos para cada mutação apresentavam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As concentrações dos parâmetros que avaliam ferro para os doadores de sangue (ferro sérico, capacidade total de ligação ao ferro, saturação de transferrina e ferritina sérica) não apresentaram distribuição normal. Houve então a transformação dos valores destas variáveis em logaritmo e, deste modo, foi possível realizar testes paramétricos.

A correlação entre variáveis numéricas (parâmetros de ferro, idade e número de doações prévias) foi obtida através do coeficiente de correlação de Pearson.

Para os pacientes com sobrecarga de ferro, as variáveis das dosagens bioquímicas e dos parâmetros que avaliam ferro não apresentaram distribuição normal e, pelo menor número amostral, a transformação logarítmica não permitiu a

utilização de testes paramétricos. Deste modo, o teste Mann-Whitney foi utilizado para determinar diferenças entre as médias destas variáveis, de acordo com o gênero e os genótipos para a mutação *HFE* p.C282Y; e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para analisar diferenças entre os parâmetros que avaliam ferro, de acordo com os genótipos para a mutação *HFE* p.C282Y.

A análise de variância simples (*Oneway* ANOVA), ajustada por idade e número de doações prévias, foi utilizada para se analisar as variáveis dos parâmetros de ferro em relação aos genótipos e às combinações de genótipos, para três ou mais grupos de doadores homens ou mulheres. Quando houve diferença significativa entre os grupos, o teste de Tukey-Kramer foi utilizado para identificar o grupo diferente. Nesta análise, foram testados 4 modelos: modelo 1, sem ajuste por covariável; modelo 2, ajustado pelo número de doações nos últimos 12 meses; modelo 3, ajustado pela idade; e modelo 4, ajustado pelo número de doações nos últimos 12 meses e idade.

Para avaliar simultaneamente a associação entre preditores dos parâmetros que avaliam ferro, nos homens de primeira doação, foram utilizadas análises de regressão linear múltipla. As variáveis independentes foram: idade, indivíduos brancos *versus* não-brancos (o grupo dos indivíduos não-brancos foi referência; dois indivíduos amarelos foram excluídos deste modelo), genótipo heterozigoto *versus* genótipo selvagem para a mutação p.C282Y no gene *HFE* (o genótipo selvagem foi referência), genótipos heterozigoto + homozigoto mutado *versus* genótipo selvagem para a mutação p.H63D no gene *HFE* (o genótipo HH foi referência), genótipo heterozigoto *versus* genótipo selvagem para a mutação p.S65C no gene *HFE* (o genótipo selvagem foi referência).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Resultados no grupo de doadores de sangue**

Os principais resultados da associação entre as mutações no gene *HFE* e os parâmetros que avaliam ferro em doadores de sangue foram publicados na forma de artigo original (Apêndice 1) (SANTOS et al., 2010).

#### **4.1.1 Características gerais do grupo de doadores de sangue**

Concordaram em participar da pesquisa 544 doadores de sangue, no entanto, durante a aplicação dos critérios de exclusão, 2 doadores apresentaram sorologia positiva para hepatite C, sendo assim excluídos para a realização das genotipagens.

Participaram 171 mulheres e 371 homens doadores, cujas descrições das características gerais estão apresentadas na Tabela 5. A média geométrica das idades das doadoras foi de 31,3 anos, enquanto a dos doadores homens foi de 32,6 anos. O grupo étnico de brancos foi o predominante entre os doadores homens e mulheres, com 54,2% e 53,4%, respectivamente. A escolaridade predominante no grupo foi o segundo grau completo para ambos. Para o consumo alcoólico houve diferença significativa entre os gêneros: 71,9% das mulheres responderam não, enquanto 48,9% dos homens responderam sim ao consumo ( $P < 0,001$ ).

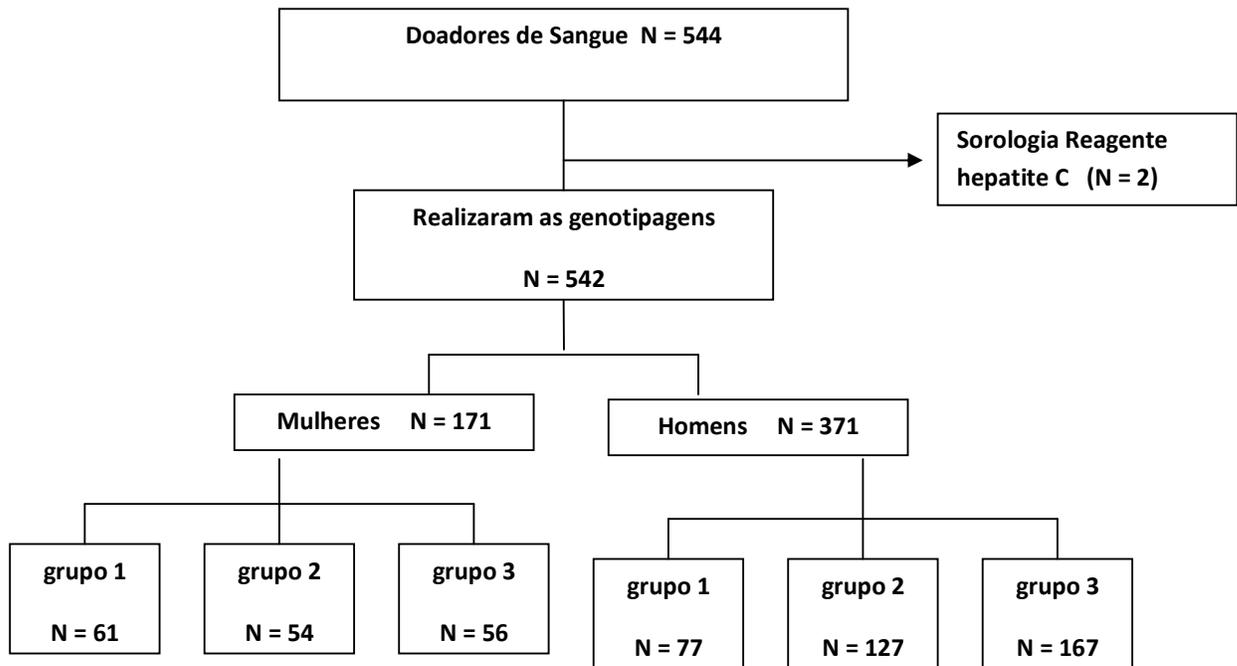
Quanto ao tipo de doador, relativo à frequência de doações realizadas, houve diferença significativa entre os doadores homens e mulheres; sendo que a maioria das mulheres foi classificada no grupo 1 (35,7%) e os homens no grupo 3 (45,0%) ( $P < 0,001$ ) (Esquema 1).

Tabela 5. Características gerais dos doadores de sangue

	<b>Mulheres</b>	<b>Homens</b>	<b>P valor</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
<b>Idade (anos completos)</b>			
<20	10 (5,9)	14 (3,8)	0,482**
20 a 29	67 (39,2)	130 (35,0)	
30 a 39	49 (28,6)	118 (31,8)	
40 a 49	32 (18,7)	68 (18,3)	
≥ 50	13 (7,6)	41 (11,1)	
Total	171 (100,0)	371 (100,0)	
<b>Grupo étnico</b>			
Branços	91 (53,2)	201 (54,2)	0,933*
Mestiços	56 (32,7)	110 (29,7)	
Negros	22 (12,9)	58 (15,6)	
Amarelos	2 (1,2)	2 (0,5)	
Total	171 (100,0)	371 (100,0)	
<b>Escolaridade</b>			
1º incompleto e analfabeto	30 (17,6)	63 (17,0)	0,393**
1º completo	18 (10,5)	65 (17,6)	
2º incompleto	13 (7,6)	22 (5,9)	
2º completo	71 (41,5)	151 (40,7)	
Superior incompleto	14 (8,2)	25 (6,7)	
Superior completo	25 (14,6)	45 (12,1)	
Total	171 (100,0)	371 (100,0)	
<b>Tipo de doador</b>			
Grupo 1	61 (35,7)	77 (20,8)	<0,001**
Grupo 2	54 (31,6)	127 (34,2)	
Grupo 3	56 (32,7)	167 (45,0)	
Total	171 (100,0)	371 (100,0)	
<b>Consumo alcoólico</b>			
Não	123 (71,9)	189 (50,9)	<0,001**
Sim	48 (28,1)	182 (49,1)	
Total	171 (100,0)	371 (100,0)	

\* Teste exato de Fisher

\*\* Teste de Qui-Quadrado



Esquema 1. Classificação dos participantes da pesquisa em grupos de acordo com a frequência de doação de sangue. Grupo 1: indivíduos que nunca doaram sangue. Grupo 2: indivíduos que doaram sangue, porém a última doação foi há mais de 12 meses. Grupo 3: indivíduos que doaram uma ou mais vezes nos últimos 12 meses.

#### **4.1.2 Análise da correlação entre idade e número de doações nos últimos 12 meses com as concentrações de hemoglobina e os parâmetros de ferro nos doadores de sangue**

Na Tabela 6, para mulheres e homens, foram correlacionadas duas variáveis importantes, a idade e o número de doações nos últimos 12 meses, com a concentração de hemoglobina e com os parâmetros que avaliam o estado do ferro no organismo.

Para as mulheres doadoras de sangue houve correlação positiva significativa, porém fraca, entre a idade e a concentração de hemoglobina ( $P= 0,031$ ;  $r= 0,165$ ); e correlação negativa e fraca entre o número de doações nos últimos 12 meses e a ferritina sérica ( $P= 0,001$ ;  $r= -0,253$ ).

Para os homens houve correlação significativa positiva entre a idade e a ferritina sérica ( $P= 0,009$ ;  $r= 0,141$ ); também entre o número de doações nos últimos 12 meses e a CTLF ( $P= 0,003$ ;  $r= 0,154$ ). Houve correlação negativa entre o número de doações nos últimos 12 meses e a saturação de transferrina ( $P= 0,006$ ;  $r= -0,143$ ) e também de ferritina sérica ( $P < 0,001$ ;  $r= -0,378$ ).

Por apresentarem correlações significativas, as covariáveis idade e número de doações nos últimos 12 meses foram utilizadas nos testes de associação entre os genótipos e as combinações dos genótipos com os parâmetros que avaliam o estado de ferro.

#### **4.1.3 Frequências genóticas e alélicas para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* e mutações p.Y250X e p.Q690P no gene *TFR2* nos doadores de sangue**

A distribuição dos genótipos para as mutações do gene *HFE* encontra-se em equilíbrio, segundo critérios de Hardy-Weinberg (HWE). A Tabela 7 apresenta as frequências genóticas e alélicas no grupo total, nas mulheres e nos homens doadores. Para as mutações estudadas não foram observadas diferenças significativas entre as frequências dos genótipos em relação ao gênero e em relação ao grupo étnico ( $P \geq 0,05$ ).

As mutações pesquisadas no gene *TFR2* foram genotipadas em subamostras (212 para a mutação p.Y250X e 516 para a mutação p.Q690P) e não foram identificadas em doadores de sangue de nosso estudo.

#### **4.1.4 Frequências das combinações de genótipos para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* nos doadores de sangue**

As frequências das combinações dos genótipos para as mutações estudadas no gene *HFE* foram analisadas no grupo total, nas mulheres e nos homens doadores (Tabela 8). Não foi observada diferença significativa para a frequência das mutações entre os grupos feminino e masculino ( $P= 0,940$ ).

Tabela 6. Análise da correlação entre a idade e o número de doações nos últimos 12 meses e as concentrações dos parâmetros que avaliam ferro em doadores de sangue femininos e masculinos

	Hemoglobina	Ferro sérico	CTLF	Saturação da transferrina	Ferritina sérica
<b>MULHERES</b>					
<b>Idade</b>	r= 0,165	r= -0,003	r= -0,014	r= 0,004	r= 0,053
	P= 0,031	P= 0,970	P= 0,857	P= 0,954	P= 0,500
	N= 171	N= 171	N= 171	N= 171	N= 162
<b>Número de doações nos últimos 12 meses</b>	r= -0,003	r= -0,086	r= 0,126	r= -0,124	r= -0,253
	P= 0,973	P= 0,264	P= 0,102	P= 0,107	P= 0,001
	N= 171	N= 171	N= 171	N= 171	N= 162
<b>HOMENS</b>					
<b>Idade</b>	r= - 0,063	r= -0,031	r= 0,098	r= -0,082	r= 0,141
	P= 0,226	P= 0,551	P= 0,059	P= 0,114	P= 0,009
	N= 369	N= 372	N= 372	N= 372	N= 344
<b>Número de doações nos últimos 12 meses</b>	r= -0,053	r= -0,087	r= 0,154	r= -0,143	r= -0,378
	P= 0,310	P= 0,093	P= 0,003	P= 0,006	P < 0,001
	N= 369	N= 372	N= 372	N= 372	N= 344

CTLF: capacidade total de ligação com ferro.

r: coeficiente de correlação de Pearson. P: p valor. N: número de doadores com as dosagens das variáveis.

Tabela 7. Frequências de genótipos e de alelos para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* e para as mutações p.Y250X e p.Q690P no gene *TFR2* no grupo total, nas mulheres e nos homens doadores

Genótipo	Grupo total	Mulheres	Homens
	N (%)	N (%)	N (%)
<b><i>HFE</i> p.C282Y</b>			
CC	519 (95,8)	164 (95,9)	355 (95,7)
CY	23 (4,2)	7 (4,1)	16 (4,3)
YY	0	0	0
Total	542 (100,0)	171 (100,0)	371 (100,0)
Alelo 282C (%)	97,9	98,0	97,8
Alelo 282Y (%)	2,1	2,0	2,2
<b><i>HFE</i> p.H63D</b>			
HH	405 (74,7)	130 (76,0)	275 (74,1)
HD	127 (23,4)	38 (22,2)	89 (24,0)
DD	10 (1,9)	3 (1,8)	7 (1,9)
Total	542 (100,0)	171 (100,0)	371 (100,0)
Alelo 63H (%)	86,4	87,1	86,1
Alelo 63D (%)	13,6	12,9	13,9
<b><i>HFE</i> p.S65C</b>			
SS	536 (98,9)	171 (100,0)	365 (98,4)
SC	6 (1,1)	0	6 (1,6)
CC	0	0	0
Total	542 (100,0)	171 (100,0)	371 (100,0)
Alelo 65S (%)	99,4	100,0	99,2
Alelo 65C (%)	0,6	0	0,8
<b><i>TRF2</i> p.Y250X</b>			
YY	212	53	159
YX	0	0	0
XX	0	0	0
Total	212	53	159
Alelo 250Y (%)	100	100	100
Alelo 250X (%)	0	0	0
<b><i>TRF2</i> p.Q690P</b>			
QQ	516	152	364
QP	0	0	0
PP	0	0	0
Total	516	152	364
Alelo 690Q (%)	100	100	100
Alelo 690P (%)	0	0	0

A distribuição dos genótipos, para as mutações do gene *HFE*, está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ).

Tabela 8. Frequências das combinações dos genótipos para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* em doadores de sangue

<b>p.C282Y/p. H63D/ p.S65C</b>	<b>Grupo total N (%)</b>	<b>Mulheres N (%)</b>	<b>Homens N (%)</b>
CC/ HH/ SS	380 (70,1)	124 (72,5)	256 (69,0)
CC/ HD/ SS	123 (22,7)	37 (21,6)	86 (23,2)
CY/ HH/ SS	19 (3,5)	6 (3,5)	13 (3,5)
CC/ DD/ SS	10 (1,9)	3 (1,8)	7 (1,9)
CC/ HH/ SC	6 (1,1)	0	6 (1,6)
CY/ HD/ SS	4 (0,7)	1 (0,6)	3 (0,8)
<b>Total</b>	<b>542 (100,0)</b>	<b>171 (100,0)</b>	<b>371 (100,0)</b>

#### **4.1.5 Associação entre os genótipos das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene *HFE* e os parâmetros de ferro nos doadores de sangue segundo a frequência de doação**

Sabendo da importância da frequência de doações, a associação entre genótipos das mutações no gene *HFE* e os parâmetros que avaliam o estado do ferro foi analisada separadamente, de acordo com o tipo de doador.

Para as mulheres doadoras, classificadas nos três grupos, não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de ferro em relação aos genótipos das mutações p.C282Y e p.H63D no gene *HFE* ( $P \geq 0,05$ ).

A associação entre os parâmetros que avaliam o estado do ferro e os genótipos das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C nos doadores homens selecionados no grupo 1 (doadores de primeira doação) é apresentada na Tabela 9. Quando realizado o ajuste pela idade, os doadores de primeira doação, portadores do genótipo selvagem para a mutação p.C282Y, apresentaram maiores concentrações de CTLF (média geométrica 301,1 µg/dL, IC 95%: 288,3 - 314,4) comparados aos de genótipo heterozigoto (média geométrica 189,6 µg/dL, IC 95%: 829,0 - 434,0) ( $P < 0,001$ ). Os de genótipo heterozigoto para a mutação p.C282Y apresentaram maiores valores de saturação de transferrina (média geométrica 48,8%, IC 95%: 36,2 - 65,8) comparados aos de genótipo selvagem (média geométrica 29,7%, IC 95%: 26,6 - 33,1), sem ajuste e ajustado pela idade ( $P < 0,05$ ).

Também os homens de primeira doação, portadores dos genótipos heterozigoto e homozigoto mutado para a p.H63D, apresentaram maiores concentrações de ferritina sérica (média geométrica 166,0 µg/L, IC 95%: 120,8 - 228,0) comparados aos de genótipo selvagem (média geométrica 112,1 µg/L, IC 95%: 96,1 - 130,8), sem ajuste e ajustado pela idade ( $P < 0,05$ ).

