

DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA HEMOCROMATOSE: UM ESTUDO DE CASOS

MOLECULAR DIAGNOSTICS FOR HEMOCHROMATOSIS: A CASE STUDY

ANALINA FURTADO VALADÃO^{1*}, THALES DE ANDRADE MARTINS², TALES FERNANDO DA SILVA³, CARLA DE ARÊDES BRUM⁴, ERIC BASSETTI SOARES⁵

1. Farmacêutica. Doutora pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/ IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil; 2. Farmacêutico. Mestrando pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais; 3. Acadêmico do curso de Farmácia do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais - Unileste, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil; 4. Farmacêutica. Doutora pela Universidade Federal de Minas Gerais. Docente do curso de Farmácia do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais - Unileste, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil; 5. Médico. Doutor pela Universidade Federal de Minas Gerais. Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/ IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil.

* Rua Uruguai, 86, Cariru, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. CEP: 35160-143. analina@famevaco.br

Recebido em 02/04/2014. Aceito para publicação em 12/04/2014

RESUMO

A Hemocromatose Hereditária é uma doença autossômica recessiva caracterizada por um aumento progressivo nos estoques corpóreos de ferro, o que ocasiona sua deposição principalmente nas células parenquimatosas do coração, hipófise, gônadas, pâncreas e fígado. O presente estudo foi destinado a verificar a relação entre sobrecarga de ferro e as mutações com maior prevalência no gene HFE. Foram incluídos pacientes com evidências bioquímicas de sobrecarga de ferro no organismo. Foram pesquisados os polimorfismos C282Y, H63D e S65C no gene HFE, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em DNAs extraídos de leucócitos. Este estudo contou com a participação de 12 pacientes com sobrecarga de ferro. A análise dos resultados revelou que dez (83,3%) dos 12 pacientes com sobrecarga de ferro apresentaram pelo menos uma das mutações analisadas no gene HFE. Entre estes, dois foram C282Y/WT, oito S65C/WT, um H63D/WT e um H63D/H63D. Nenhum paciente apresentou o genótipo C282Y/C282Y ou S65C/ S65C e apenas um apresentou o genótipo H63D/H63D. Dois (16,7%) não apresentaram nenhuma das três mutações investigadas e dois apresentaram associação de mutações, sendo um C282Y/S65C e um C282Y/H63D. Os demais pacientes não apresentaram as alterações genéticas investigadas. Os resultados obtidos foram de grande importância para o aconselhamento de mudanças de hábitos alimentares e na conduta clínica e terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE: Hemocromatose, sobrecarga de ferro, técnicas de genotipagem, diagnóstico.

ABSTRACT

The Hereditary Hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder characterized by a progressive increase in body stores of iron, which causes deposition mainly in the parenchymal cells of the heart, pituitary, gonads, pancreas and liver. The present study was designed to investigate the relationship

between iron overload and mutations with higher prevalence of the HFE gene. Were included symptomatic patients with biochemical evidence of iron overload in the body. Were investigated polymorphisms C282Y, S65C and H63D in the HFE gene, using the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) on DNA extracted from leucocytes. This study involved the participation of 12 patients with iron overload. The results showed that ten (83.3%) of 12 patients with iron overload had at least one of the analyzed mutations in the HFE gene. Among these, two were C282Y/WT eight S65C/WT a H63D/WT and H63D/H63D. No patient had genotype C282Y/C282Y or S65C / S65C and only one had genotype H63D/H63D. Two (16.7%) had none of the three mutations investigated and two were associated mutations, being a C282Y/S65C and C282Y/H63D. The remaining patients did not have the genetic alterations investigated. The results were of great importance to physicians in counseling and dietary changes in clinical management and therapy.

KEYWORDS: Hemochromatosis. Iron Overload. Genotyping Techniques. Diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

O ferro, elemento essencial para múltiplos processos metabólicos, atua como cofator para enzimas importantes no transporte de oxigênio, na síntese de DNA, na produção de energia oxidativa, na respiração mitocondrial e na inativação de radicais livres. A concentração média de ferro no organismo de um indivíduo adulto é de 4 a 5 g^{1,2}.

Um aumento progressivo nos estoques corpóreos de ferro ocasiona sua deposição principalmente nas células parenquimatosas do coração, hipófise, gônadas, pâncreas e fígado. Quando não tratado surgem complicações, como insuficiência cardíaca, disfunção hipofisária e gonadal, diabetes mellitus, cirrose hepática, carcinoma hepa-

tocelular entre outras³.

O depósito crônico de ferro geralmente está associado à hemocromatose hereditária (HH), ao consumo excessivo de ferro através da dieta e a frequentes transfusões sanguíneas, requeridas para o tratamento de alguns tipos de anemias⁴.

A hemocromatose hereditária é uma doença autosômica recessiva comum em caucasóides do Norte da Europa, acometendo um em cada duzentos a trezentos indivíduos. A expressão da doença é mais grave em homens do que em mulheres, em que a ocorrência de sintomas mais brandos é particularmente atribuída aos efeitos protetores da perda do sangue menstrual e à gravidez⁵.

O gene da hemocromatose hereditária (HFE) está localizado no braço curto do cromossomo 6 lócus 6p 21.3, apresenta 7 éxons e está associado ao complexo de histocompatibilidade (HLA-A)⁶. Três mutações no gene HFE são frequentemente relatados, C282Y, H63D e S65C. A mutação C282Y, no éxon 4, caracteriza-se por apresentar transição de G para A no nucleotídeo 845 do gene, substituindo uma tirosina por uma cisteína no aminoácido 282 da proteína, com frequência alélica de 5% a 10% na população caucasiana. A mutação H63D é originada pela transversão de C para G no nucleotídeo 187, determinando a substituição de ácido aspártico por histidina no aminoácido 63, frequência alélica de 16% na população europeia e com expressão fenotípica branda, já a mutação S65C consiste na troca de serina por cisteína na posição 65 da proteína HFE e está presente em 0,5 a 3% dos caucasianos^{7,8,9,10}.

A frequência da mutação C282Y do gene HFE é três a oito vezes menor em indivíduos brasileiros do que a observada em caucasóides do norte da Europa e, provavelmente, essa diferença deve-se à diversidade étnica da população brasileira. Já a frequência alélica da mutação H63D e S65C parecem ser semelhantes entre essas duas populações^{11,12}.

Segundo Bueno *et al.* (2006)¹³, as mutações C282Y e H63D estão presentes em 2/3 dos pacientes brasileiros com hemocromatose hereditária, indicando, provavelmente, que outras mutações no gene HFE ou que outros genes possam estar envolvidos na regulação metabólica do ferro.

De fato outras mutações já foram descritas no gene HFE (V53M, V59M, H63H, Q127H, Q283P, P168X, E168Q, E168X e W169X), entretanto faltam dados que comprovem a relação destas com a HH^{14,15, 16,17}.

A concentração de ferro em um indivíduo saudável é controlada por várias proteínas participantes de sua homeostasia e o estudo de mutações nestes genes levou a classificação da HH em tipos 1, 2A, 2B, 3 e 4, quando a sobrecarga de ferro está associada aos genes HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1, respectivamente^{17,18,19,20,21}. A pesquisa das mutações do gene HFE, sobretudo das mu-

tações C282Y, H63D e S65C, são as mais indicadas para indivíduos com valores persistentemente elevados de saturação da transferrina e/ou da ferritina, para indivíduos com aumento do ferro tecidual e para parentes de primeiro grau de indivíduos com diagnóstico de HH²².

Alguns autores acreditam que as mutações H63D e S65C, isoladamente, não representam grandes riscos de sobrecarga de ferro, mesmo na condição de homozigose; entretanto, quando associadas à mutação C282Y ou a condições patológicas como talassemia beta ou alfa, e esferocitose hereditária, podem desempenhar papel importante na predisposição ao acúmulo patológico de ferro no organismo².