Para os doadores do grupo 2 (doadores esporádicos) não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros que avaliam o estado do ferro em relação aos genótipos para as mutações p.C282Y e p.S65C no gene *HFE* ( $P \geq 0,05$ ). Entretanto, os doadores esporádicos, portadores dos genótipos heterozigoto e homozigoto mutado para a p.H63D, apresentaram maiores concentrações de ferro sérico (média geométrica 98,3 µg/dL, IC 95%: 88,9 - 108,7) comparados aos de genótipo selvagem (média geométrica 83,4 µg/dL, IC 95%: 78,2 - 89,0). Também apresentaram maiores valores de saturação de transferrina (média geométrica

30,8%, IC 95%: 27,9 - 34,0) comparados aos de genótipo selvagem (média geométrica 26,8%, IC 95%: 24,9 - 28,8), sem ajuste por covariável e ajustado por idade ( $P < 0,05$ ).

Para os homens doadores do grupo 3 (doadores frequentes) não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de ferro segundo os genótipos para as mutações estudadas no gene *HFE* ( $P \geq 0,05$ ).

#### **4.1.6 Preditores dos parâmetros que avaliam ferro para os doadores homens de primeira vez**

A regressão linear múltipla foi utilizada para avaliar um possível impacto dos genótipos para as mutações pesquisadas no gene *HFE*, da idade e do grupo étnico sobre as concentrações de ferritina sérica (modelo 1), da CTLF (modelo 2), da ST (modelo 3) e do ferro sérico (modelo 4) nos doadores homens de primeira vez.

No modelo 4, não foi observada interação significativa entre as variáveis. No modelo 1, a idade ( $P = 0,001$ ) e os genótipos heterozigoto e homozigoto mutado para a p.H63D ( $P = 0,021$ ) foram preditores de maiores concentrações de ferritina sérica. Nos modelos 2 e 3, o genótipo heterozigoto para a mutação p.C282Y foi associado com maiores valores da ST ( $P = 0,018$ ) e com menores concentrações da CTLF ( $P = 0,007$ ) (Tabela 10).

Tabela 9. Concentrações dos parâmetros que avaliam o estado do ferro e genótipos para as mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C nos homens de primeira doação

	Ferro sérico ( $\mu\text{g/dL}$ )	CTLF ( $\mu\text{g/dL}$ )	Saturação da transferrina (%)	Ferritina sérica ( $\mu\text{g/L}$ )
<b>HFE p.C282Y</b>				
CC	89,7 (81,0-99,2) 72	301,1 (288,3-314,4) 72	29,7 (26,6-33,1) 72	122,2 (105,6-141,5) 65
CY	109,4 (62,7-190,9) 5	189,6 (82,9-434,0) 5	48,8 (36,2-65,8) 5	138,9 (58,8-328,4) 5
P valor				
Modelo 1	0,323	0,196	0,021	0,645
Modelo 2	0,308	<0,001	0,020	0,431
<b>HFE p.H63D</b>				
HH	90,9 (80,4-102,8) 57	289,2 (268,0-312,0) 57	30,9 (27,1-35,2) 57	112,1 (96,1-130,8) 53
HD + DD	90,6 (77,0-106,4) 20	301,0 (277,3-326,3) 20	30,0 (25,0-36,1) 20	166,0 (120,8-228,0) 17
P valor				
Modelo 1	0,971	0,469	0,830	0,017
Modelo 2	0,977	0,566	0,836	0,015
<b>HFE p.S65C</b>				
SS	90,4 (81,8-100,0) 75	291,7 (274,5-310,1) 75	30,6 (27,4-34,1) 75	125,2 (108,4-144,6) 68
SC	106,7 (5,9-1923,8) 2	306,5 (265,1-354,3) 2	34,5 (1,5-777,0) 2	74,3 (22,3-247,0) 2
P valor				
Modelo 1	0,597	0,795	0,723	0,223
Modelo 2	0,544	0,803	0,667	0,411

MG: média geométrica; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; N: número de doadores. Os valores das variáveis foram transformados em logaritmo. CTLF: capacidade total de ligação com ferro.

Modelo 1: teste t de Student, sem ajuste por covariável.

Modelo 2: ajustado por idade.

Tabela 10. Influência das mutações p.C282Y, p.H63D e p.S65C, da idade e do grupo étnico nas concentrações dos parâmetros que avaliam ferro para os homens de primeira doação pela análise da regressão linear múltipla

Variáveis dependentes	Variáveis independentes	Parâmetro	Erro padrão	P valor
<b>Ferritina sérica</b> Modelo 1 N= 71	Intercepto	-3,13	35,62	0,930
	Idade	3,91	1,17	0,001
	Homem branco	40,31	21,35	0,063
	Genótipo 282CY	35,13	39,80	0,381
	Genótipos 63HD + 63DD	55,84	23,57	0,021
	Genótipo 65SC	-48,67	62,63	0,440
<b>Saturação de transferrina</b> Modelo 2 N= 77	Intercepto	28,96	6,29	<0,001
	Idade	0,08	0,20	0,695
	Homem branco	3,21	3,71	0,389
	Genótipo 282CY	17,21	7,09	0,018
	Genótipos 63HD + 63DD	-1,47	3,94	0,711
	Genótipo 65SC	1,60	11,14	0,886
<b>CTLF</b> Modelo 3 N= 77	Intercepto	317,08	26,74	<0,001
	Idade	-0,48	0,85	0,575
	Homem branco	1,98	15,76	0,900
	Genótipo 282CY	-83,65	30,12	0,007
	Genótipos 63HD + 63DD	3,69	16,74	0,826
	Genótipo 65SC	-2,03	47,35	0,966

N: número de doadores homens de primeira vez.

CTLF: capacidade total de ligação com ferro.

O grupo étnico auto-identificado dos não-brancos foi formado pelos homens mestiços e negros, excluindo 2 indivíduos amarelos-asiáticos.

Modelo 1: as variáveis independentes foram: idade, indivíduos brancos *versus* não-brancos (não-brancos foram referência); genótipo 282CY *versus* 282CC (genótipo 282CC foi referência); genótipos 63HD + 63DD *versus* 63HH (genótipo 63HH foi referência); e genótipo 65SC *versus* SS (genótipo 65SS foi referência).

Modelo 2 e 3: as variáveis independentes foram as mesmas do modelo 1.

## **4.2 Resultados no grupo de pacientes com sobrecarga de ferro primária**

### **4.2.1 Características gerais**

Cinquenta e um pacientes com sobrecarga de ferro primária concordaram em participar da pesquisa e foram incluídos no estudo. Destes, 13 (25,5%) são mulheres e 38 (74,5%) são homens. A idade média foi de 58,9 ( $\pm$  13,6) anos para as mulheres e de 53,2 ( $\pm$  10,9) anos para os homens. Os participantes foram autoidentificados em: brancos (N = 34; 66,6%), pardos (N = 11; 21,6%), negros (N = 3; 5,9%) e amarelos (N = 3; 5,9%).

O apêndice 2 exibe, para cada paciente, características gerais, exames bioquímicos e principais alterações genéticas encontradas.

### **4.2.2 Análise das concentrações dos parâmetros que avaliam ferro, enzimas hepáticas e testes bioquímicos**

Foram analisadas as concentrações de ferro sérico, capacidade total de ligação com ferro, saturação de transferrina e ferritina sérica como parâmetros que avaliam o estado do ferro. Além disso, foram realizadas as atividades enzimáticas hepáticas (AST e ALT), glicose e creatinina (Tabela 11).

Não houve diferença significativa nos parâmetros que avaliam o estado do ferro entre os pacientes femininos e masculinos, o que evidencia a presença de sobrecarga em ambos.

### **4.2.3 Sequenciamento do gene *HFE* nos pacientes com sobrecarga de ferro primária**

#### **4.2.3.1 Frequências das combinações de genótipos e dos alelos para as mutações encontradas no gene *HFE* nos pacientes**

Serão apresentados os resultados da análise do sequenciamento do gene *HFE* para 51 pacientes com sobrecarga de ferro primária.

Os principais resultados do sequenciamento do gene *HFE* e da análise *in silico* da mutação p.V256I foram aceitos para publicação na forma de artigo original (Apêndice 1).

O sequenciamento dos éxons 1, 3, 5 e 6 não revelou mutação. Entretanto, 37 dos 51 pacientes (72,5%) com sobrecarga de ferro primária apresentaram pelo menos uma mutação - localizada no éxon 2 (p.H63D e p.S65C) ou no éxon 4 do gene *HFE* (p.C282Y e p.V256I) (Tabela 12).

As frequências das combinações de genótipos e dos alelos estão apresentadas na Tabela 12. Os alelos 282Y (31,4%) e 63D (23,5%) são os mais frequentes nesta amostra. O genótipo homozigoto para a mutação p.C282Y foi encontrado em 11 pacientes (21,6%, p.C282Y / p.C282Y). A mutação p.C282Y foi identificada em heterozigose (p.C282Y / WT) em quatro pacientes (7,8%) e também encontrada em combinação com a mutação p.H63D (p.C282Y / p.H63D; N = 6, 11,7%). O genótipo homozigoto para a mutação p.H63D (p.H63D / p.H63D) foi observado em dois (3,8%) pacientes e a heterozigose composta p.H63D / p.S65C também (N = 2, 3,8%). A mutação p.H63D foi identificada em heterozigose (p.H63D / WT) em onze pacientes (21,6%).

A substituição da guanina pela adenina (c.G766A), que corresponde a uma troca do aminoácido valina pela isoleucina na posição 256 (p.V256I), foi detectada no éxon 4 (Figura 13). Esta mutação foi identificada em heterozigose com a p.H63D, em um homem de 44 anos de idade, apresentando saturação de transferrina de 62% e concentração de ferritina sérica de 114 µg/L. Na análise de alinhamento da sequência da proteína HFE, o resíduo V256 está conservado em todos os organismos estudados (Figura 13).

As frequências das combinações dos genótipos e dos alelos para as mutações encontradas no gene *HFE* não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de mulheres e homens e entre os grupos étnicos ( $P \geq 0,05$ ).

#### **4.2.3.2 Associação entre os genótipos para a mutação p.C282Y e p.H63D no gene *HFE* e os parâmetros de ferro nos pacientes**

A Tabela 13 apresenta os parâmetros que avaliam o estado do ferro segundo os genótipos para as mutações p.C282Y e p.H63D no gene *HFE*.

As medianas das concentrações de ferritina sérica e os valores de saturação de transferrina dos pacientes portadores do genótipo homozigoto para a mutação p.C282Y (p.C282Y/p.C282Y) não apresentaram diferenças significativas em relação às medianas das variáveis dos portadores dos genótipos heterozigoto e selvagem. Também não foram observadas estas diferenças para os pacientes portadores das combinações de genótipos p.C282Y / p.C282Y e p.C282Y / p.H63D comparados aos demais pacientes (Tabela 13).

#### **4.2.3.3 Modelagem molecular para a mutação p.V256I no gene *HFE***

##### **4.2.3.3.1 Análise da energia livre de ligação**

Os complexos HFE/ $\beta$ 2M-TR foram submetidos à modelagem molecular para avaliar os efeitos das mutações p.V256I e p.C282Y. A análise da energia de ligação mostrou que a interação no complexo HFE/ $\beta$ 2M nativo apresentou maior energia de ligação do que no complexo HFE/ $\beta$ 2M com a mutação p.C282Y (Figura 14). Porém, comparado ao complexo HFE/ $\beta$ 2M com a alteração p.V256I, apresentou energia similar. O mesmo resultado foi observado para a interação entre os complexos HFE/TR (Figura 14).

##### **4.2.3.3.2 Análise estrutural**

Apesar da mutação p.V256I não afetar a interação HFE/ $\beta$ 2M/TR, a análise estrutural mostrou uma alteração nos contatos entre os aminoácidos próximos ao resíduo 256 (Figura 15A). A análise da HFE nativa mostrou que o resíduo Valina (256), localizado no domínio alfa 2, apresentou estreito contato com os resíduos Tirosina (230) e Glutamina (233). O resíduo Glutamina (233) não faz nenhum contato com Ácido aspártico (55) e este realiza contato com o resíduo Tirosina (231) (Figura 15B). A análise da HFE com a mutação p.V256I mostrou que o resíduo mutante Isoleucina (256) força o resíduo Glutamina (233) a aproximar-se do Ácido aspártico (55) (Figura 15C). Outra alteração foi o resíduo Isoleucina (256) não interagir com o resíduo Tirosina (230). Essas alterações causaram pequena deformação na estrutura de toda a HFE p.V256I, comparada à forma nativa (root mean square deviation - RMSD 3,68Å) (Figura 15).

Tabela 11. Concentrações de ferritina sérica, saturação de transferrina, AST, ALT, glicose e creatinina séricas no grupo total de pacientes

<b>Parâmetros</b>	<b>Mediana (P25 e P75)</b>
<b>Ferritina sérica (µg/L)</b>	855,0 (567,5 - 1585,5)
<b>Saturação transferrina (%)</b>	72,8 (65,0 - 87,4)
<b>AST (U/L)</b>	33,0 (24,0 - 47,5)
<b>ALT (U/L)</b>	45,0 (32,0 - 63,8)
<b>Glicose (mg/dL)</b>	97,0 (90,0 - 113,5)
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,90 (0,80 - 1,00)

AST: aspartato aminotransferase. ALT: alanina aminotransferase. Número de pacientes, N = 51.

Tabela 12. Frequências das combinações de genótipos e dos alelos encontrados pelo sequenciamento do gene *HFE* nos pacientes com sobrecarga de ferro primária

<b>Combinações de genótipos</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
p.C282Y / p.C282Y	11	21,6
p.C282Y / WT	4	7,8
p.C282Y / p.H63D	6	11,7
p.H63D / p.H63D	2	3,9
p.H63D / WT	11	21,6
p.H63D / p.S65C	2	3,9
p.H63D / p.V256I	1	2,0
WT / WT	14	27,5
Total	51	100,0

<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>HFE</i> 282Y	32	31,4
<i>HFE</i> 63D	24	23,5
<i>HFE</i> 65C	2	2,0
<i>HFE</i> 256I	1	1,0
Total	102	100,0

WT: *wild-type*, genótipo selvagem; N: número de genótipos e alelos.

Tabela 13. Concentração de ferritina sérica e saturação de transferrina de acordo com os genótipos para as mutações p.C282Y e p.H63D no gene *HFE* em pacientes com sobrecarga de ferro primária

Variáveis	<i>HFE</i> p.C282Y			P valor
	p.C282Y/ p.C282Y N = 11	p.C282Y/WT N = 10	WT/WT N = 29	
Ferritina sérica (µg/L)	1409 (331 - 2728)	948 (519 - 1651)	829 (532 - 1523)	0,300
Saturação transferrina (%)	87,0 (79,0 - 91,8)	67,2 (64,6 - 88,1)	72,0 (62,9 - 82,3)	0,070

Variáveis	<i>HFE</i> p.C282Y e <i>HFE</i> p.H63D		P valor
	p.C282Y/ p.C282Y p.C282Y/ p.H63D N = 17	WT/WT N = 33	
Ferritina sérica (µg/L)	1051 (560 - 2085)	848 (608 - 1522)	0,600
Saturação transferrina (%)	84,2 (67,2 - 89,2)	72,0 (63,0 - 82,3)	0,140

Não foi incluído, nesta tabela, o paciente portador de hemocromatose juvenil (ferritina sérica de 3500 µg/L e saturação de transferrina de 99%), o qual apresentava genótipo heterozigoto para *HFE* p.H63D.

Os valores das variáveis foram apresentados em mediana (percentil 25% e 75%) pela ausência de distribuição normal. \*O teste de Kruskal-Wallis e o \*\*teste de Mann-Whitney foram utilizados. N = 50.

WT: *wild-type*, genótipo selvagem.

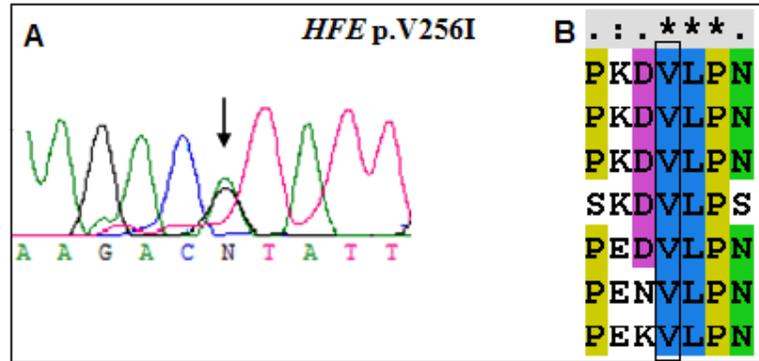


Figura 13. A: Resultado do sequenciamento demonstrando a heterozigose para a mutação p.V256I encontrada no gene *HFE*. B: Análise de alinhamento da sequência da proteína HFE para diferentes espécies (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Diceros bicornis*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, respectivamente). Resíduos iguais são indicados por um asterisco (\*); substituições conservadas por dois pontos (:) e substituições semiconservadas por ponto (.).