O crescente número de publicações estrangeiras demonstrando a importância de investigações genéticas, associado à observação do pequeno número de publicações brasileiras, motivou o desenvolvimento do presente trabalho destinado a verificar a relação entre as mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em pacientes brasileiros com suspeita de sobrecarga de ferro no organismo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Pacientes com evidências laboratoriais de sobrecarga de ferro foram encaminhados por médicos hematologistas previamente contatados. Para a coleta do material biológico os pacientes foram esclarecidos sobre os propósitos do estudo e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi realizada a coleta de sangue periférico em tubos contendo EDTA 0,1%. O sangue coletado (5 mL) foi mantido a 4°C por no máximo 24h entre a coleta e a extração do DNA. Cada amostra foi identificada por um código. Durante toda a fase experimental de geração dos resultados os dados pessoais dos pacientes foram mantidos em sigilo.

Foram analisadas amostras de sangue de 12 pacientes maiores de 18 anos, ambos os sexos, Brasileiros residentes no município de Ipatinga, Minas Gerais. O diagnóstico da sobrecarga de ferro teve como base a concentração de ferritina sérica elevada (> 500 ng/mL) a partir de exames laboratoriais realizados pelos pacientes, no máximo um mês antes da análise molecular. Todos os pacientes relataram ter realizado dosagem de ferritina pela primeira em toda a vida.

Este estudo foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (CEP/Unileste MG), Protocolo nº 44.258.11 Ofício 13/11, estando o estudo, portanto, de acordo com a Declaração de Helsinki revisada em 2008.

Diagnóstico das mutações C282Y, H63D e S65C

DNA genômico humano foi extraído de leucócitos de sangue periférico pelo método “*Salting Out*”²³. Mutações HFE foram detectadas por análise de restrição en-

zimática de DNA amplificado pela reação em cadeia da polimerase. Para detectar a mutação C282Y, foram utilizados os iniciadores direto⁶ 5'TGGCAAGGGTAAACAGATCC 3' e reverso 5'CTCAGGCACTCCTCTCAACC 3', gerando um fragmento de 343pb. A mistura da reação (20 µL total), consistiu de 20-30 ng de DNA alvo, tampão (1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,5), 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de *Taq*-DNA polimerase.

O programa de amplificação consistiu de: desnaturação inicial 96°C por 2 min., seguido de 35 ciclos: 96°C por 30 seg.; 56°C para 1 min, e 72°C por 1 min. Todos os experimentos foram acrescentados de um controle negativo, sem adição de DNA. Os produtos de amplificação foram detectados através de eletroforese em gel de acrilamida 6% e corados com nitrato de prata

Fragmentos amplificados de 343 pares de base (pb) foram submetidos à digestão enzimática com Rsa I, o tipo selvagem resultou em fragmentos de 203 e 140 pb, enquanto que o tipo mutante fragmentos de 203, 111 e 29 pb.

Para detectar as mutações H63D e S65C, o iniciador direto⁶ 5'ACATGGTTAAGGCCTGTTGC3' e o reverso 5'GCCACATCTGGCTTGGAAATT foram utilizados produzindo um fragmento de 223pb. As condições da reação de amplificação foram as mesmas citadas para a mutação C282Y. Para a detecção de H63D, o fragmento de 223 pb foi digerido com Dpn II com o tipo selvagem, resultando em fragmentos de digestão de 118 e 105 pb, enquanto que a digestão mutante mostrou apenas o fragmento de 223 pb. Para a mutação S65C, a enzima Hinf I foi utilizada e a digestão do tipo selvagem resultou em fragmentos de 112, 69 e 42 pb, e do tipo mutante em fragmentos de 181 e 42 pb.

A visualização dos fragmentos característicos para cada genótipo foi obtida através da eletroforese do produto digerido em gel de acrilamida 6%, corado por nitrato de prata. Os perfis obtidos foram comparados com os perfis descritos na literatura para cada polimorfismo analisado.

As variáveis gênero, idade e genótipos C282Y, H63D e S65C foram comparadas usando o teste Qui-quadrado software Epiinfo 3.5.2. As diferenças não foram significativas apresentando valores de $p > 0.05$.

3. RESULTADOS

Nove (75%) dos pacientes são homens e três (25%) são mulheres. A média de idade foi de 53,4 anos (variação: 32-63 anos). Todos os pacientes apresentavam concentração de ferritina sérica elevada em relação aos parâmetros considerados normais. Nove (75%) dos pacientes se autodeclararam brancos e três (25%), pardos. Nenhum dos pacientes relatou transfusão de sangue recente.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que

dez (83,3%) dos 12 pacientes com sobrecarga de ferro apresentaram pelo menos uma das mutações analisadas no gene HFE (colunas destacadas em cinza). Entre estes, dois (2) são C282Y/WT, oito (8) S65C/WT, um (1) H63D/WT e um (1) H63D/H63D. Nenhum paciente estudado foi encontrado com genótipo C282Y/C282Y ou S65C/ S65C e apenas um (1) apresentou o genótipo H63D/H63D. Dois (16,7%) não apresentaram nenhuma das três mutações investigadas no gene HFE e dois pacientes apresentaram associação de mutações, sendo um (1) C282Y/S65C e um (1) C282Y/H63D.

Tabela 1. Distribuição dos 12 pacientes segundo a idade, gênero, valores séricos de ferritina e genótipos estudados.

Pacientes	Idade	Gênero	Cor da pele	Ferritina (mg/mL)	C282Y (G>A)	H63D (C>G)	S65C (A>T)
1	59	M	Pardo	916,1	GG	CC	AT*
2	32	M	Branco	560,0	GA*	CC	AT*
3	55	M	Pardo	550,0	GG	CC	AA
4	55	M	Branco	1768,0	GG	CC	AT*
5	59	M	Pardo	632,1	GA*	CG*	AA
6	55	M	Branco	1147,0	GG	CC	AA
7	63	F	Branco	840,7	GG	GG**	AA
8	51	F	Branco	628,0	GG	CC	AT*
9	62	M	Branco	642,0	GG	CC	AT*
10	44	M	Branco	514,0	GG	CC	AT*
11	59	F	Branco	714,0	GG	CC	AT*
12	47	M	Branco	520,0	GG	CC	AT*

* Mutação em heterozigose; ** Mutação em homozigose

A frequência alélica para as mutações C282Y, H63D e S65C está mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Frequência alélica das mutações C282Y, H63D e S65C

C282Y (G>A)		H63D (C>G)		S65C (A>T)	
G	A	C	G	A	T
0,920	0,080	0,875	0,125	0,667	0,33
92%	8%	87,5%	12,5%	66,7%	33,3%

4. DISCUSSÃO

De acordo com a literatura tem sido definida como sobrecarga de ferro a presença de pelo menos duas

constatações de saturação da transferrina iguais ou superiores a 50% em mulheres e 60% em homens; e/ou concentrações séricas de ferritina >200 µg/L em mulheres e >300 µg/L em homens^{22, 24, 25}. Neste estudo a média encontrada para ferritina nos pacientes avaliados foi de 786 mg/mL (514,0-1147,0), portanto todos os pacientes apresentavam 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 homeostase do ferro no organismo^{26,27}. Sobrecarga de ferro secundária é observada em doenças congênitas ou adquiridas que cursam com anemia hemolítica e/ou eritropoese ineficaz e requerem múltiplas transfusões de hemácias, como ocorre em pacientes com talassemia beta maior, anemia falciforme e síndrome mielodisplásica; em doenças hematológicas (anemia sideroblástica, anemia de Fanconi) e doenças hepáticas (hepatite C, esteatopatia não-alcoólica, uso abusivo de bebidas alcoólicas)²⁸.