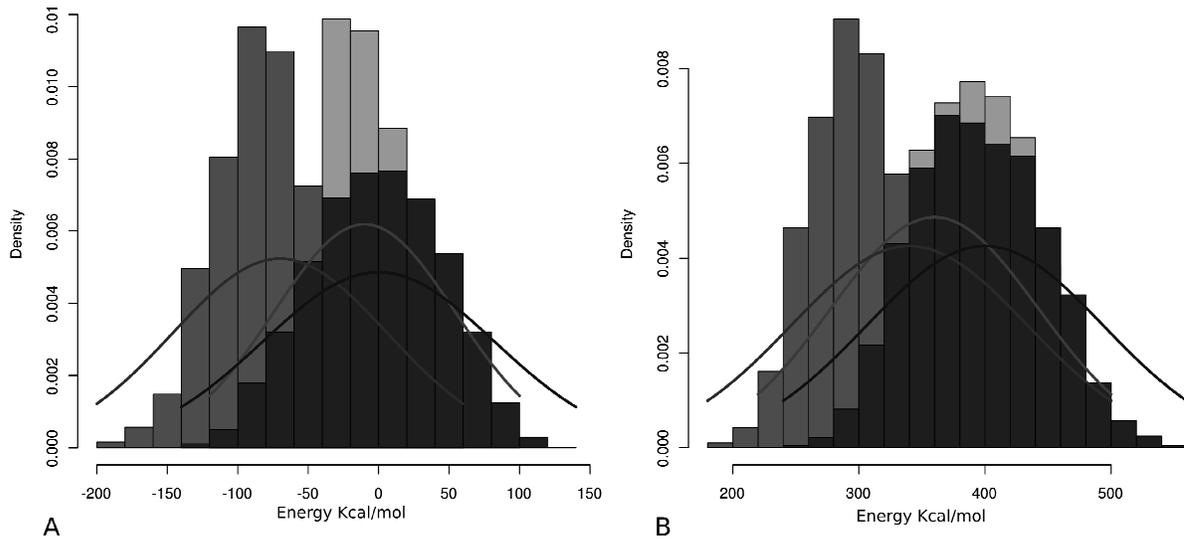


Figura 14. Gráfico da energia de ligação entre HFE e  $\beta$ 2M (A) e HFE e TR (B) para 3 complexos analisados: HFE-nativo (cinza claro), HFE-p.V256I (preto) e HFE-p.C282Y (cinza escuro).

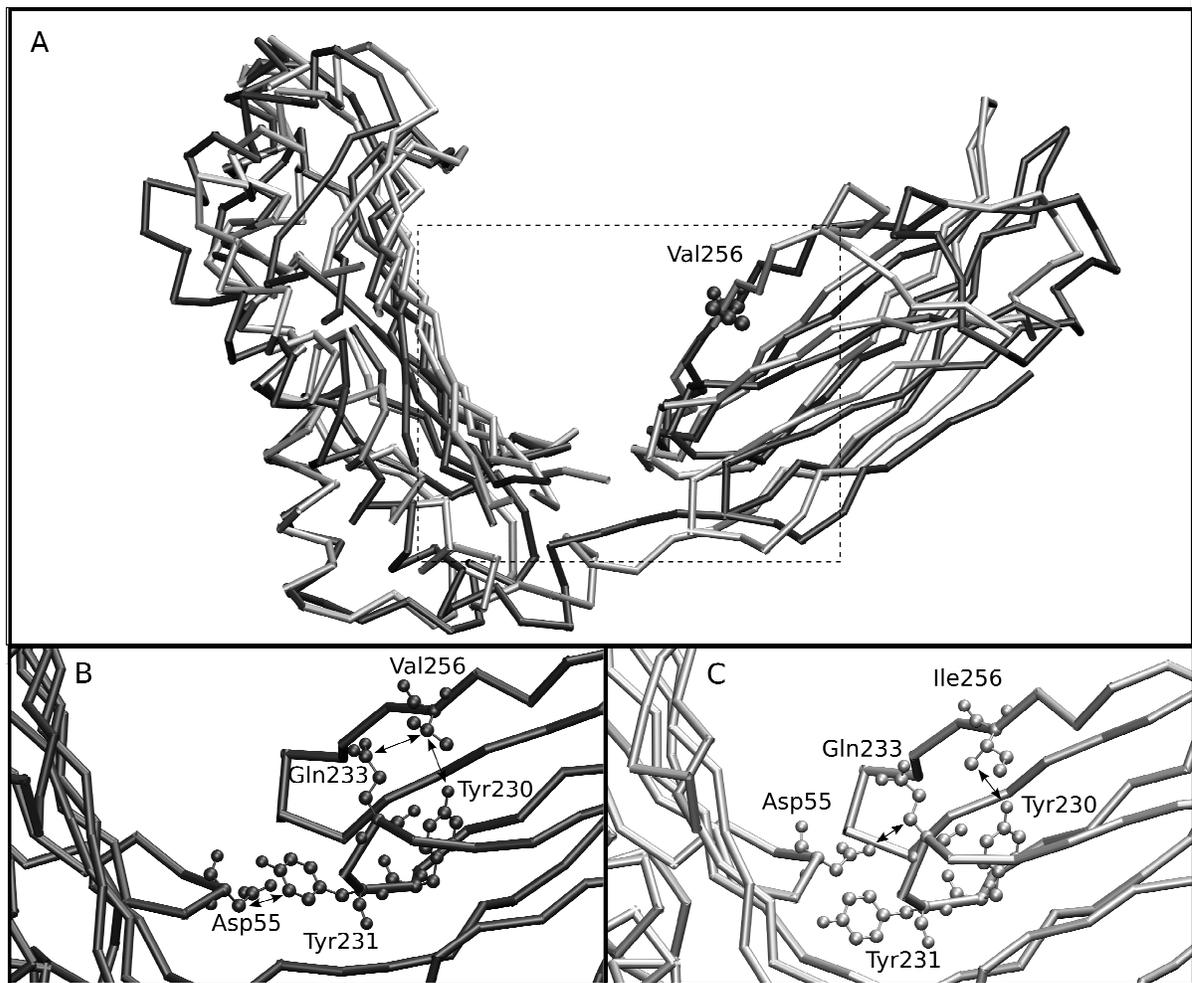


Figura 15. A: a estrutura do complexo nativo HFE-β2M (preto) e do complexo HFE-p.V256I-β2M (cinza), com base nas 4.000 conformações obtidas durante a dinâmica molecular de 30 ns. Resíduos mutados são mostrados em forma de bola. B e C: uma ampliação da região pontilhada. B: o contato entre Valina (256) – Glutamina (233) e Tirosina (230), e o contato entre Ácido aspártico (55) – Tirosina (231). C: o resíduo Glutamina (233) é rotado, permitindo nova interação com Ácido aspártico (55).

#### **4.2.4 Sequenciamento dos genes *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* nos pacientes com sobrecarga de ferro primária**

Serão apresentados os resultados da análise do sequenciamento dos genes *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1* para os 51 pacientes com sobrecarga de ferro primária.

Os resultados relacionados ao sequenciamento dos genes *HAMP* e *HJV* e ao relato de caso do paciente portador de hemocromatose juvenil foram aceitos para publicação na forma de artigo original e de *brief communication*, respectivamente (Apêndice 1).

##### **4.2.4.1 Sequenciamento do gene *HJV***

O sequenciamento dos éxons 1, 2 e 3 do gene *HJV* não revelou nenhuma mutação. Já no éxon 4 foram identificadas 3 alterações (p.E302K, p.A310G e p.G320V).

A mutação p.E302K foi detectada em heterozigose (c.G904A, Figura 16A) em dois pacientes homens com idades de 61 e 65 anos. Ambos eram portadores do genótipo heterozigoto para p.H63D no gene *HFE*.

O polimorfismo p.A310G (c.C929G, rs7540883) foi detectado em heterozigose (Figura 16B), em uma mulher de 58 anos que apresentou 60,0% de saturação de transferrina e concentração de ferritina sérica de 443 µg/L.

Ainda foi identificada a mutação p.G320V em homozigose (rs74315323, c.G1284T, Figura 17), em um paciente de 22 anos. Ele apresentava valor de saturação de transferrina de 100,0% e sintomas clínicos característicos de hemocromatose juvenil, tais como: hipogonadismo hipogonadotrófico e intolerância à glicose. Os pais e os irmãos do paciente apresentavam valores normais dos parâmetros que avaliam o estado de ferro e nenhuma sintomatologia.

Além destas alterações exônicas, uma variante intrônica em heterozigose (IVS1 -36C > G) (Figura 16C) foi detectada em uma mulher de 46 anos. Pelo programa GeneSplicer<sup>®</sup>, esta variante não sugere alteração no sítio de *splicing*.

#### 4.2.4.2 Sequenciamento do gene *HAMP*

O sequenciamento dos éxons 1 e 2 não detectou nenhuma mutação.

No éxon 3, foi identificada a mutação p.R59G em heterozigose (c.A175G, Figura 18A) em um paciente homem de 63 anos. Este não apresentou mutações no gene *HFE*.

Também uma alteração intrônica em heterozigose (IVS3 +42G>A) (Figura 18B) foi identificada em um homem de 47 anos e portador do genótipo heterozigoto para p.H63D no gene *HFE*. Esta variante intrônica não apresentou potencial de alteração no sítio de *splicing*, sugerida pelo GeneSplicer<sup>®</sup>.

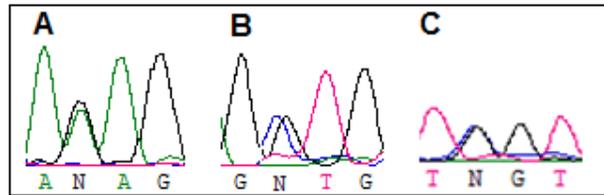


Figura 16. A: heterozigose para a mutação *HJV* p.E302K. B: heterozigose para o polimorfismo *HJV* p.A310G. C: heterozigose para a variante intrônica *HJV* IVS1 -36C>G.

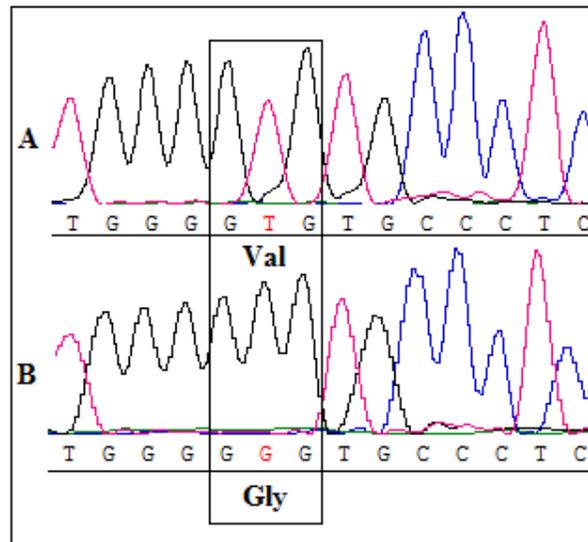


Figura 17. Homozigose para a mutação *HJV* p.G320V (rs74315323, c.G1284T, exon 4). A: sequência do paciente com hemocromatose juvenil, B: sequência do controle. Caixa mostrando a diferença entre as sequências do paciente (GTG-Val) e do controle (GGG-Gly).

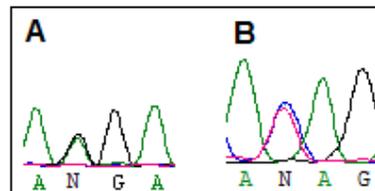


Figura 18. A: heterozigose para a mutação *HAMP* p.R59G. B: heterozigose para a variante intrônica *HAMP* IVS3 +42G>A.

#### 4.2.4.3 Sequenciamento do gene *TFR2*

No sequenciamento dos 18 éxons do gene *TFR2* foram identificados 3 polimorfismos descritos (p.A75V, p.A617A e p.R752H).

No éxon 2, o polimorfismo p.A75V foi detectado em heterozigose (c.C224T, Figura 19A) em um paciente. No éxon 16, o polimorfismo sinônimo p.A617A foi identificado (c.C1878T, Figura 19B) em 7 pacientes (6 heterozigotos e 1 homozigoto mutado). Já no éxon 18, o polimorfismo p.R752H foi observado em heterozigose (rs41295942, c.G2296A, Figura 19C) em 3 pacientes dos 51 incluídos no estudo.

#### 4.2.4.4 Sequenciamento do gene *SLC40A1*

No sequenciamento dos 8 éxons do gene *SLC40A1* foram identificados 6 polimorfismos não patogênicos (rs13008848, rs11568351, rs11568345, rs11568344 e rs2304704, rs11568346) e 1 alteração não descrita previamente na literatura (p.G204S).

No éxon 1, foram identificados 2 polimorfismos (rs13008848, UTR c.C98G e rs11568351, UTR c.G8C) com frequências do alelo variante de 22% e 20%, respectivamente. No éxon 4, os polimorfismos sinônimos p.I109I e p.L129L foram identificados em heterozigose (rs11568345, c.C678T e rs11568344, c.C738T; respectivamente) em 2 e 1 pacientes, respectivamente. Já no éxon 6, o polimorfismo sinônimo p.V221V (rs2304704, c.T1014C) foi detectado com frequências do alelo variante de 39%. No éxon 8, o polimorfismo descrito p.R561G (rs11568346, c.A1681G) foi identificado em homozigose (Figura 20) em 1 paciente homem de 59 anos e portador do genótipo heterozigoto para p.H63D no gene *HFE*.

A mutação não descrita previamente p.G204S em homozigose (c.G610A, éxon 6, Figura 21) foi identificada em uma paciente mulher de 52 anos, que não apresentou mutações no gene *HFE* e não relatou o conhecimento de familiares com o desenvolvimento de sobrecarga de ferro. Na análise de alinhamento da sequência da proteína ferroportina, o resíduo G204 está conservado em todos os organismos estudados (Figura 21).

A pesquisa da alteração p.G204S em 305 doadores de sangue controle identificou apenas o genótipo selvagem (Figura 22).

As duas filhas da paciente são portadoras da alteração p.G204S em heterozigose, apresentaram resultados normais para exames bioquímicos que avaliam estado de ferro e não relataram sintomas e sinais clínicos. A Tabela 14 demonstra o genótipo para a alteração p.G204S, as idades, os valores de exames bioquímicos e seus respectivos valores de referência.

Tabela 14. Dados genotípicos para a alteração *SLC40A1* p.G204S, idades e valores dos exames bioquímicos para a paciente e as duas filhas

	<b>Genótipo p.G204S</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Ferro sérico (µg/dL)</b>	<b>CTLF (µg/dL)</b>	<b>Ferritina sérica (µg/L)</b>
<b>Paciente</b>	Homozigoto	52	298	287	5236
<b>Filha A</b>	Heterozigoto	31	117	302	235
<b>Filha B</b>	Heterozigoto	33	69	315	158

CTLF: capacidade total de ligação com ferro.

Valores de referência: ferro sérico (59-158 µg/dL); CTLF (250-410 µg/dL); ferritina sérica (12-291 µg/L).

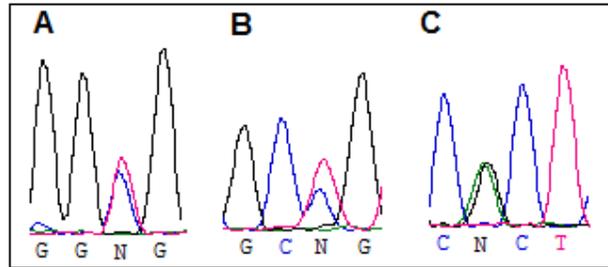


Figura 19. A: heterozigose para o polimorfismo *TFR2* p.A75V. B: heterozigose para o polimorfismo *TFR2* p.A617A. C: heterozigose para o polimorfismo *TFR2* p.R752H.

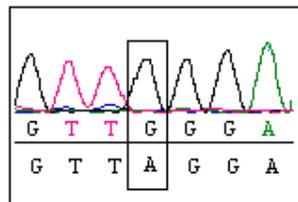


Figura 20. Homozigose para o polimorfismo *SLC40A1* p.R561G (rs11568346, c.A2032G, éxon 8).

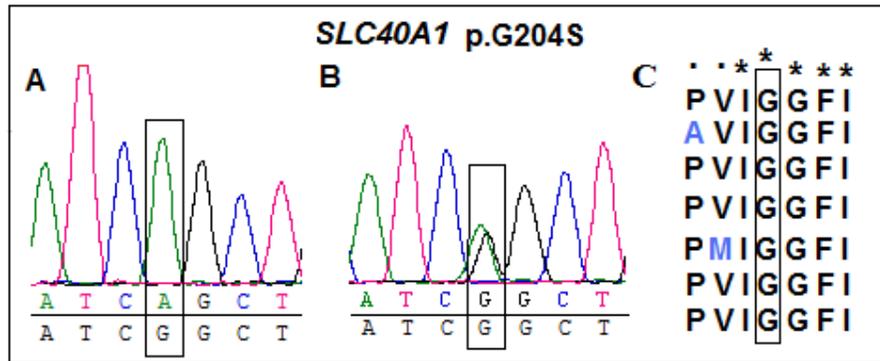


Figura 21. A: homozigose para a mutação *SLC40A1* p.G204S (c.G610A, éxon 6). B: heterozigose para a mutação p.G204S. C: Análise de alinhamento da sequência da proteína ferroporfina (gene *SLC40A1*) para diferentes espécies (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Diceros bicornis*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, respectivamente). Resíduos iguais são indicados por um asterisco (\*) e substituições semiconservadas por ponto (.).

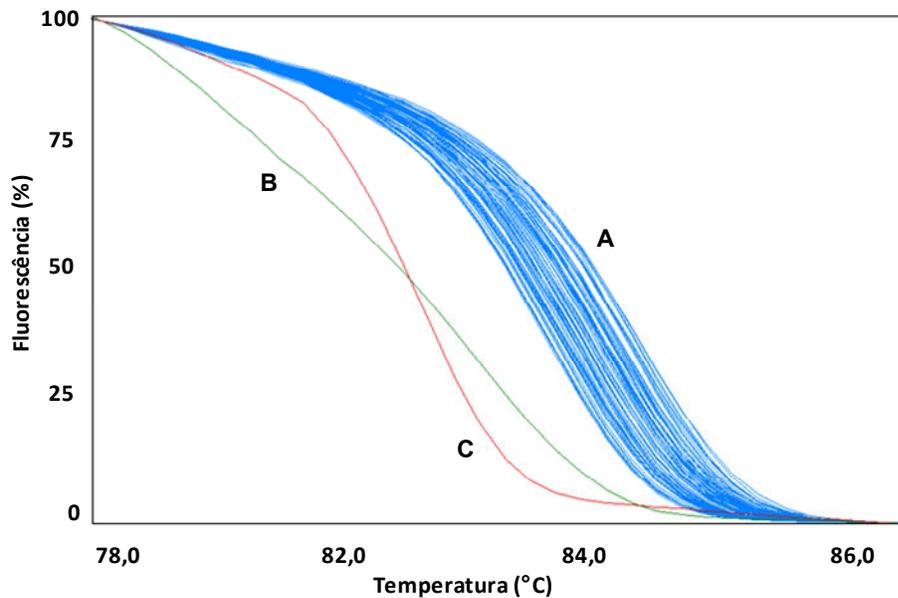


Figura 22. Gráfico dos genótipos para a mutação *SLC40A1* p.G204S (c.G610A, éxon 6) utilizando análise da curva de *melting*. A: Padrão de genótipo selvagem (amostras de indivíduos controle). B: Padrão de genótipo heterozigoto. C: Padrão de genótipo homozigoto.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Discussão para o grupo de doadores de sangue

As mutações nos genes *HFE* e *TFR2* foram associadas ao aumento da absorção de ferro em portadores de sobrecarga de ferro, porém existem poucos estudos destas mutações associadas com alterações fenotípicas em populações saudáveis ou em doadores de sangue (JACKSON et al., 2001; RADDATZ et al., 2003; SALVIONI et al., 2003).

A frequência do alelo *HFE* 282Y encontrada nesta amostra de 542 doadores de sangue (2,1%) foi semelhante ( $P \geq 0,05$ ) à descrita pelos estudos realizados em brasileiros saudáveis (1,1 a 1,4%) (AGOSTINHO et al., 1999; PEREIRA, MOTA e KRIEGER, 2001; BUENO, DUCH e FIGUEIREDO, 2006; TORRES et al., 2008) e em doadores de sangue da Colômbia (1,8%) (AVILA-GOMEZ et al., 2008). No entanto, a frequência do alelo *HFE* 282Y foi menor ( $P < 0,05$ ) do que as encontradas em doadores de sangue, no norte da Itália (4,7%) (SALVIONI et al., 2003) e no norte da Europa (5,1 a 8,2%) (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1997; MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1999; SIMONSEN et al., 1999; BECKMAN et al., 2001; JACKSON et al., 2001; MILMAN et al., 2005).

Em relação à mutação p.C282Y, é conhecido que o alelo mutado é raro em indivíduos não-caucasianos (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1997; MERCIER, BATHELIER e LUCOTTE, 1998). A menor frequência do alelo 282Y observada neste estudo pode ser explicada pela grande heterogeneidade étnica da população brasileira, a qual é resultante de cinco séculos de interação entre indivíduos de três continentes: os colonizadores europeus, representados principalmente pelos portugueses, os escravos africanos e os nativos ameríndios (PARRA et al., 2003). Provavelmente por este motivo, não foi encontrada diferença na frequência do alelo 282Y entre os grupos dos indivíduos brancos, pardos e negros ( $P \geq 0,05$ ).

A frequência do alelo 63D para a mutação p.H63D neste estudo (13,6%,  $P \geq 0,05$ ) foi semelhante às encontradas em doadores de sangue de várias regiões da Itália (14,4% - 14,9%) (POZZATO et al., 2001; SALVIONI et al., 2003), em doadores brancos nos Estados Unidos (15,0%) (MCLAREN et al., 2003) e em indivíduos saudáveis de estudos brasileiros (10,8 - 10,9%,  $P \geq 0,05$ ) (AGOSTINHO et al., 1999; BUENO, DUCH e FIGUEIREDO, 2006).

No que se refere à mutação p.S65C, a frequência do alelo 65C (0,6%,  $P \geq 0,05$ ) foi semelhante à de outro estudo brasileiro (1,0%) (BUENO, DUCH e FIGUEIREDO, 2006), a um estudo com doadores de sangue no norte da Itália (0,74%) (SALVIONI et al., 2003) e nas Ilhas Faroé (1,0%) (MILMAN et al., 2005).

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar mutações no gene *TFR2* na população brasileira. Mutações neste gene foram avaliadas porque é estimado que aproximadamente 500 mil portugueses chegaram ao Brasil entre os anos de 1500 e 1808; além do país ter recebido cerca de 4 milhões de imigrantes de várias partes do mundo (Itália, Espanha, Alemanha entre outros países) (PIMENTA et al., 2006). Entretanto, os alelos *TFR2* 690P e *TFR2* 250X (descritos inicialmente em portugueses e italianos, respectivamente) não foram encontrados neste estudo, sugerindo que, possivelmente, as mutações no gene *TFR2* sejam bastante raras e estejam presentes em áreas geográficas restritas ou em determinadas populações (DE GOBBI et al., 2001).

Não conseguimos demonstrar o efeito dos genótipos para mutações no gene *HFE* nos parâmetros que avaliam ferro em mulheres doadoras. É provável que a perda na menstruação ou a alta prevalência de deficiências nutricionais deste grupo poderiam ser as responsáveis por esta constatação (NIEDERAU et al., 1996; BARTON et al., 1998).

Ao contrário, alterações nos parâmetros de ferro foram encontradas nos doadores homens de primeira doação e esporádicos. É importante destacar que as alterações encontradas não refletem a presença de sobrecarga de ferro em doadores portadores dos alelos *HFE* 282Y ou *HFE* 63D. Mas estavam relacionadas a diferenças significativas nas concentrações da CTLF, da saturação de transferrina e da ferritina sérica entre os portadores dos alelos *HFE* 282Y e *HFE* 63D em relação aos homens de primeira doação portadores de genótipo selvagem.

A hipótese para explicar este efeito é que a proteína HFE mutada altera a ponte dissulfeto necessária na ligação a  $\beta 2M$  e conseqüente interação com o receptor de transferrina 1. Este receptor, por sua vez, fica livre para a transferrina se ligar e transportar o ferro dos enterócitos aos tecidos do organismo. Conseqüentemente, a absorção de ferro estará modulada inadequadamente pela proteína HFE (BENNETT, LEBRON e BJORKMAN, 2000; CAMASCHELLA, ROETTO e DE GOBBI, 2002). Outra hipótese sugere que mutações no gene *HFE* estejam associadas à diminuição da síntese hepática da hepcidina, que

consequentemente aumentaria a absorção de ferro via ferroportina (BRIDLE et al., 2003; NEMETH et al., 2004; PIETRANGELO et al., 2005; VUJIC SPASIC et al., 2008).

É possível que os efeitos dessas mutações possam ser agravados ou atenuados pela interação com outros fatores genéticos ou fatores ambientais, acarretando ou não a sobrecarga de ferro nestes indivíduos portadores de mutações, nas próximas duas ou três décadas de vida.

Os parâmetros de ferro são influenciados por idade, sexo, presença de doenças, bem como dentro de uma variação biológica individual (WORWOOD, 1994). Sabe-se ainda que a variável frequência das doações sanguíneas nos últimos 12 meses é importante para a análise dos dados, pois é positivamente correlacionada com a diminuição de ferro no plasma e em estoque no organismo (WITTE et al., 1996; BARTON et al., 1998). Nossos resultados confirmam a importância desta variável, principalmente na análise dos efeitos genotípicos-fenotípicos para os homens de primeira doação (grupo 1) em relação aos doadores frequentes (grupo 3).

## 5.2 Discussão para o grupo dos pacientes com sobrecarga de ferro primária

A frequência do genótipo homocigoto para a mutação p.C282Y no gene *HFE* (p.C282Y/p.C282Y; 21,6%) em pacientes com sobrecarga de ferro primária foi significativamente menor do que as frequências encontradas em estudos com pacientes norte-americanos, ingleses, italianos e alemães (64,0% a 96,3%,  $P < 0,05$ ) (FEDER et al., 1996; CARELLA et al., 1997; DATZ et al., 1997; BRISSOT et al., 1999; BRANDHAGEN et al., 2000; HIMMELMANN et al., 2000; HELLERBRAND et al., 2001).

O genótipo p.C282Y/p.C282Y é também menos frequente em pacientes suspeitos de HH em países onde a doença é rara, como, por exemplo, Rússia (2/39, 5%, (POTEKHINA et al., 2005)), China (0/49, (TSUI et al., 2000)), Japão (0/11; (SHIONO et al., 2001)) e África do Sul (0/25, (MCNAMARA et al., 1998)).

Deve-se ressaltar que a frequência da mutação p.C282Y não depende apenas do caráter étnico da população estudada, mas também dos critérios utilizados para o diagnóstico de sobrecarga de ferro e dos critérios de exclusão de cada estudo.

A mutação p.C282Y está claramente associada à HH, mas o papel da mutação p.H63D não é totalmente elucidado, exceto em heterozigose composta com a mutação p.C282Y (DUPRADEAU et al., 2008). Estudos têm demonstrado que outras mutações no gene *HFE*, como, por exemplo, as p.S65C, p.E277K e p.Q283P, podem estar associadas e de alguma forma acarretar o fenótipo da HH (LE GAC et al., 2003; ZAAHL et al., 2004; MENDES et al., 2009).

A mutação p.S65C não foi detectada em alguns estudos em pacientes brasileiros com sobrecarga de ferro (CANÇADO et al., 2007; BITTENCOURT et al., 2009). Outro estudo, com 633 indivíduos suspeitos de HH, observou frequência alélica de 0,8% para a mutação p.S65C, encontrada apenas em heterozigose; entretanto, esta frequência é similar à prevalência na população geral (OLIVEIRA et al., 2009). Em nosso estudo, foi identificada a mutação p.S65C em heterozigose composta com a p.H63D em dois pacientes com sobrecarga de ferro primária, porém não existem estudos que afirmem que esta combinação modifica a funcionalidade fisiológica da proteína *HFE*.

O sequenciamento dos éxons do gene *HFE* permitiu detectar uma mutação não descrita anteriormente (p.V256I). A análise de ligação *in silico*, realizada por modelagem molecular, mostrou diminuição da afinidade entre as proteínas HFE-p.C282Y e  $\beta$ 2M em relação à proteína HFE nativa, porém não foi observado resultado semelhante para a HFE-p.V256I. É provável que a mutação p.V256I não reduza a funcionalidade da proteína HFE em relação à  $\beta$ 2M e não acarrete o fenótipo da HH. Portanto, estudos que investiguem o efeito desta mutação na função e na atividade *in vivo* da proteína HFE são necessários.

A respeito da estratégia de sequenciar os éxons do gene *HFE*, foi possível concluir que esta abordagem na prática clínica não é viável, pois a metodologia não aumentou o diagnóstico molecular da hemocromatose para os 51 pacientes, em relação às genotipagens das mutações p.C282Y e p.H63D.

A hemocromatose juvenil (HJ) é uma forma rara de HH causada pelas mutações nos genes *HJV* (HJ tipo 2A) e *HAMP* (HJ tipo 2B). Esta apresenta herança autossômica recessiva e geralmente é caracterizada pelo início da manifestação fenotípica em jovens antes dos 30 anos, principalmente cardiomiopatia e alterações endócrinas (ROETTO et al., 2003; PAPANIKOLAOU et al., 2004; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007).

Com o sequenciamento dos genes *HJV* e *HAMP*, foram identificadas as seguintes alterações: a mutação *HJV* p.G320V, o polimorfismo *HJV* p.A310G, a mutação *HJV* p.E302K, a mutação *HAMP* p.R59G e duas variantes intrônicas sem sugestão de alteração no sítio de *splicing*.

A mutação *HJV* p.G320V identificada em homozigose é a principal causa da HJ e, neste estudo, foi observada em um paciente com características clínicas clássicas da doença: sobrecarga de ferro grave no adulto jovem, hipogonadismo hipogonadotrófico e intolerância à glicose, porém a função cardíaca deste paciente foi normal.

Este é o primeiro relato de diagnóstico molecular de HJ no Brasil (*HJV* p.G320V em homozigose). Na presença da sobrecarga de ferro de origem genética em paciente jovem, principalmente com manifestações endócrinas e cardíacas, deve-se suspeitar da forma juvenil da HH. A avaliação laboratorial da mutação *HJV* p.G320V poderá ser o diagnóstico molecular de escolha, pois, segundo estudos com pacientes portadores de HJ, o procedimento confirmaria mais que 80% dos casos (GEHRKE et al., 2005; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007). Neste contexto, o

diagnóstico molecular precoce faz com que haja um acompanhamento mais eficaz na terapêutica da depleção de ferro e nas manifestações da doença (GEHRKE et al., 2005; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007).

O polimorfismo *HJV* p.A310G em heterozigose foi identificado em um paciente do estudo. Porém, esta alteração não foi associada com o fenótipo da HH em estudos prévios (LEE et al., 2004; MENDES et al., 2009). Lee e colaboradores identificaram este polimorfismo em 19 indivíduos controles e em 2 pacientes com sobrecarga de ferro. Estes 2 grupos foram compostos por norte-americanos descendentes de africanos e apresentaram frequências do alelo 310G de 7% e 2%, respectivamente (LEE et al., 2004).

A mutação *HJV* p.E302K foi descrita anteriormente por Le Gac e colaboradores em um grupo de 310 pacientes de HH portadores do genótipo homozigoto para a mutação p.C282Y no gene *HFE*. Este grupo de pesquisadores observou que os dois pacientes portadores da mutação *HJV* p.E302K apresentavam sobrecarga de ferro e manifestações mais graves que os demais pacientes. Esta alteração não foi identificada em 333 amostras de indivíduos controle. Deste modo, foi sugerido que a mutação *HJV* p.E302K poderia acarretar consequências funcionais (LE GAC et al., 2004).

A mutação *HAMP* p.R59G foi descrita anteriormente por Jacolot e colaboradores em um grupo de 392 pacientes de HH portadores do genótipo homozigoto para a mutação p.C282Y no gene *HFE*. Observaram dois pacientes portadores da mutação *HAMP* p.R59G e estes apresentavam manifestações mais graves que os demais pacientes. Esta alteração não foi identificada em 300 amostras de indivíduos controle da mesma região geográfica dos pacientes. A posição do aminoácido 59 é crítica em relação à codificação do polipeptídeo *HAMP* (NICOLAS et al., 2002). Consequentemente, foi reportado que a mutação *HAMP* p.R59G previne a formação do polipeptídeo maduro de 25 aminoácidos e assim impede a atividade biológica (JACOLOTT et al., 2004).

Estudos relataram que mutações nos genes *HJV* e *HAMP* podem agir como moduladores genéticos para o fenótipo da HH (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 2003; BIASIOTTO et al., 2004; JACOLOTT et al., 2004; LE GAC et al., 2004). Jacolot e colaboradores, baseados em modelo de herança digênica, sugeriram que interações de mutações em heterozigose nos genes *HAMP* e *HFE* poderiam acarretar, pelo menos em alguns casos, um fenótipo de sobrecarga de ferro primária

(JACOLOT et al., 2004). Le Gac e colaboradores forneceram dados adicionais de que mutações no gene *HJV* poderiam explicar, em alguns pacientes, parte do fenótipo da HH relacionado à mutação p.C282Y (LE GAC et al., 2004).

Merryweather-Clarke e colaboradores propuseram que o fenótipo acarretado pelos genótipos heterozigotos e homozigotos para a mutação p.C282Y poderia ser modificado por mutações em heterozigose no gene *HAMP* que perturbem a função da hepcidina na homeostase do ferro (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 2003). Da mesma forma, Biasiotto e colaboradores identificaram mutações em heterozigose - p.N196K no gene *HJV* e -72C> T no gene *HAMP* - que agravaram os fenótipos clínicos e bioquímicos de indivíduos heterozigotos para a mutação *HFE* p.C282Y, indicando que ambos se comportam como genes modificadores na HH (BIASIOTTO et al., 2004).

Em contrapartida, alguns estudos não encontraram a mesma associação (LEE et al., 2004; ALTÈS et al., 2009). Altès e colaboradores encontraram uma mutação no gene *HJV* e um polimorfismo ainda não descrito no gene *HAMP* em 100 pacientes espanhóis. Para as duas variações, indicaram ausência de efeito na penetrância da HH relacionada ao gene *HFE* (ALTES et al., 2009). Lee e colaboradores demonstraram que polimorfismos na região codificadora do gene *HJV* também não foram associados à modulação da expressão fenotípica (LEE et al., 2004).

Neste estudo, foi proposta a hipótese de que mutações nos genes *HJV* e *HAMP* pudessem, juntas com as alterações no gene *HFE*, modificar o fenótipo da HH. Foram identificados dois pacientes com o genótipo heterozigoto para a mutação *HJV* p.E302K e ambos com genótipo heterozigoto para a *HFE* p.H63D. Também um paciente portador do genótipo heterozigoto para a mutação *HAMP* p.R59G e sem mutação identificada no gene *HFE*. Nestes casos, os pacientes não apresentavam maior gravidade da doença em relação aos demais e nenhuma característica clínica específica da hemocromatose juvenil. Deste modo, não foi possível indicar as mutações encontradas em heterozigose como as responsáveis pela doença, já que a HJ apresenta herança recessiva; e também não foi possível identificar interação das mutações nos genes *HJV* e *HAMP* com o gene *HFE* na amostra analisada.