A presença de mutação no gene HFE indica a existência de alteração genética relacionada à HH e maior predisposição ao desenvolvimento do fenótipo da doença, mas não é suficiente para o diagnóstico de HH, pois a penetrância do alelo mutante e a expressão fenotípica da doença são relativamente baixas, tornando difícil prever quem desenvolverá ou não o quadro clínico da doença^{24,29,30}.

Sempre que possível deve-se realizar a pesquisa de mutações em genes envolvidos na homeostase do ferro sendo as mutações presentes no gene HFE as mais estudadas⁴.

O diagnóstico de hemocromatose hereditária Tipo 1 é realizado com base na identificação de mutações no gene HFE e apesar de já terem sido descritas 37 variantes alélicas do gene as mutações C282Y, H63D e S65C são as mais associadas à elevação persistente dos valores da saturação da transferrina e/ou da ferritina sérica¹⁷.

A maioria dos pacientes com diagnóstico de HH tipo 1 é homocigoto para a mutação C282Y no gene HFE (C282Y/C282Y). Segundo vários autores, os pacientes com os demais genótipos (C282Y/H63D, H63D/H63D, H63D/WT, C282Y/WT, S65C/S65C, S65C/WT) são considerados portadores de HH desde que seja constatada a presença de sobrecarga de ferro^{17,24,30,31,32}.

De acordo com esta classificação e com base nos resultados da Tabela 1, todos os pacientes deste estudo que apresentaram pelo menos uma mutação nos genes avaliados (50%), devem ser classificados como portadores de HH Tipo 1. Importante ressaltar que a classificação citada acima não prevê os casos de associação de mutações como as encontradas neste estudo C282Y/S65C e C282Y/H63D, assim como outras possíveis.

Sem dúvida a mutação C282Y é a mais associada às características clínicas e possui diferentes frequências em variadas populações; frequência de 100% em paci-

entes australianos com hemocromatose e de 64% em italianos^{13,33}. No Canadá, Estados Unidos, Inglaterra, França, Alemanha, Portugal entre outros países de origem caucasóide, cerca de 90% a 95% dos pacientes com hemocromatose hereditária apresentam homocigose para a mutação C282Y; porém esta relação sofre variações nas populações³⁴.

No Brasil, os estudos de prevalência da hemocromatose são ainda muito escassos, porém é possível encontrar um alelo mutante em 4% a 7% da população geral da região Nordeste do país. Por ser um país geograficamente grande e devido à grande mistura étnica de negróides, caucasóides e ameríndios em todas as regiões do País, nota-se a ocorrência de diferentes frequências regionais da mutação C282Y³⁴.

Estudos como o de Agostinho e colaboradores³⁵ com 227 indivíduos doadores de sangue, assintomáticos para hemocromatose e o de Santos *et al.* (2009)² com indivíduos assintomáticos do estado de São Paulo mostraram valores de 1,2% e de 1,4% do alelo 282Y.

Segundo Carella *et al.* (1999)³⁶ e Beutler³⁷, a presença do alelo 63D quando da ausência de mutação HFE 282Y está associada ao menor risco de HH. Porém, quando a mutação HFE 63D é herdada em heterocigose com a mutação 282Y (282Y/63D), o indivíduo apresenta risco elevado de desenvolver HH, sendo muitas vezes comparado ao risco de um indivíduo portador de 282YY. Esta associação foi identificada em nosso estudo para um paciente com elevada concentração de ferritina.

Segundo Bueno *et al.* (2006)¹³ apenas a mutação H63D não possui uma forte associação com a sobrecarga do ferro, embora a heterocigose seja responsável por 6% dos casos em europeus e 4% americanos. Em casos raros 63DD em homocigose está associada à hemocromatose, mas quando presente está associada com comorbidades, por exemplo, alcoolismo, ou síndrome metabólica³⁸. Nossos resultados mostram um paciente com 63DD em homocigose.

Em relação ao alelo 63D em dois estudos realizados com doadores de sangue Brasileiros, foram encontradas frequências do alelo 63D de 10,8% e 13,6%^{13,16} e estão de acordo com os 12,5% encontrados neste estudo.