Porém, mesmo as mutações nos genes *HJV* e *HAMP* não sendo frequentes nos pacientes estudados com fenótipo de HH tipo 1 (3/50), a contribuição destas

mutações em heterozigose não podem ser descartadas em interação com alterações em regiões intrônicas ou regulatórias dos genes relacionados à HH.

A HH tipo 3, associada às mutações no gene *TFR2*, apresenta herança autossômica recessiva e características clínicas similares à HH relacionada ao gene *HFE* (WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007). Foram identificados 3 polimorfismos descritos anteriormente (p.A75V, p.A617A e p.R752H) (MEREGALLI et al., 2000; LEE et al., 2001; MATTMAN et al., 2002); e nenhuma mutação patogênica foi detectada no gene *TFR2*, nem mesmo em heterozigose, indicando assim que alterações funcionais neste gene não são frequentes na amostra de pacientes com sobrecarga de ferro primária.

A HH tipo 4, associada às mutações no gene *SLC40A1* que codifica a proteína ferroportina, apresenta herança autossômica dominante (WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007). Esta forma de HH pode apresentar características clínicas diferentes em relação às demais HH: discreta anemia anteriormente à sobrecarga de ferro e, no momento da sobrecarga, a terapêutica por flebotomia pode agravar a anemia.

Na análise do gene *SLC40A1*, foram observados 5 polimorfismos não associados à sobrecarga de ferro (rs13008848, rs11568351, rs11568345, rs11568344 e rs2304704). Além disso, estes são observados na mesma frequência em indivíduos controle e não há estudos que indicaram potencial de alteração funcional na proteína (LEE et al., 2001; WALLACE e SUBRAMANIAM, 2007; CASTIELLA et al., 2010; MAYR et al., 2010). O polimorfismo *SLC40A1* p.R561G foi identificado em homozigose em um paciente. Entretanto, não é possível imputar causalidade deste polimorfismo para o paciente, já que alguns estudos indicam que esta não está acarretando alteração funcional na ferroportina (MAYR et al., 2010); e, além disso, está presente em grupos de indivíduos controle, na frequência alélica de 2,8% (LEE et al., 2001; LEE et al., 2002; CASTIELLA et al., 2010; MAYR et al., 2010).

A alteração não descrita previamente *SLC40A1* p.G204S foi identificada em homozigose no éxon 6 em uma paciente que não apresentou mutações no gene *HFE*. A fim de avaliar o potencial de causalidade foram analisadas as amostras de duas filhas da paciente e, deste modo, foi sugerido que esta alteração pode não ser a responsável pela sobrecarga de ferro da paciente, já que as duas filhas são portadoras da alteração, apresentam resultados normais de exames bioquímicos e

não relataram sintomatologia e sinais clínicos. Entretanto, não é descartada a patogenicidade da p.G204S para a sobrecarga de ferro, já que as filhas são adultas jovens e o fenótipo da doença se manifesta geralmente na quinta ou sexta década de vida. Outro ponto importante é que a alteração não foi observada nos 305 doadores de sangue controle, indicando assim que esta mutação é rara.

Em 14 dos 51 pacientes estudados, não foram encontradas mutações no principal gene associado à HH (o gene *HFE*). É concebível que esses indivíduos possam ser portadores de mutações localizadas em regiões intrônicas e/ou regulatórias dos genes estudados (*HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1*), ou até mesmo em outros genes relacionados a raros tipos de sobrecarga de ferro (*DMT1*, *ALAS2*, *TF* e *FTH*).



## 6. CONCLUSÕES

### 6.1 Conclusões para o grupo de doadores de sangue

Os alelos *HFE* 282Y e *HFE* 65C são raros nos doadores de sangue; enquanto o alelo *HFE* 63D é frequente e apresenta distribuição semelhante àquela encontrada em países norte-europeus.

As mutações p.Y250X e p.Q690P no gene *TFR2* não foram observadas em subamostras de doadores de sangue brasileiros.

As mutações *HFE* p.C282Y e *HFE* p.H63D foram associadas às alterações nos parâmetros que avaliam ferro em homens de primeira doação.

## **6.2 Conclusões para o grupo de pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária**

A mutação p.C282Y em homozigose, ou em heterozigose composta com a p.H63D, foi a mais frequente alteração associada à HH nesta amostra de pacientes.

O primeiro relato de diagnóstico molecular de HJ no Brasil (*HJV* p.G320V em homozigose) foi realizado.

Mutações funcionais, como as *HJV* p.E302K e *HAMP* p.R59G, foram identificadas e é possível que estas alterações possam estar contribuindo para consequências fenotípicas juntas a outras mutações em regiões intrônicas ou regulatórias dos genes.

O sequenciamento dos genes receptor de transferrina 2 e a ferroportina indicou a presença de vários polimorfismos já decritos; entretanto, observou-se que mutações funcionais nestes genes não são frequentes.

É concebível que alguns dos indivíduos estudados possam ser portadores de mutações localizadas em regiões intrônicas e/ou regulatórias dos genes estudados (*HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1*), ou até mesmo em outros genes relacionados a raros tipos de sobrecarga de ferro (*DMT1*, *ALAS2*, *TF* e *FTH*).

## REFERÊNCIAS

ABBOUD, S.; HAILE, D.J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.26, p.19906-19912, 2000.

ADAMS, P.C. Nonexpressing homozygotes for C282Y hemochromatosis: minority or majority of cases? **Molecular Genetics and Metabolism**, v.71, n.1/2, p.81-86, 2000.

AGOSTINHO, M.F.; ARRUDA, V.R.; BASSERES, D.S.; BORDIN, S.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.C.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.25, n.5/6, p.324-327, 1999.

AGUILAR-MARTINEZ, P.; SCHVED, J.F.; BRISSOT, P. The evaluation of hyperferritinemia: an updated strategy based on advances in detecting genetic abnormalities. **American Journal of Gastroenterology**, v.100, n.5, p.1185-1194, 2005.

AGUILAR-MARTINEZ, P.; LOK, C.Y.; CUNAT, S.; CADET, E.; ROBSON, K.; ROCHETTE, J. Juvenile hemochromatosis caused by a novel combination of hemojuvelin G320V/R176C mutations in a 5-year old girl. **Haematologica**, v.92, n.3, p.421-422, 2007.

ALEXANDER, J.; KOWDLEY, K.V. HFE-associated hereditary hemochromatosis. **Genetics in Medicine**, v.11, n.5, p.307-313, 2009.

ALTES, A.; BACH, V.; RUIZ, A.; ESTEVE, A.; FELEZ, J.; REMACHA, A.F.; SARDA, M.P.; BAIGET, M. Mutations in HAMP and HJV genes and their impact on expression of clinical hemochromatosis in a cohort of 100 Spanish patients homozygous for the C282Y mutation of HFE gene. **Annals of Hematology**, v.88, n.10, p.951-955, 2009.

ANDERSON, G.J.; DARSHAN, D.; WILKINS, S.J.; FRAZER, D.M. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. **BioMetals**, v.20, n.3/4, p.665-674, 2007.

ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, v.341, n.26, p.1986-1995, 1999.

ANDRIOPOULOS Jr., B.; CORRADINI, E.; XIA, Y.; FAASSE, S.A.; CHEN, S.; GRGUREVIC, L.; KNUTSON, M.D.; PIETRANGELO, A.; VUKICEVIC, S.; LIN, H.Y.; BABITT, J.L. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. **Nature Genetics**, v.41, n.4, p.482-487, 2009.

AVILA-GOMEZ, I.C.; ARISTIZABAL-BERNAL, B.; JIMENEZ-DEL-RIO, M.; VELEZ-PARDO, C. Prevalence of H63D, S65C and C282Y mutations of the HFE gene in 1120 voluntary blood donors from Antioquia region of northwest Colombia. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.40, n.3, p.449-451, 2008.

BABITT, J.L.; HUANG, F.W.; WRIGHTING, D.M.; XIA, Y.; SIDIS, Y.; SAMAD, T.A.; CAMPAGNA, J.A.; CHUNG, R.T.; SCHNEYER, A.L.; WOOLF, C.J.; ANDREWS,

N.C.; LIN, H.Y. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. **Nature Genetics**, v.38, n.5, p.531-539, 2006.

BABITT, J.L.; HUANG, F.W.; XIA, Y.; SIDIS, Y.; ANDREWS, N.C.; LIN, H.Y. Modulation of bone morphogenetic protein signaling *in vivo* regulates systemic iron balance. **Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.7, p.1933-1939, 2007.

BALLA, J.; BALLA, G.; LAKATOS, B.; JENEY, V.; SZENTMIHALYI, K. A. Heme-iron in the human body. **Orvosi Hetilap**, v.148, n.36, p.1699-1706, 2007.

BARBOSA, K.V.; SOUZA, A.F.; CHEBLI, J.M.; PROIETTI, F.A.; MEIRELLES, R.S.; SOUZA, J.L. Hereditary hemochromatosis: population screening based on phenotype in Brazilian blood donors. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.39, n.5, p. 0-434, 2005.

BARTON, J.C.; MCDONNELL, S.M.; ADAMS, P.C.; BRISSOT, P.; POWELL, L.W.; EDWARDS, C.Q.; COOK, J.D.; KOWDLEY, K.V. Management of hemochromatosis: Hemochromatosis Management Working Group. **Annals of Internal Medicine**, v.129, n.11, p.932-939, 1998.

BARTON, J.C.; SAWADA-HIRAI, R.; ROTHENBERG, B.E.; ACTON, R.T. Two novel missense mutations of the HFE gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.25, n.3/4, p.147-155, 1999.

BARTON, J.C.; RAO, S.V.; PEREIRA, N.M.; GELBART, T.; BEUTLER, E.; RIVERS, C.A.; ACTON, R.T. Juvenile hemochromatosis in the Southeastern United States: a report of seven cases in two kinships. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.29, n.1, p.104-115, 2002.

BASSETT, M.L.; HALLIDAY, J.W.; POWELL, L.W. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. **Hepatology**, v.6, n.1, p.24-29, 1986.

BEARD, J.L.; DAWSON, H.; PINERO, D.J. Iron metabolism: a comprehensive review. **Nutrition Reviews**, v.54, n.10, p.295-317, 1996.

BECKMAN, L.E.; SJOBERG, K.; ERIKSSON, S.; BECKMAN, L. Haemochromatosis gene mutations in Finns, Swedes and Swedish Saamis. **Human Heredity**, v.52, n.2, p.110-112, 2001.

BENNETT, M.J.; LEBRON, J.A.; BJORKMAN, P.J. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. **Nature**, v.403, n.6765, p.46-53, 2000.

BEST, L.G.; HARRIS, P.E.; SPRIGGS, E.L. Hemochromatosis mutations C282Y and H63D in 'cis' phase. **Clinical Genetics**, v.60, n.1, p.68-72, 2001.

BEUTLER, E. The significance of the 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. **American Journal of Human Genetics**, v.61, n.3, p.762-764, 1997.

BIASIOTTO, G.; ROETTO, A.; DARAI, F.; POLOTTI, A.; GERARDI, G.M.; GIRELLI, D.; CREMONESI, L.; AROSIO, P.; CAMASCHELLA, C. Identification of new mutations of hepcidin and hemojuvelin in patients with HFE C282Y allele. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.33, n.3, p.338-343, 2004.

BITTENCOURT, P.L.; MARIN, M.L.; COUTO, C.A.; CANCADO, E.L.; CARRILHO, F.J.; GOLDBERG, A.C. Analysis of HFE and non-HFE gene mutations in Brazilian patients with hemochromatosis. **Clinics (Sao Paulo)**, v.64, n.9, p.837-841, 2009.

BONINI-DOMINGOS, C.R.; ZAMARO, P.J.A. Frequency of hereditary hemochromatosis gene mutations (C282Y and H63D) in hemoglobin S carrier from Brazil. **Vita et Sanitas**, v.1, n.1, p.1, 2007.

BOZZINI, C.; CAMPOSTRINI, N.; TROMBINI, P.; NEMETH, E.; CASTAGNA, A.; TENUTI, I.; CORROCHER, R.; CAMASCHELLA, C.; GANZ, T.; OLIVIERI, O.; PIPERNO, A.; GIRELLI, D. Measurement of urinary hepcidin levels by SELDI-TOF-MS in HFE-hemochromatosis. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.40, n.3, p.347-352, 2008.

BRANDHAGEN, D.J.; FAIRBANKS, V.F.; BALDUS, W.P.; SMITH, C.I.; KRUCKEBERG, K.E.; SCHAID, D.J.; THIBODEAU, S.N. Prevalence and clinical significance of HFE gene mutations in patients with iron overload. **American Journal of Gastroenterology**, v.95, n.10, p.2910-2914, 2000.

BRIDLE, K.R.; FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; DIXON, J.L.; PURDIE, D.M.; CRAWFORD, D.H.G.; SUBRAMANIAM, V.N.; POWELL, L.W.; ANDERSON, G.J.; RAMM, G.A. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. **Lancet**, v.361, n.9358, p.669-673, 2003.

BRISSOT, P.; MOIRAND, R.; JOUANOLLE, A.M.; GUYADER, D.; LE GALL, J.Y.; DEUGNIER, Y.; DAVID, V. A genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as "genetic hemochromatosis" on "classical" phenotypic criteria. **Journal of Hepatology**, v.30, n.4, p.588-593, 1999.

BRISSOT, P.; TROADEC, M.B.; BARDOU-JACQUET, E.; LE LAN, C.; JOUANOLLE, A.M.; DEUGNIER, Y.; LOREAL, O. Current approach to hemochromatosis. **Blood Reviews**, v.22, n.4, p.195-210, 2008.

BUENO, S.; DUCH, C.R.; FIGUEIREDO, M.S. Mutations in the *HFE* gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.28, n.4, p.293-295, 2006.

CAMASCHELLA, C.; ROETTO, A.; CALI, A.; DE GOBBI, M.; GAROZZO, G.; CARELLA, M.; MAJORANO, N.; TOTARO, A.; GASPARINI, P. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. **Nature Genetics**, v.25, n.1, p.14-15, 2000.

CAMASCHELLA, C.; ROETTO, A.; DE GOBBI, M. Genetic haemochromatosis: genes and mutations associated with iron loading. **Best Practice & Research, Clinical Haematology**, v.15, n.2, p.261-276, 2002.

CAMASCHELLA, C.; POGGIALI, E. Rare types of genetic hemochromatosis. **Acta Haematologica**, v.122, n.2/3, p.140-145, 2009.

CANÇADO, R.D.; GUGLIELMI, A.C.O.; VERGUEIRO, C.S.V.; ROLIM, E.G.; FIGUEIREDO, M.S.; CHIATTONE, C.S. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro = Study of C282Y, H63D and S65C mutations in the HFE gene in Brazilian patients with iron overload. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.4, p.351-360, 2007.

CARELLA, M.; D'AMBROSIO, L.; TOTARO, A.; GRIFA, A.; VALENTINO, M.A.; PIPERNO, A.; GIRELLI, D.; ROETTO, A.; FRANCO, B.; GASPARINI, P.; CAMASCHELLA, C. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. **American Journal of Human Genetics**, v.60, n.4, p.828-832, 1997.

CASTIELLA, A.; ZAPATA, E.; OTAZUA, P.; ZUBIAURRE, L.; FERNANDEZ, J. Non-HFE-related hemochromatosis: the role of genetic factors. **Hepatology**, v.51, n.4, p.1473-1474, author reply 1474, 2010.

CAZZOLA, M. Novel genes, proteins, and inherited disorders of iron overload: iron metabolism is less boring than thought. **Haematologica**, v.87, n.2, p.115-116, 2002.

CAZZOLA, M. Genetic disorders of iron overload and the novel "ferroportin disease". **Haematologica**, v.88, n.7, p.721-724, 2003.

CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.40, n.2, p.151-182, 2003.

CLARK, S.F. Iron deficiency anemia: diagnosis and management. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.25, n.2, p.122-128, 2009.

CREMONESI, L.; CEMONESI, L.; FORNI, G.L.; SORIANI, N.; LAMAGNA, M.; FERMO, I.; DARAI, F.; GALLI, A.; PIETRA, D.; MALCOVATI, L.; FERRARI, M.; CAMASCHELLA, C.; CAZZOLA, M. Genetic and clinical heterogeneity of ferroportin disease. **British Journal of Haematology**, v.131, n.5, p.663-670, 2005.

DANIELE, B.; D'AGOSTINO, L. Proliferation and differentiation of the small intestinal epithelium: from Petri dish to bedside. **Italian Journal of Gastroenterology**, v.26, n.9, p.459-470, 1994.

DATZ, C.; LALLOZ, M.R.; VOGEL, W.; GRAZIADEI, I.; HACKL, F.; VAUTIER, G.; LAYTON, D.M.; MAIER-DOBERSBERGER, T.; FERENCI, P.; PENNER, E.; SANDHOFER, F.; BOMFORD, A.; PAULWEBER, B. Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic haemochromatosis. **Journal of Hepatology**, v.27, n.5, p.773-779, 1997.

DE DOMENICO, I.; WARD, D.M.; KAPLAN, J. Hepcidin regulation: ironing out the details. **Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.7, p.1755-1758, 2007.

DE DOMENICO, I.; MCVEY WARD, D.; KAPLAN, J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, n.1, p.72-81, 2008.

DE GOBBI, M.; BARILARO, M.R.; GAROZZO, G.; SBAIZ, L.; ALBERTI, F.; CAMASCHELLA, C. TFR2 Y250X mutation in Italy. **British Journal of Haematology**, v.114, n.1, p.243-244, 2001.

DE GOBBI, M.; ROETTO, A.; PIPERNO, A.; MARIANI, R.; ALBERTI, F.; PAPANIKOLAOU, G.; POLITOU, M.; LOCKITCH, G.; GIRELLI, D.; FARGION, S.; COX, T.M.; GASPARINI, P.; CAZZOLA, M.; CAMASCHELLA, C. Natural history of juvenile haemochromatosis. **British Journal of Haematology**, v.117, n.4, p.973-979, 2002.

DONOVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S.J.; MOYNIHAN, J.; PAW, B.H.; DREJER, A.; BARUT, B.; ZAPATA, A.; LAW, T.C.; BRUGNARA, C.; LUX, S.E.; PINKUS, G.S.; PINKUS, J.L.; KINGSLEY, P.D.; PALIS, J.; FLEMING, M.D.; ANDREWS, N.C.; ZON, L.I. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. **Nature**, v.403, n.6771, p.776-781, 2000.

DUPRADEAU, F.Y.; PISSARD, S.; COULHON, M.P.; CADET, E.; FOULON, K.; FOURCADE, C.; GOOSSENS, M.; CASE, D.A.; ROCHETTE, J. An unusual case of hemochromatosis due to a new compound heterozygosity in HFE (p.[Gly43Asp;His63Asp]+[Cys282Tyr]): structural implications with respect to binding with transferrin receptor 1. **Human Mutation**, v.29, n.1, p.206, 2008.

FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D.A.; BASAVA, A.; DORMISHIAN, F.; DOMINGO Jr., R.; ELLIS, M.C.; FULLAN, A.; HINTON, L.M.; JONES, N.L.; KIMMEL, B.E.; KRONMAL, G.S.; LAUER, P.; LEE, V.K.; LOEB, D.B.; MAPA, F.A.; MCCLELLAND, E.; MEYER, N.C.; MINTIER, G.A.; MOELLER, N.; MOORE, T.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; QUINTANA, L.; STARNES, S.M.; SCHATZMAN, R.C.; BRUNKE, K.J.; DRAYNA, D.T.; RISCH, N.J.; BACON, B.R.; WOLFF, R.K. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nature Genetics**, v.13, n.4, p.399-408, 1996.

FEDER, J.N.; TSUCHIHASHI, Z.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; MAPA, F.A.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; STARNES, S.M.; WOLFF, R.K.; PARKKILA, S.; SLY, W.S.; SCHATZMAN, R.C. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.22, p.14025-14028, 1997.

FEDER, J.N.; PENNY, D.M.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; LEBRON, J.A.; WATSON, N.; TSUCHIHASHI, Z.; SIGAL, E.; BJORKMAN, P.J.; SCHATZMAN, R.C. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.95, n.4, p.1472-1477, 1998.

FLEMING, R.E.; BRITTON, R.S.; WAHEED, A.; SLY, W.S.; BACON, B.R. Pathophysiology of hereditary hemochromatosis. **Seminars in Liver Disease**, v.25, n.4, p.411-419, 2005.

FRANCHINI, M.; GANDINI, G.; APRILI, G. Advances in iron chelating therapy. **Haematologica**, v.85, n.11, p.1122-1125, 2000.

FRANCHINI, M.; VENERI, D. Iron overload and hematologic malignancies. **Hematology Journal**, v.5, n.5, p.381-383, 2004.

FRANCHINI, M. Recent acquisitions in the management of iron overload. **Annals of Hematology**, v.84, n.10, p.640-645, 2005.

FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.30, n.3, p.288-297, 2003.

FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.289, n.4, p.G631-G635, 2005.

GANZ, T. Hepcidin in iron metabolism. **Current Opinion in Hematology**, v.11, n.4, p.251-254, 2004.

GEHRKE, S.G.; PIETRANGELO, A.; KASCAK, M.; BRANER, A.; EISOLD, M.; KULAKSIZ, H.; HERRMANN, T.; HEBLING, U.; BENTS, K.; GUGLER, R.; STREMMEL, W. HJV gene mutations in European patients with juvenile hemochromatosis. **Clinical Genetics**, v.67, n.5, p.425-428, 2005.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, n.2, p.208-215, 2006.

GOODWIN, J.F.; MURPHY, B. The colorimetric determination of iron in biological material with reference to its measurement during chelation therapy. **Clinical Chemistry**, v.12, n.2, p.58-69, 1966.

GUYADER, D.; JACQUELINET, C.; MOIRAND, R.; TURLIN, B.; MENDLER, M.H.; CHAPERON, J.; DAVID, V.; BRISSOT, P.; ADAMS, P.; DEUGNIER, Y. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. **Gastroenterology**, v.115, n.4, p.929-936, 1998.

HELLERBRAND, C.; BOSSERHOFF, A.K.; SEEGER, S.; LINGNER, G.; WREDE, C.; LOCK, G.; SCHOLMERICH, J.; BUTTNER, R. Mutation analysis of the HFE gene in German hemochromatosis patients and controls using automated SSCP-based capillary electrophoresis and a new PCR-ELISA technique. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.36, n.11, p.1211-1216, 2001.

HETET, G.; DEVAUX, I.; SOUFIR, N.; GRANDCHAMP, B.; BEAUMONT, C. Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11A3) mutations. **Blood**, v.102, n.5, p.1904-1910, 2003.

HIMMELMANN, A.; BORTOLUZZI, L.; JANSEN, S.; FEHR, J. [Frequency of HFE gene mutations and genotype-phenotype correlations in patients with hereditary hemochromatosis in Switzerland]. **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, v.130, n.31/32, p.1112-9, 2000.

HOCKER, M.; WIEDENMANN, B. Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.859, p.160-174, 1998.

HOFMANN, W.K.; TONG, X.J.; AJIOKA, R.S.; KUSHNER, J.P.; KOEFFLER, H.P. Mutation analysis of transferrin-receptor 2 in patients with atypical hemochromatosis. **Blood**, v.100, n.3, p.1099-1100, 2002.

HUANG, F.W.; RUBIO-ALIAGA, I.; KUSHNER, J.P.; ANDREWS, N.C.; FLEMING, M.D. Identification of a novel mutation (C321X) in HJV. **Blood**, v.104, n.7, p.2176-2177, 2004.

JACKSON, H.A.; CARTER, K.; DARKE, C.; GUTTRIDGE, M.G.; RAVINE, D.; HUTTON, R.D.; NAPIER, J.A.; WORWOOD, M. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. **British Journal of Haematology**, v.114, n.2, p.474-484, 2001.

JACOLOT, S.; LE GAC, G.; SCOTET, V.; QUERE, I.; MURA, C.; FEREC, C. HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. **Blood**, v.103, n.7, p.2835-2840, 2004.

KAUTZ, L.; MEYNARD, D.; MONNIER, A.; DARNAUD, V.; BOUVET, R.; WANG, R.H.; DENG, C.; VAULONT, S.; MOSSER, J.; COPPIN, H.; ROTH, M.-P. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. **Blood**, v.112, n.4, p.1503-1509, 2008.

KAWABATA, H.; YANG, R.; HIRAMA, T.; VUONG, P.T.; KAWANO, S.; GOMBART, A.F.; KOEFFLER, H.P. Molecular cloning of transferrin receptor 2: a new member of the transferrin receptor-like family. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.30, p.20826-20832, 1999.

KAWABATA, H.; GERMAIN, R.S.; IKEZOE, T.; TONG, X.; GREEN, E.M.; GOMBART, A.F.; KOEFFLER, H.P. Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. **Blood**, v.98, n.6, p.1949-1954, 2001.

KAWABATA, H.; NAKAMAKI, T.; IKONOMI, P.; SMITH, R.D.; GERMAIN, R.S.; KOEFFLER, H.P. Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. **Blood**, v.98, n.9, p.2714-2719, 2001.

KAWABATA, H.; FLEMING, R.E.; GUI, D.; MOON, S.Y.; SAITOH, T.; O'KELLY, J.; UMEHARA, Y.; WANO, Y.; SAID, J.W.; KOEFFLER, H.P. Expression of hepcidin is down-regulated in Tfr2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. **Blood**, v.105, n.1, p.376-381, 2005.

KOYAMA, C.; WAKUSAWA, S.; HAYASHI, H.; UENO, T.; SUZUKI, R.; YANO, M.; SAITO, H.; OKAZAKI, T. A Japanese family with ferroportin disease caused by a

novel mutation of SLC40A1 gene: hyperferritinemia associated with a relatively low transferrin saturation of iron. **Internal Medicine**, v.44, n.9, p.990-993, 2005.

LANZARA, C.; ROETTO, A.; DARAIO, F.; RIVARD, S.; FICARELLA, R.; SIMARD, H.; COX, T.M.; CAZZOLA, M.; PIPERNO, A.; GIMENEZ-ROQUEPLO, A.-P.; GRAMMATICO, P.; VOLINIA, S.; GASPARINI, P.; CAMASCHELLA, C. Spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis. **Blood**, v.103, n.11, p.4317-4321, 2004.

LEBRON, J.A.; BENNETT, M.J.; VAUGHN, D.E.; CHIRINO, A.J.; SNOW, P.M.; MINTIER, G.A.; FEDER, J.N.; BJORKMAN, P.J. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. **Cell**, v.93, n.1, p.111-123, 1998.

LEE, P.L.; HALLORAN, C.; WEST, C.; BEUTLER, E. Mutation analysis of the transferrin receptor-2 gene in patients with iron overload. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.27, n.1, p.285-289, 2001.

LEE, P.; GELBART, T.; WEST, C.; HALLORAN, C.; BEUTLER, E. Seeking candidate mutations that affect iron homeostasis. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.29, n.3, p.471-487, 2002.

LEE, P.L.; BEUTLER, E.; RAO, S.V.; BARTON, J.C. Genetic abnormalities and juvenile hemochromatosis: mutations of the HJV gene encoding hemojuvelin. **Blood**, v.103, n.12, p.4669-4671, 2004.

LEE, P.L.; BEUTLER, E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.4, p.489-515, 2009.

LE GAC, G.; DUPRADEAU, F.Y.; MURA, C.; JACOLOT, S.; SCOTET, V.; ESNAULT, G.; MERCIER, A.-Y.; ROCHETTE, J.; FEREC, C. Phenotypic expression of the C282Y/Q283P compound heterozygosity in HFE and molecular modeling of the Q283P mutation effect. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.30, n.3, p.231-237, 2003.

LE GAC, G.; SCOTET, V.; KA, C.; GOURLAOUEN, I.; BRYCKAERT, L.; JACOLOT, S.; MURA, C.; FEREC, C. The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. **Human Molecular Genetics**, v.13, n.17, p.1913-1918, 2004.

LEONG, W.I.; LONNERDAL, B. Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. **Journal of Nutrition**, v.134, n.1, p.1-4, 2004.

LIN, L.; GOLDBERG, Y.P.; GANZ, T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. **Blood**, v.106, n.8, p.2884-2889, 2005.

LIN, L.; VALORE, E.V.; NEMETH, E.; GOODNOUGH, J.B.; GABAYAN, V.; GANZ, T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. **Blood**, v.110, n.6, p.2182-2189, 2007.

LOMBARD, M.; CHUA, E.; O'TOOLE, P. Regulation of intestinal non-haem iron absorption. **Gut**, v.40, n.4, p.435-439, 1997.

MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **Journal of Clinical Pathology**, v.18, n.6, p.790-792, 1965.

MARTINELLI, A.L.; FRANCO, R.F.; VILLANOVA, M.G.; FIGUEIREDO, J.F.; SECAF, M.; TAVELLA, M.H.; RAMALHO, L.N.; ZUCOLOTO, S.; ZAGO, M.A. Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? **Acta Haematologica**, v.102, n.3, p.152-156, 2000.

MATTMAN, A.; HUNTSMAN, D.; LOCKITCH, G.; LANGLOIS, S.; BUSKARD, N.; RALSTON, D.; BUTTERFIELD, Y.; RODRIGUES, P.; JONES, S.; PORTO, G.; MARRA, M.; SOUSA, M.; VATCHER, G. Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation. **Blood**, v.100, n.3, p.1075-1077, 2002.

MAYR, R.; JANECKE, A.R.; SCHRANZ, M.; GRIFFITHS, W.J.H.; VOGEL, W.; PIETRANGELO, A.; ZOLLER, H. Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. **Journal of Hepatology**, v.53, n.5, p.941-949, 2010.

MCDONNELL, S.M.; PRESTON, B.L.; JEWELL, S.A.; BARTON, J.C.; EDWARDS, C.Q.; ADAMS, P.C.; YIP, R. A survey of 2,851 patients with hemochromatosis: symptoms and response to treatment. **American Journal of Medicine**, v.106, n.6, p.619-624, 1999.

MCLAREN, C.E.; LI, K.T.; GARNER, C.P.; BEUTLER, E.; GORDEUK, V.R. Mixture distribution analysis of phenotypic markers reflecting HFE gene mutations. **Blood**, v.102, n.13, p.4563-4566, 2003.

MCNAMARA, L.; MACPHAIL, A.P.; GORDEUK, V.R.; HASSTEDT, S.J.; ROUAULT, T. Is there a link between African iron overload and the described mutations of the hereditary haemochromatosis gene? **British Journal of Haematology**, v.102, n.5, p.1176-1178, 1998.

MENDES, A.I.; FERRO, A.; MARTINS, R.; PICANCO, I.; GOMES, S.; CERQUEIRA, R.; CORREIA, M.; NUNES, A.R.; ESTEVES, J.; FLEMING, R.; FAUSTINO, P. Non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal: novel mutations identified in iron metabolism-related genes. **Annals of Hematology**, v.88, n.3, p.229-234, 2009.

MERCIER, G.; BATHELIER, C.; LUCOTTE, G. Frequency of the C282Y mutation of hemochromatosis in five French populations. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.24, n.2, p.165-166, 1998.

MEREGALLI, M.; CORBETTA, N.; PELLAGATTI, A.; MARTINEZ DI MONTEMUROS, F.; TAVAZZI, D.; FARGION, S.; SAMPIETRO, M. A novel polymorphism (219G>A) in the transferrin receptor gene. **Human Mutation**, v.15, n.4, p.389, 2000.

MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; POINTON, J.J.; SHEARMAN, J.D.; ROBSON, K.J. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. **Journal of Medical Genetics**, v.34, n.4, p.275-278, 1997.

MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; POINTON, J.J.; SHEARMAN, J.D.; ROBSON, K.J.H.; JOUANOLLE, A.M.; MOSSER, A.; DAVID, V.; LE GALL, J.-Y.; HALSALL,

D.J.; ELSEY, T.S.; KELLY, A.; COX, T.M.; CLARE, M.; BOMFORD, A.; VANDWALLE, J.L.; ROCHETTE, J.; BOROT, N.; COPPIN, H.; ROTH, M.-P.; RYAN, E.; CROWE, J.; TOTARO, A.; GASPARINI, P.; ROETTO, A.; CAMASCHELLA, C.; DARKE, C.; WALLACE, D.F.; SAEB-PARSY, K.; DOOLEY, J.S.; WORWOOD, M.; WALKER, A.P.; European Haemochromatosis Consortium. Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results. **Nature Genetics**, v.23, n.3, p.271-272, 1999.

MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; CADET, E.; BOMFORD, A.; CAPRON, D.; VIPRAKASIT, V.; MILLER, A.; MCHUGH, P.J.; CHAPMAN, R.W.; POINTON, J.J.; WIMHURST, V.L.C.; LIVESEY, K.J.; TANPHAICHITR, V.; ROCHETTE, J.; ROBSON, K.J.H. Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. **Human Molecular Genetics**, v.12, n.17, p.2241-2247, 2003.

MEYNARD, D.; KAUTZ, L.; DARNAUD, V.; CANONNE-HERGAUX, F.; COPPIN, H.; ROTH, M.P. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. **Nature Genetics**, v.41, n.4, p.478-481, 2009.

MILMAN N.A.; STEIG, T.; KOEFOED, P.; PEDERSEN, P.; FENGER, K.; NIELSEN, F.C. Frequency of the hemochromatosis HFE mutations C282Y, H63D, and S65C in blood donors in the Faroe Islands. **Annals of Hematology**, v.84, n.3, p.146-149, 2005.

MONTOSI, G.; DONOVAN, A.; TOTARO, A.; GARUTI, C.; PIGNATTI, E.; CASSANELLI, S.; TRENOR, C.C.; GASPARINI, P.; ANDREWS, N.C.; PIETRANGELO, A. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. **Journal of Clinical Investigation**, v.108, n.4, p.619-623, 2001.

MOURA, E.; NOORDERMEER, M.A.; VERHOEVEN, N.; VERHEUL, A.F.; MARX, J.J. Iron release from human monocytes after erythrophagocytosis *in vitro*: an investigation in normal subjects and hereditary hemochromatosis patients. **Blood**, v.92, n.7, p.2511-2519, 1998.

MUNOZ, M.; VILLAR, I.; GARCIA-ERCE, J.A. An update on iron physiology. **World Journal of Gastroenterology**, v.15, n.37, p.4617-4626, 2009.

MURA, C.; NOUSBAUM, J.B.; VERGER, P.; MOALIC, M.T.; RAGUENES, O.; MERCIER, A.Y.; FEREC, C. Phenotype-genotype correlation in haemochromatosis subjects. **Human Genetics**, v.101, n.3, p.271-276, 1997.