A mutação S65C foi descrita por Mura *et al.* (2006)³⁹ ainda não foi totalmente investigada e existe pouca informação sobre sua frequência genética³³. No estudo de Bueno *et al.* (2006)¹³ com doadores de sangue em São Paulo, Brasil, encontraram uma frequência genética da mutação S65C similar a C282Y.

Enquanto os doze (12) pacientes com sobrecarga de ferro analisados neste estudo mostraram uma frequência alélica de 0,125 (12,5%) para o alelo 65C outros estudos brasileiros mostraram frequências alélicas de 0,010 em 148 indivíduos saudáveis¹³; 0,0087 em 173 indivíduos saudáveis⁴⁰; 0,008 em 633 pacientes com suspeita clínica de hemocromatose⁴⁰, e zero em 35 pacientes com sobre-

carga de ferro²⁶.

Bittencourt *et al.* (2002)⁶ analisaram o gene HFE em 15 pacientes com HH e encontraram 53% de homozigotos C282Y e 7% de indivíduos heterozigotos. Nenhum deles tinha o C282Y/H63D heterozigoto composto. Nossos resultados mostraram que não havia indivíduos homozigotos para C282Y e 16,6% de indivíduos eram heterozigotos. Esses dados são diferentes, talvez em função de ambos terem estudado um pequeno número de pacientes (15 e 12, respectivamente).

Outro resultado inesperado foi a ausência do genótipo C282Y/C285C entre os pacientes avaliados. Este genótipo é considerado fortemente associado à sobrecarga de ferro. Nosso estudo tem o inconveniente de ter envolvido um pequeno número de indivíduos, mas reforça a necessidade de novos estudos com populações maiores do Brasil e de diferentes regiões brasileiras.

Os dados aqui apresentados são de grande importância, pois é inovador em avaliar a mutação S65C em indivíduos sob suspeita de HH no Brasil. Portanto, os dados aqui apresentados nos permitem considerar que esta mutação deve ser recomendada em casos de história familiar e aconselhamento genético envolvendo indivíduos heterozigotos e homozigotos para a mutação S65C em casamentos consanguíneos. Este estudo deve contribuir para se estabelecer um perfil genético para HH na população brasileira e, conseqüentemente, ajudar na seleção de exames indicados para o rastreamento e diagnóstico da doença.

A ausência de mutações em alguns pacientes com sobrecarga de ferro evidenciada neste estudo reforça a necessidade de pesquisa de mutações em outros genes diretamente envolvidos com o metabolismo do ferro. Alguns estudos realizados no Brasil relatam que alguns pacientes com sobrecarga de ferro primária não são portadores da HH tipo 1 (associada ao gene HFE). Portanto, é de suma importância a identificação das características genéticas dessa população, uma vez que outras mutações nos genes HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1 podem estar associadas à fisiopatologia da doença, podendo haver interações entre os genes alterados, de forma que possa auxiliar no entendimento da fisiopatologia da HH em pacientes brasileiros.

Vale ressaltar que a ferritina sérica pode estar elevada sem nenhuma relação com o aumento do depósito de ferro, e, nesse caso, a saturação de transferrina costuma estar normal; isso pode ser observado quando há doença inflamatória ou infecciosa, necrose hepatocelular, hepatites virais, alcoolismo, esteatoepatite não alcoólica, síndrome metabólica e neoplasia^{38,39}.

É importante lembrar que a síndrome metabólica é uma das mais frequentes causas atuais de hiperferritinemia e caracteriza-se por obesidade, hipertensão arterial, diabetes não insulino-dependente, hiperlipidemia e hiperuricemia; portanto, é fundamental investigar e excluir

outras causas de hiperferritinemia não relacionadas à HH, sobretudo doença hepática e alcoolismo, que são muito mais frequentes que a própria HH⁴⁰.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sobre a importância do diagnóstico molecular são úteis para apontar qual(is) mutações são as mais indicadas para rastreamento na população brasileira com sobrecarga de ferro, entretanto não nos permitem utilizar como ferramenta preditora de sobrecarga de ferro, uma vez que pacientes com mutações no gene na maioria das vezes não desenvolvem a doença assim como pacientes com sobrecarga de ferro não necessariamente carregam mutações no gene HFE.