MURA, C.; RAGUENES, O.; FEREC, C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. **Blood**, v.93, n.8, p.2502-2505, 1999.

NAGY, E.; EATON, J.W.; JENEY, V.; SOARES, M.P.; VARGA, Z.; GALAJDA, Z.; SZENTMIKLOSI, J.; MEHES, G.; CSONKA, T.; SMITH, A.; VERCELLOTTI, G.M.; BALLA, G.; BALLA, J. Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.30, n.7, p.1347-1353, 2010.

NAOUM, P.C.; CAMPOS, M.C.; PARENTI, M.F.; SZYMANSKI, A.M. An improved electrophoretic method for a screening program for haemoglobinopathies. **Experientia**, v.36, n.7, p.875-876, 1980.

NEMETH, E.; TUTTLE, M.S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN, A.; WARD, D.M.; GANZ, T.; KAPLAN, J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v.306, n.5704, p.2090-2093, 2004.

NEMETH, E.; ROETTO, A.; GAROZZO, G.; GANZ, T.; CAMASCHELLA, C. Heparin is decreased in TFR2 hemochromatosis. **Blood**, v.105, n.4, p.1803-1806, 2005.

NEMETH, E.; GANZ, T. The role of heparin in iron metabolism. **Acta Haematologica**, v.122, n.2/3, p.78-86, 2009.

NICOLAS, G.; VIATTE, L.; BENNOUN, M.; BEAUMONT, C.; KAHN, A.; VAULONT, S. Heparin, a new iron regulatory peptide. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.29, n.3, p.327-335, 2002.

NICOLAS, G.; VIATTE, L.; LOU, D.Q.; BENNOUN, M.; BEAUMONT, C.; KAHN, A.; ANDREWS, N.C.; VAULONT, S. Constitutive heparin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. **Nature Genetics**, v.34, n.1, p.97-101, 2003.

NIEDERAU, C.; FISCHER, R.; PURSCHEL, A.; STREMMEL, W.; HAUSSINGER, D.; STROHMEYER, G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. **Gastroenterology**, v.110, n.4, p.1107-1119, 1996.

NJAJOU, O.T.; ALIZADEH, B.Z.; VAN DUIJN, C.M. Is genetic screening for hemochromatosis worthwhile? **European Journal of Epidemiology**, v.19, n.2, p.101-108, 2004.

OHGAMI, R.S.; CAMPAGNA, D.R.; GREER, E.L.; ANTIOCHOS, B.; MCDONALD, A.; CHEN, J.; SHARP, J.J.; FUJIWARA, Y.; BARKER, J.E.; FLEMING, M.D. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. **Nature Genetics**, v.37, n.11, p.1264-1269, 2005.

OLIVEIRA, T.M.; SOUZA, F.P.; JARDIM, A.C.G.; CORDEIRO, J.A.; PINHO, J.R.R.; SITNIK, R.; ESTEVAO, I.F.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; RAHAL, P. HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n.12, p.1575-1580, 2006.

OLIVEIRA, V.C.; CAXITO, F.A.; GOMES, K.B.; CASTRO, A.M.; PARDINI, V.C.; FERREIRA, A.C. Frequency of the S65C mutation in the hemochromatosis gene in Brazil. **GMR, Genetics and Molecular Research**, v.8, n.3, p.794-798, 2009.

PAGANI, A.; SILVESTRI, L.; NAI, A.; CAMASCHELLA, C. Hemojuvelin N-terminal mutants reach the plasma membrane but do not activate the heparin response. **Haematologica**, v.93, n.10, p.1466-1472, 2008.

PAIVA, A.A.; RONDO, P.H.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.4, p.421-426, 2000.

PAPANIKOLAOU, G.; SAMUELS, M.E.; LUDWIG, E.H.; MACDONALD, M.L.E.; FRANCHINI, P.L.; DUBE, M.P.; ANDRES, L.; MACFARLANE, J.; SAKELLAROPOULOS, N.; POLITOU, M.; NEMETH, E.; THOMPSON, J.; RISLER, J.K.; ZABOROWSKA, C.; BABAKAUFF, R.; RADOMSKI, C.C.; PAPE, T.D.; DAVIDAS, O.; CHRISTAKIS, J.; BRISSOT, P.; LOCKITCH, G.; GANZ, T.; HAYDEN, M.R.; GOLDBERG, Y.P. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. **Nature Genetics**, v.36, n.1, p.77-82, 2004.

PAPANIKOLAOU, G.; TZILIANOS, M.; CHRISTAKIS, J.I.; BOGDANOS, D.; TSIMIRIKA, K.; MACFARLANE, J.; GOLDBERG, Y.P.; SAKELLAROPOULOS, N.; GANZ, T.; NEMETH, E. Hepcidin in iron overload disorders. **Blood**, v.105, n.10, p.4103-4105, 2005.

PARK, C.H.; VALORE, E.V.; WARING, A.J.; GANZ, T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.11, p.7806-7810, 2001.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.100, n.1, p.177-182, 2003.

PEREIRA, A.C.; MOTA, G.F.; KRIEGER, J.E. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. **Human Biology**, v.73, n.1, p.145-151, 2001.

PEREIRA, A.C.; CUOCO, M.A.R.; MOTA, G.F.; SILVA, F.F.; FREITAS, H.F.G.; BOCCHI, E.A.; Soler, J.M.P.; Mansur, A.J.; Krieger, J.E. Hemochromatosis gene variants in patients with cardiomyopathy. **American Journal of Cardiology**, v.88, n.4, p.388-391, 2001.

PIETRANGELO, A. Haemochromatosis. **Gut**, v.52, suppl.2, p.ii23-ii30, 2003.

PIETRANGELO, A.; CALEFFI, A.; HENRION, J.; FERRARA, F.; CORRADINI, E.; KULAKSIZ, H.; STREMMEL, W.; ANDREONE, P.; GARUTI, C. Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes. **Gastroenterology**, v.128, n.2, p.470-479, 2005.

PIETRANGELO, A. Molecular insights into the pathogenesis of hereditary haemochromatosis. **Gut**, v.55, n.4, p.564-568, 2006.

PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Gastroenterology**, v.139, n.2, p.393-408.e1-2, 2010.

PIGEON, C.; ILYIN, G.; COURSELAUD, B.; LEROYER, P.; TURLIN, B.; BRISSOT, P.; LOREAL, O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.11, p.7811-7819, 2001.

PIMENTA, J.R.; ZUCCHERATO, L.W.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.; SOARES, R.P.; MOURA-NETO, R.S.; ROCHA, J.; BYDLOWSKI, S.P.; PENA, S.D.J. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. **Human Heredity**, v.62, n.4, p.190-195, 2006.

PIPERNO, A. Classification and diagnosis of iron overload. **Haematologica**, v.83, n.5, p.447-455, 1998.

PORTO, G.; ROETTO, A.; DARAI, F.; PINTO, J.P.; ALMEIDA, S.; BACELAR, C.; NEMETH, E.; GANZ, T.; CAMASCHELLA, C. A Portuguese patient homozygous for the -25G>A mutation of the HAMP promoter shows evidence of steady-state transcription but fails to up-regulate hepcidin levels by iron. **Blood**, v.106, n.8, p.2922-2923, 2005.

POTEKHINA, E.S.; LAVROV, A.V.; SAMOKHODSKAYA, L.M.; EFIMENKO, A.Y.; BALATSKIY, A.V.; BAEV, A.A.; LITVINOVA, M.M.; NIKITINA, L.A.; SHIPULIN, G.A.; BOCHKOV, N.P.; TKACHUK, V.A.; BOCHKOV, V.N. Unique genetic profile of hereditary hemochromatosis in Russians: high frequency of C282Y mutation in population, but not in patients. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.35, n.2, p.182-188, 2005.

POZZATO, G.; ZORAT, F.; NASCIMBEN, F.; GREGORUTTI, M.; COMAR, C.; BARACETTI, S.; VATTA, S.; BEVILACQUA, E.; BELGRANO, A.; CROVELLA, S.; AMOROSO, A. Haemochromatosis gene mutations in a clustered Italian population: evidence of high prevalence in people of Celtic ancestry. **European Journal of Human Genetics**, v.9, n.6, p.445-451, 2001.

POWELL, L.W.; GEORGE, D.K.; MCDONNELL, S.M.; KOWDLEY, K.V. Diagnosis of hemochromatosis. **Annals of Internal Medicine**, v.129, n.11, p.925-931, 1998.

QIU, A.; JANSEN, M.; SAKARIS, A.; MIN, S.H.; CHATTOPADHYAY, S.; TSAI, E.; SANDOVAL, C.; ZHAO, R.; AKABAS, M.H.; GOLDMAN, I.D. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. **Cell**, v.127, n.5, p.917-928, 2006.

RADDATZ, D.; LEGLER, T.; LYNEN, R.; ADDICKS, N.; RAMADORI, G. HFE genotype and parameters of iron metabolism in German first-time blood donors - evidence for an increased transferrin saturation in C282Y heterozygotes. **Zeitschrift fuer Gastroenterologie**, v.41, n.11, p.1069-1076, 2003.

RICHARDS, C.S.; BALE, S.; BELLISSIMO, D.B.; DAS, S.; GRODY, W.W.; HEGDE, M.R.; LYON, E.; WARD, B.E. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: revisions 2007. **Genetics in Medicine**, v.10, n.4, p.294-300, 2008.

RIVERA, S.; LIU, L.; NEMETH, E.; GABAYAN, V.; SORENSEN, O.E.; GANZ, T. Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. **Blood**, v.105, n.4, p.1797-1802, 2005.

ROCHETTE, J.; LE GAC, G.; LASSOUED, K.; FEREC, C.; ROBSON, K.J.H. Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. **Human Genetics**, v.128, n.3, p.233-248, 2010.

ROETTO, A.; TOTARO, A.; PIPERNO, A.; PIGA, A.; LONGO, F.; GAROZZO, G.; CALI, A.; DE GOBBI, M.; GASPARINI, P.; CAMASCHELLA, C. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. **Blood**, v.97, n.9, p.2555-2560, 2001.

ROETTO, A.; PAPANIKOLAOU, G.; POLITOU, M.; ALBERTI, F.; GIRELLI, D.; CHRISTAKIS, J.; LOUKOPOULOS, D.; CAMASCHELLA, C. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. **Nature Genetics**, v.33, n.1, p.21-22, 2003.

ROETTO, A.; CAMASCHELLA, C. New insights into iron homeostasis through the study of non-HFE hereditary haemochromatosis. **Best Practice & Research, Clinical Haematology**, v.18, n.2, p.235-250, 2005.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical Chemistry**, v.44, n.8, pt.1, p.1748-1750, 1998.

SALVIONI, A.; MARIANI, R.; OBERKANINS, C.; MORITZ, A.; MAURI, V.; PELUCCHI, S.; RIVA, A.; AROSIO, C.; CERUTTI, P.; PIPERNO, A. Prevalence of C282Y and E168X HFE mutations in an Italian population of Northern European ancestry. **Haematologica**, v.88, n.3, p.250-255, 2003. SAMBROOCK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratorial manual**. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v.7, p.43-45. [Agarose gel electrophoresis].

SANTOS, P.C.J.L.; CANCELO, R.D.; TERADA, C.T.; ROSTELATO, S.; GONZALES, I.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; CHIATTONE, C.S.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. HFE gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.1, p.107-114, 2010.

SCOTET, V.; MEROUR, M.C.; MERCIER, A.Y.; CHANU, B.; LE FAOU, T.; RAGUENES, O.; LE GAC, G.; MURA, C.; NOUSBAUM, J.-B.; FEREC, C. Hereditary hemochromatosis: effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. **American Journal of Epidemiology**, v.158, n.2, p.129-134, 2003.

SHAYEGHI, M.; LATUNDE-DADA, G.O.; OAKHILL, J.S.; LAFTAH, A.H.; TAKEUCHI, K.; HALLIDAY, N.; KHAN, Y.; WARLEY, A.; MCCANN, F.E.; HIDER, R.C.; FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J.; VULPE, C.D.; SIMPSON, R.J.; MCKIE, A.T. Identification of an intestinal heme transporter. **Cell**, v.122, n.5, p.789-801, 2005.

SHIONO, Y.; IKEDA, R.; HAYASHI, H.; WAKUSAWA, S.; SANAE, F.; TAKIKAWA, T.; IMAIZUMI, Y.; YANO, M.; YOSHIOKA, K.; KAWANAKA, M.; YAMADA, G. C282Y and H63D mutations in the HFE gene have no effect on iron overload disorders in Japan. **Internal Medicine**, v.40, n.9, p.852-856, 2001.

SIMONSEN, K.; DISSING, J.; RUDBECK, L.; SCHWARTZ, M. Rapid and simple determination of hereditary haemochromatosis mutations by multiplex PCR-SSCP: detection of a new polymorphic mutation. **Annals of Human Genetics**, v.63, pt.3, p.193-197, 1999.

SIMON, M.; LE MIGNON, L.; FAUCHET, R.; YAOUANQ, J.; DAVID, V.; EDAN, G.; BOUREL, M. A study of 609 HLA haplotypes marking for the hemochromatosis gene: (1) mapping of the gene near the HLA-A locus and characters required to define a heterozygous population and (2) hypothesis concerning the underlying cause of hemochromatosis-HLA association. **American Journal of Human Genetics**, v.41, n.2, p.89-105, 1987.

SUSSMAN, N.L.; LEE, P.L.; DRIES, A.M.; SCHWARTZ, M.R.; BARTON, J.C. Multi-organ iron overload in an African-American man with ALAS2 R452S and SLC40A1 R561G. **Acta Haematologica**, v.120, n.3, p.168-173, 2008.

SWINKELS, D.W.; JANSSEN, M.C.; BERGMANS, J.; MARX, J.J. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. **Clinical Chemistry**, v.52, n.6, p.950-968, 2006.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TORRES, F.R.; SOUZA-NEIRAS, W.C.; D'ALMEIDA COUTO, A.A.; D'ALMEIDA COUTO, V.S.C.; CAVASINI, C.E.; ROSSIT, A.R.; MACHADO, R.L.D.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Frequency of the HFE C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. **GMR, Genetics and Molecular Research**, v.7, n.1, p.60-64, 2008.

TRUKSA, J.; PENG, H.; LEE, P.; BEUTLER, E. Different regulatory elements are required for response of hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9. **British Journal of Haematology**, v.139, n.1, p.138-147, 2007.

TSUI, W.M.; LAM, P.W.; LEE, K.C.; MA, K.F.; CHAN, Y.K.; WONG, M.W.; YIP, S.P.; WONG, C.S.; CHOW, A.S.; LO, S.T. The C282Y mutation of the HFE gene is not found in Chinese haemochromatotic patients: multicentre retrospective study. **Hong Kong Medical Journal**, v.6, n.2, p.153-158, 2000.

VARGENS, D.D.; ALMENDRA, L.; STRUCHINER, C.J.; SUAREZ-KURTZ, G. Distribution of the GNB3 825C>T polymorphism among Brazilians: impact of population structure. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.64, n.3, p.253-256, 2008.

VELLA, F. Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v.49, n.3, p.440-442, 1968.

VUJIC SPASIC, M.; KISS, J.; HERRMANN, T.; GALY, B.; MARTINACHE, S.; STOLTE, J.; GROENE, H.-J.; STREMMEL, W.; HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U. Hfe acts in hepatocytes to prevent hemochromatosis. **Cell Metabolism**, v.7, n.2, p.173-178, 2008.

WAALEN, J.; NORDESTGAARD, B.G.; BEUTLER, E. The penetrance of hereditary hemochromatosis. **Best Practice & Research, Clinical Haematology**, v.18, n.2, p.203-220, 2005.

WALLACE, D.F.; PEDERSEN, P.; DIXON, J.L.; STEPHENSON, P.; SEARLE, J.W.; POWELL, L.W.; SUBRAMANIAM, V.N. Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. **Blood**, v.100, n.2, p.692-694, 2002.

WALLACE, D.F.; SUMMERVILLE, L.; LUSBY, P.E.; SUBRAMANIAM, V.N. First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. **Gut**, v.54, n.7, p.980-986, 2005.

WALLACE, D.F.; SUBRAMANIAM, V.N. Non-HFE haemochromatosis. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.35, p.4690-4698, 2007.

WANG, J.; CIEPLAK, P.; KOLLMAN, P.A. How well does a retrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating the conformational energies of organic and biological molecules? **Journal of Computational Chemistry**, v.21, p.1049-1074, 2000.

WANG, R.H.; LI, C.; XU, X.; ZHENG, Y.; XIAO, C.; ZERFAS, P.; COOPERMAN, S.; ECKHAUS, M.; ROUAULT, T.; MISHRA, L.; DENG, C.-X. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. **Cell Metabolism**, v.2, n.6, p.399-409, 2005.

WEISS, G. Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.7, n.1, p.50-58, 2010. WORWOOD, M. Inherited iron loading: genetic testing in diagnosis and management. **Blood Reviews**, v.19, n.2, p.69-88, 2005.

WITTE, D.L.; CROSBY, W.H.; EDWARDS, C.Q.; FAIRBANKS, V.F.; MITROS, F.A. Practice guideline development task force of the College of American Pathologists: hereditary hemochromatosis. **Clinica Chimica Acta**, v.245, n.2, p.139-200, 1996.

WORWOOD, M. Genetics of haemochromatosis. **Bailliere's Clinical Haematology**, v.7, n.4, p.903-918, 1994.