Sem dúvida o *screening* genético das mutações C282Y, H63D e S65C auxiliam no conhecimento do risco genético de desenvolvimento da HH tipo 1, bem como o são úteis no diagnóstico precoce de indivíduos em estágio inicial. E deve ser indicado para os parentes de primeiro grau (pais, filhos, irmãos) dos indivíduos afetados, principalmente, entre 18 e 30 anos, período em que os testes bioquímicos são informativos, mas que os prejuízos teciduais ainda são irrelevantes.

Uma vez identificado o paciente com suspeita clínica da doença, é necessário investigar os principais parâmetros do metabolismo do ferro, e confirmar com testes mais específicos. Assim, devem ser avaliadas as concentrações séricas de ferritina, transferrina, saturação da transferrina ou capacidade total de ligação de ferro. Além disso, devem ser investigadas as mutações relacionadas à homeostase do ferro por meio de testes genéticos^{41,42}.

O diagnóstico precoce é importante uma vez que a hemocromatose hereditária é comum, severa e tratável. Mas fica a dúvida se o teste genético em indivíduos com valores de ferritina >200 µg/L é uma estratégia prudente e aconselhável. Como concluiu Aguiar *et al.* (2009)⁴³, a expressão fenotípica da sobrecarga do ferro e as repercussões desta no organismo devem prevalecer à expressão genotípica.

O mais importante é encaminhar o paciente para tratamento ficando o rastreio genético como complemento no entendimento de possível causa da sobrecarga de ferro. Estudos com maior número de pacientes poderão propiciar conclusões mais definitivas sobre estas mutações não tão infrequentes.

REFERÊNCIAS

- [1] Domingos CRB. Hemocromatose hereditária e as mutações no gene HFE. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(4):239-45.
- [2] Santos PCJL, Cançado RD, Terada CT, Guerra-Shinohara EM. Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;

- 31(3):192-202.
- [3] Estevam M, Apoloni CR. Uso da fluorescência de raios X portátil (XRF) in vivo como técnica alternativa para acompanhamento dos níveis de ferro em pacientes com sobrecarga de ferro. *Rev Bras Hematol.Hemoter.* 2009; 31(3):153-9.
- [4] Powell LW. Diagnosis of hemochromatosis. *Semin. Gastrointest. Dis.* 2002; 13(2):80-8.
- [5] Lyon E, Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clinical Chemistry.* 2001; 47(7):1147-56.
- [6] Bittencourt P.L, Palácios SA, Couto CA, *et al.* Goldberg AC. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(3):329-35.
- [7] Bomford A. Genetics of haemochromatosis. *Lancet* 2002; 360:1.673-81.
- [8] Wallace DF, Walker AP, Pietrangelo A, *et al.* Frequency of the S65C mutation of HFE and iron overload in 309 subjects heterozygous for C282Y. *J Hepatol* 2002; 36:474-9.
- [9] Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, *et al.* Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol.* 2001; 36(10):1108-15.
- [10] Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, *et al.* Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med.* 2005; 352(17):1769-78.
- [11] Pereira AC, Cuoco MAR, Mota GF, *et al.* Hemochromatosis gene variants in patients with cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2001;88: 388-91.
- [12] Pereira AC, Mota GF, Krieger JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. *Hum Biol.* 001;73:145-51.
- [13] Bueno S. *et al.* Mutations in the HFE gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(4):293-5.
- [14] Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood.* 2005; 106(12):3710-7.
- [15] Bonini-Domingos, CR. Hemocromatose hereditária e as mutações no gene HFE. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto.* 2006; 28 (4):239-45.
- [16] Santos PCJL, Cançado RD, Terada CT, *et al.* Relação entre mutações no gene HFE e TFR2 e alterações nos parâmetros de ferro segundo a frequência de doação em doadores de sangue. *Rev Brás Hematol Hemoter.* 2008; 30(4):21.
- [17] Feder JN, *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996; 13:399-408.
- [18] Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, *et al.* Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2004; 36(1):77-82.
- [19] Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T, *et al.* Hcpidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001; 276(11):7806-10.
- [20] Kawabata H, Yang R, Hirama T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, *et al.* Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem.* 1999; 274(30):20826-32.
- [21] Donovan A, Roy CN, Andrews NC. The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology* (Bethesda). 2006; 21:115-23.
- [22] Cançado RD, Guglielmi ACO, Vergueiro CSV, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattonne CS. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene *HFE* em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto.* 2007; 29(4):351-60.
- [23] Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RDC. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clinical Chemistry.* 1998; 44(8):1748-50.
- [24] Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology.* 1999; 116(1):193-207.
- [25] McCullen MA, Crawford DH, Hickman PE. Screening for hemochromatosis. *Clin Chim Acta.* 2002; 315(1-2):169-86.
- [26] Piperno A, *et al.* Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(4):828-32.
- [27] Andrews NC. A genetic view of iron homeostasis. *Semin Hematol.* 2002; 39(4):227-34.
- [28] Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary iron overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:47-61.
- [29] Powell LW, George DK, McDonnell SM, Kowdley KV. Diagnosis of hemochromatosis. *Ann Intern Med.* 1998; 129(11):925-31.
- [30] Siddique A, Kowdley KV. Review article: the iron overload syndromes. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Oxford.* 2012; 35(8):876-93.
- [31] Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 1999; 341(26):1986-95.
- [32] Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. *N Engl J Med.* 2004; 350(23):2383-97.
- [33] Witte DL, Crosby WH, Edwards CQ, Fairbanks VF, Mitros FA. Practice guideline development task force of the College of American Pathologists. Hereditary hemochromatosis. *Clin Chim Acta.* 1996; 245(2):139-200.
- [34] Franchini M. Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *American Journal of Hematology.* 2006; 81(3):202-9.
- [35] Jackowski D, Rebello ES, Fauz FR. Análise da frequência da mutação C282Y na população paranaense. *Revista Estudos de Biologia.* 2004; 26(55):11-8.
- [36] Agostinho MF, *et al.* Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 1999; 25:324-7.
- [37] Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, *et al.* Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(4):828-32.
- [38] Beutler E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood.* 2003; 101(9):3347-50.
- [39] Brissot P, de Bels F. Current approaches to the management of hemochromatosis. *Hematology American Society of Hematology Educational Program, Washington.* 2006; 2006(1):36-41.
- [40] Mura C, Ragueneas O, Férec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implications in mild form of hemochromatosis. *Blood.* 1999;

93(8): 2502-05.

- [41]Oliveira *et al.* Frequency of the S65C mutation in the hemochromatosis gene in Brazil. Genetics and Molecular Research. 2009; 8(3):794-8.
- [42]Waalén J, Felitti VJ, Gelbart T, Beutler E. Screening for hemochromatosis by measuring ferritin levels: a more effective approach. Blood. 2008; 111(7):3373-6.
- [43]Olynyk JK, Gan E, Tan T. Predicting iron overload in hyperferritinemia. Clin Gastroenterol Hepatol. 2009; 7(3):359-62.
- [44]Aguilar KM, Colares TDS, Xavier MAS, Xavier AREO. Mutações genéticas, métodos diagnósticos e terapêuticas relacionadas à hemocromatose hereditária. Biotemas. 2014; 27(1):133-42.

The logo for BJSCR (Brazilian Journal of Surgical and Clinical Research) features the letters 'BJSCR' in a bold, yellow, sans-serif font. The letters are slightly shadowed and appear to be floating above a faint, reflective surface, giving it a three-dimensional effect.