ZAAHL, M.G.; MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; KOTZE, M.J.; VAN DER MERWE, S.; WARNICH, L.; ROBSON K.J. Analysis of genes implicated in iron regulation in individuals presenting with primary iron overload. **Human Genetics**, v.115, n.5, p.409-417, 2004.

ZHANG, A.S.; DAVIES, P.S.; CARLSON, H.L.; ENNS, C.A. Mechanisms of HFE-induced regulation of iron homeostasis: Insights from the W81A HFE mutation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.100, n.16, p.9500-9505, 2003.

ZHANG, A.S.; WEST Jr., AP.; WYMAN, A.E.; BJORKMAN, P.J.; ENNS, C.A. Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.40, p.33885-33894, 2005.

ZHANG, A.S.; YANG, F.; WANG, J.; TSUKAMOTO, H.; ENNS, C.A. Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenic protein-4-induced hepcidin expression. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.34, p.22580-22589, 2009.



## APÊNDICE 1

Principais resultados relacionados aos doadores de sangue:

*HFE* gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43:107-114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027482>

Principais resultados relacionados ao sequenciamento do gene *HFE* e à análise *in silico* da mutação p.V256I:

*HFE* gene mutations in patients with primary iron overload: is there a significant improvement in molecular diagnosis yield with *HFE* sequencing? *Blood Cells Mol Dis.* 2010. (Epub ahead of print). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843714>

Resultados relacionados ao sequenciamento dos genes *HAMP* e *HJV*:

Hemojuvelin and hepcidin genes sequencing in Brazilian patients with primary iron overload. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010. (Epub ahead of print). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039223>

Resultados relacionados ao relato de caso do paciente portador de hemocromatose juvenil:

*HJV* hemochromatosis, iron overload, and hypogonadism in a Brazilian man: treatment with phlebotomy and deferasirox. *Acta Haematologica.* 2010. (Epub ahead of print). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071928>

## APÊNDICE 2

Número do Paciente	Idade (anos)	Gênero	Etnia	Ferritina sérica (µg/L)	Saturação de transferrina (%)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Glicose (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Alteração genética
1	46	F	Negro	2794	95,4	76	85	68	0,6	HJV 10056S1 -36C>G (heterozigose)
2	46	M	Pardo	2133	101,9	44	43	89	0,7	HFE p.C282Y / p.C282Y
3	47	M	Branco	776	74,0	21	24	95	0,8	HFE p.H63D / WT e HAMP IVS3 +42G>A (heterozigose)
4	65	M	Branco	430	68,3	20	18	75	1,0	HFE p.C282Y / p.H63D
5	52	F	Branco	5236	103,7	107	259	175	0,7	SLC40A1 p.G204S / p.G204S
6	71	M	Branco	270	91,8	38	38	150	0,7	HFE p.C282Y / p.C282Y
7	47	F	Pardo	2403	99,7	44	63	84	0,6	HFE p.C282Y / WT
8	81	F	Pardo	1241	62,8	24	22	116	0,8	WT
9	43	M	Branco	2728	86,1	45	66	83	0,9	HFE p.C282Y / p.C282Y
10	42	F	Pardo	2338	101,5	31	37	81	0,5	HFE p.C282Y / WT
11	70	F	Branco	289	55,8	81	72	136	0,6	HFE p.H63D / WT
12	43	M	Branco	592	84,2	25	42	77	0,9	HFE p.C282Y / p.H63D
13	56	M	Pardo	804	69,9	19	52	100	0,8	WT
14	63	M	Branco	330	61,0	41	63	130	0,9	WT
15	70	F	Branco	575	58,4	33	46	94	0,9	HFE p.C282Y / p.C282Y
16	44	M	Branco	754	65,6	28	38	90	1,0	HFE p.H63D / p.V256I
17	65	M	Amarelo	678	72,3	24	33	117	0,8	HFE p.H63D / WT
18	71	F	Branco	525	54,0	28	28	81	0,8	WT
19	58	M	Branco	5606	99,6	119	110	353	0,8	HFE p.C282Y / p.C282Y
20	58	M	Amarelo	433	74,8	50	115	141	0,9	TFR2 p.A75V / WT

### Continuação

Número do Paciente	Idade (anos)	Gênero	Etnia	Ferritina sérica (µg/L)	Saturação de transferrina (%)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Glicose (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Alteração genética
21	37	M	Branco	545	63,5	25	49	94	1,0	HFE p.C282Y / p.H63D
22	43	M	Branco	829	62,4	19	50	96	0,7	HFE p.H63D / p.S65C
23	61	M	Branco	1409	88,7	22	24	127	0,7	HFE p.C282Y / p.C282Y
24	57	F	Pardo	347	59,9	29	33	89	1,1	HFE p.H63D / WT e HJV p.A310G / WT
25	56	M	Pardo	1155	63,0	49	105	95	0,9	HFE p.C282Y / WT
26	61	M	Pardo	356	68,0	44	56	99	1,0	HFE p.H63D / WT e HJV p.E302K / WT
27	35	M	Amarelo	766	82,6	22	39	106	1,0	WT
28	75	M	Branco	697	97,5	17	14	112	1,0	HFE p.H63D / p.S65C
29	56	F	Pardo	2000	89,0	53	84	169	0,9	HFE p.C282Y / p.C282Y
30	36	M	Pardo	1252	79,0	31	52	93	0,8	WT
31	71	F	Branco	676	89,3	43	68	103	0,7	HFE p.C282Y / p.C282Y
32	52	M	Branco	538	61,0	39	28	106	1,2	WT
33	56	M	Branco	441	66,0	47	52	113	1,4	HFE p.C282Y / p.H63D e TFR2 p.R752H / WT
34	61	F	Branco	506	82,0	21	24	163	1,0	WT
35	22	M	Branco	3500	99,0	65	48	105	1,0	HFE p.H63D / WT e HJV p.G320V / p.G320V
36	55	M	Negro	845	65,0	53	61	95	1,0	HFE p.C282Y / WT
37	59	M	Negro	928	82,0	24	41	102	1,2	WT
38	52	M	Branco	3352	80,0	97	88	115	0,9	HFE p.C282Y / p.C282Y
39	54	F	Branco	2038	87,0	39	35	88	0,7	HFE p.C282Y / p.C282Y

## Continuação

Número do Paciente	Idade (anos)	Gênero	Etnia	Ferritina sérica (µg/L)	Saturação de transferrina (%)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Glicose (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Alteração genética
40	42	M	Branco	862	85,0	79	161	103	1,1	HFE p.H63D / WT
41	50	M	Branco	1545	72,0	43	47	94	0,9	HFE p.H63D / WT
42	59	M	Pardo	1305	63,0	28	32	99	0,9	HFE p.H63D / WT e SLC40A1 p.R561G / p.R561G
43	47	M	Branco	848	96,0	155	280	95	0,9	HFE p.H63D / WT
44	50	M	Branco	1573	73,0	40	44	89	1,0	WT
45	65	M	Branco	1623	82,0	14	13	98	0,9	HFE p.H63D / WT e HJV p.E302K / WT
46	63	M	Branco	1310	69,6	18	14	98	1,4	HAMP p.R59G / WT
47	56	M	Branco	1051	72,5	26	28	96	0,9	HFE p.C282Y / p.H63D e TFR2 p.R752H / WT
48	59	M	Branco	1662	72,0	26	50	92	1,1	HFE p.H63D / p.H63D
49	56	M	Branco	1500	66,4	33	35	112	1,1	HFE p.H63D / p.H63D e TFR2 p.R752H / WT
50	61	M	Branco	1422	65,0	53	55	96	1,0	HFE p.C282Y / p.H63D
51	23	M	Branco	837	72,6	25	32	83	0,9	HFE p.C282Y / p.C282Y

As dosagens das variáveis acima foram realizadas no momento do diagnóstico, antes de iniciar o tratamento.

F: feminino; M: masculino. AST: Aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

WT: *wild-type*, genótipo selvagem.

O polimorfismo sinônimo p.A617A no gene TFR2 e os polimorfismos rs13008848, rs11568351, rs11568345, rs11568344 e rs2304704 no gene SLC40A1 não foram inseridos acima.

## ANEXO 1

### APROVAÇÃO NOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 56 /2008

São Paulo, 01 de julho de 2008.

Ilmo(a). Sr(a).  
Elvira Maria Guerra Shinohara  
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 30 de junho de 2008, **APROVOU** o projeto "Pesquisa de mutações em genes relacionados a Hemocromatose hereditária (HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1) em pacientes portadores de sobrecarga de ferro" (Protocolo CEP nº 477) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que o parecer do CEP da Santa Casa de S. Paulo deverá ser anexado aos autos deste processo.

Lembramos, ainda, que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Mariza Landgraf  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
FCF/USP



**IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**

Rua Santa Isabel, 305 - 4º andar Santa Cecília CEP: 01221-010 São Paulo – SP  
PABX: 21767000 Ramal: 8061 – Telefax: 33370188 E-mail: [eticamed@santacasasp.org.br](mailto:eticamed@santacasasp.org.br)

São Paulo, 16 de outubro de 2008.

**Projeto nº 367/08**  
Informe este número para  
identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a) Sr.(a)

**Dr. Rodolfo Delfini Caçado**

Serviço de Hematologia e Hemoterapia

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em reunião extraordinária, dia **15/10/2008** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **“Pesquisa de mutações em genes relacionados á Hemocromatose Hereditária (HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1) em pacientes portadores de sobrecarga de ferro”**, emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado (inclusive TCLE);**  
 **Com pendências** há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias, (enviar as alterações em **duas cópias**);  
 **Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);  
 **Não aprovado:** e  
 **Aprovado (inclusive TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)**, e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias.  
**Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

**Prof. Dr. Nelson Keiske Ono**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – ISCMSP

São Paulo, 15 de Abril de 2010

**Ilmo.(a) Dr. Isolmar Tadeu Schettert**

**Projeto:** Pesquisa de mutações em genes relacionados à Hemocromatose Hereditária (HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1) em pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária.

A Diretoria Clínica do Novo Atibaia Hospital, no dia 14 de Abril de 2010, seguindo suas atribuições no tocante às pesquisas clínicas e laboratoriais realizadas nesta instituição, emitiu parecer do projeto Pesquisa de mutações em genes relacionados à Hemocromatose Hereditária (HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1) em pacientes portadores de sobrecarga de ferro primária, após avaliação e revisão deste, assim como de seus anexos e do termo de livre consentimento esclarecido fornecido aos pacientes desta instituição.

Observações: Prévias aprovações nos CEPs da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e da Santa Casa de São Paulo.

**PARECER:** Aprovado, inclusive TCLE.



Wagner Pinaffi

Diretoria Clínica / Pesquisa e Ensino- Novo Atibaia Hospital



Olavo Malheiros Jr.

Diretoria Clínica - Novo Atibaia Hospital

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Nome do Paciente: .....

Documento de Identidade N° :.....Sexo: ( )M ( )F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....N°:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

#### II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1- Título do Protocolo de Pesquisa: **“Pesquisa de mutações nos genes relacionados à HH (HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1) em pacientes com sobrecarga de ferro primária”**

2- Pesquisadora:

Profª Drª Elvira Maria Guerra Shinohara

Cargo/Função: Docente Inscrição Conselho Regional de Farmácia –SP N°:9.542

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas –USP.

3- Avaliação do risco da pesquisa: O risco é baixo e decorrente da punção venosa.

4- Duração da Pesquisa: 2 anos e seis meses.

Meu nome é Elvira, sou Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Estou desenvolvendo um estudo com a finalidade de saber quais alterações genéticas (alterações no DNA) podem ser responsáveis pelas quantidades aumentadas de ferro no organismo de algumas pessoas, e necessito de sua participação. Neste estudo serão formados dois grupos. Um grupo será formado por pessoas com valores adequados de ferro, e outro grupo será formado por indivíduos com valores aumentados de ferro no sangue (com sobrecarga de ferro). O excesso de ferro no organismo pode ser prejudicial à saúde. O acúmulo do ferro nos tecidos ocorre ao longo dos anos, e pode ocasionar lesões nos órgãos (fígado, pâncreas, coração, etc. Caso seja diagnosticado excesso de ferro no teu sangue (observado nos resultados dos exames laboratoriais), você será avisado e

acompanhado no ambulatório de Hematologia da Santa Casa de São Paulo (Dr. Rodolfo D. Cançado).

Caso aceite participar do estudo, o senhor (a) fará parte de um dos dois grupos citados anteriormente, quando serão colhidos 20 mL de sangue e será aplicado um questionário. As respostas serão anotadas por mim e será garantido o anonimato dos participantes, bem como o sigilo dos dados, os quais serão utilizados exclusivamente para este estudo. Você receberá todos os resultados referentes aos exames laboratoriais sem qualquer custo. Caso seja de seu interesse, nós poderemos disponibilizar os resultados das determinações genéticas. O senhor (a) tem a liberdade de negar-se a participar do estudo, sem sofrer qualquer dano ou prejuízo, por parte da pesquisadora ou do hospital.

Desde já, coloco-me à disposição para esclarecer qualquer dúvida ou problema e meu telefone para contato é 3091-3785 (horário comercial).

*Declaro que, após convenientemente esclarecido pela pesquisadora e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente estudo.*

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa\*

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\* Caso o participante tenha limitação para a leitura do documento, este será lido por um familiar ou pela pesquisadora.

## ANEXO 3

### FORMULÁRIO DE ENTREVISTA

Nome:

Telefone:

Data de nascimento:

Sexo: (0) feminino

Etnia: (0) branca

(3) amarela/oriental

Estado civil: (0) solteiro

(3) união estável

Nacionalidade:

Procedência:

Descendência Paterna:

Ocupação: (0) desempregado

Escolaridade: (0)

(2) Prim grau completo

(4) Seg. grau completo

(6) universitário completo

Idade (anos):

(1) masculino

(1) negra

(2) parda

(1) casado

(2) viúvo

Naturalidade:

Materna:

(1) outra:

(1) Prim. grau incompleto

(3) Seg. grau incompleto

(5) universitário incompleto

#### Sinais e Sintomas – Diagnóstico

PALIDEZ	FRAQUEZA	ICTERÍCIA	SUDORESE	FEBRE
PALPITAÇÃO	DISPNÉIA	ORTOPNÉIA	EDEMA MMII	ÚLCERA
ANOREXIA	PERDA DE PESO	CEFALÉIA	TONTURA	IRRITABILIDADE
SONOLÊNCIA	DOR ABDOMINAL	NÁUSEAS	VÔMITOS	EPIGASTRALGIA
CABELOS E UNHAS QUEBRADIÇOS	EMPACHAMENTO PÓS-PRANDIAL	OBSTIPAÇÃO DIARRÉIA	HEMATÊMESE MELENA	ENTERORAGIA
LINFADENOMEGALIA	HEPATOMEGALIA	ESPLENOMEGALIA	CARDIOMEGALIA	ICC
CÁLCULO BILIAR	COLECISTECTOMIA	ESPLENECTOMIA		
OUTROS:				

#### Histórico Transfusional

Já recebeu transfusão sanguínea? (0) Não (1) Sim

Número de unidades: (0) <10 (1) 10 a 20 (2) >20

#### Histórico Obstétrico-Ginecológico

Ciclo menstrual: (0) Regular

(1) Irregular

Duração da menstruação: (0) 2-3 dias

(1) 4 a 6 dias

(2) 7-10 dias

Intervalo (dias): (0) <27 dias

(1) 27-30 dias

(2) >30 dias

N de dias mais intensos: (0) nenhum

(1) um

(2) dois

Presença de coágulos: (0) não

(1) sim

Menopausa? (0) não

(1) sim

Desde

que idade?

Método anticoncepcional: (0) natural (1) Oral (2) Laqueadura (3) DIU (4) Camisinha (5) outro:

N de gestações: (0) nenhuma (1) uma (2) duas (3) três (4) quatro (5) cinco ou mais

Tipo de parto: (0) Normal (1) Cesárea

N de abortos: (0) nenhum (1) um (2) dois (3) três (4) quatro (5) cinco ou mais

Histórico de Doação

Data da doação: N da doação:

Característica do doador: (0) Reposição (1) Espontânea (2) Personalizada (3) Autóloga

N de doações realizadas anteriormente: (0) nenhuma (1) uma (2) duas (3) três (4) quatro ou mais

N de doações nos últimos 12 meses: (0) nenhuma (1) uma (2) duas (3) três (4) quatro ou mais

Data da última doação:

Uso de medicamentos

Medicamento contendo ferro: (0) Não (1) Sim, <6 meses (2) Sim, de 6-12 meses (3) Sim, >1ano

Via de aplicação: (0) Oral (1) Intramuscular (2) Intravenosa

Uso de outros medicamentos: (0) Não (1) Sim Quais:

Consumo de tóxicos

Fumo: (0) Não (1) Sim

N de cigarros por dia: (0) 1-5 (1) 6-10 (2) 11-15 (3) 15-20 (4) >21

Bebidas alcoólicas: (0) Não (1) Ocasionalmente (2) Frequentemente

Outras drogas: (0) Não (1) Sim Qual:

Antecedentes familiares

Pai com alguma doença: (0) Não (1) Sim Qual:

Mãe com alguma doença: (0) Não (1) Sim Qual:

N de irmãos: Sexo feminino: Sexo masculino:

Algun deles com doença:

Observações:

Data:

Assinatura do Examinador:

## ANEXO 4

### INFORMAÇÕES AOS MEMBROS DA BANCA



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

#### **Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. Não serão permitidas correções na dissertação/tese. Assim, havendo extrema necessidade, poderá ser incluída uma errata.

4. A sessão de defesa será aberta ao público.

5. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

5.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

6. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

**Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco**

Presidente da CPG/FCF/USP