

Tatiana Mendonça de Oliveira

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE HFE EM
TALASSÊMICOS**



1910001379



**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE HFE EM
TALASSÊMICOS**

Tatiana Mendonça de Oliveira

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP

ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE HFE EM TALASSÊMICOS

Tatiana Mendonça de Oliveira



Dissertação apresentada para obtenção do
Título de Mestre em Genética.

**Orientador: Prof.^a Dr.^a Paula Rahal
Liberatore**

**Co-orientador: Dr.^a Cládia Regina
Bonini Domingos**

São José do Rio Preto – SP
Fevereiro de 2005

1575.24

0489

20205007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto



04/04/2005

Doação

R\$ 19,00

AUTOR(A)

076/2005

105/05

ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE HFE EM TALASSÊMICOS

Oliveira, Tatiana Mendonça de.

"Análise de mutações no gene HFE em talassêmicos / Tatiana
Mendonça de Oliveira – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005
46f. ; 30 cm.

Orientador: Paula Rahal Liberatore

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Mutação (Biologia). 3. Hemocromatose
hereditária. 4. Gene HFE - Mutação. 5. Talassêmia. I. Liberatore, Paula
Rahal. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575.224.2

TATIANA MENDONÇA DE OLIVEIRA

ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE HFE EM TALASSÊMICOS

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador

3º Examinador

São José do Rio Preto, ____/____/____.

*“Ao meu filho, Felipe,
luz dos meus olhos.”*



Agradecimentos

À minha orientadora, Paula, que me acolheu em seu grupo, acreditando em minha capacidade profissional. Agradeço seu apoio, confiança e conselhos, os quais vou levar com gratidão.

À minha co-orientadora, Cláudia, pela disposição e incentivo em todos os momentos.

Aos alunos do Laboratório de Hemoglobinas, pela ajuda e amizade.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IBILCE/UNESP, pela gentileza e profissionalismo.

À Fátima, que nunca me faltou e cuja amizade sempre lembrarei.

À Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, a qual plantou a semente.

Aos amigos do laboratório, Marília, Paola, Carol, Luciana, Gustavo, Maira, Patrícia e Jucimara, pelos momentos de companheirismo e descontração.

Às minhas grandes amigas, Bianca Cristina Lisbôa e Vanessa Veltrini Abril, que apesar da distância sempre estarão no meu coração.

À Patricia Ianella, minha companheira de laboratório por quatro anos, exemplo de determinação.

À Juliana Montá Lage, amiga e companheira durante o mestrado.

À Roberta França Porto Vetorazzi, amiga que sempre acreditou em mim, mesmo em momentos em que eu mesma não acreditava.

Ao casal Elizabeth F. Porto e Paulo Roberto A. Porto, pela amizade, confiança e suporte dados ao longo destes anos.

Ao meu tio Giulio Cervigni de Oliveira, pela revisão dos textos em inglês.

Ao meu grande amigo, Luis Gustavo, pela amizade e revisão dos textos.

Aos amigos que fiz durante a graduação e pós-graduação, muito obrigada pela amizade.

À minha sogra Elizabete, que se tornou uma segunda mãe.

À minha cunhada Caroline, minha irmãzinha.

Ao meu sogro Anizio e ao meu cunhado Gustavo, pela amizade.

À minha avó Wanda, pelo carinho.

Aos meus avós, Lea e Paulo, pelo apoio.

À Neiva, pela amizade.

Aos meus pais, que me ensinaram que o estudo, o respeito e a determinação são alicerces fundamentais para se alcançar nossos sonhos.

Ao meu amado filho, Felipe, que nos momentos de tristeza iluminou meus olhos e me fez sorrir. Que foi, por muitas vezes, a minha força para continuar.

Ao meu noivo, Guilherme, pelo amor, confiança e incentivo.

Obrigada a todos pelo carinho, amizade e consideração.

*“Na Escola Bélica da Vida –
O que não me faz morrer, me
torna mais forte.”*

Nietzsche



Sumário

Introdução	1
1. Hemocromatose Hereditária	4
1.1. Fisiopatologia e Genética da Hemocromatose Hereditária	6
1.2. Origem das Mutações	7
1.3. Diagnóstico e Tratamento	8
2. Talassemias	9
1.1. Talassemia Alfa	9
1.2. Talassemia Beta	11
Objetivos	12
Artigo Submetido à Publicação	14
Conclusões	33
Referências Bibliográficas	35
Resumo	43
Abstract	45

INTRODUÇÃO

O ferro é um dos componentes mais abundantes na crosta terrestre, sendo encontrado na forma férrica (Fe^{3+}) e é de extrema importância para os organismos vivos devido sua capacidade de troca de elétrons em condições aeróbicas, tornando-o essencial para certas funções celulares, como: síntese de DNA, transporte de oxigênio e de elétrons, e respiração celular. Porém grandes quantidades deste metal podem ser tóxicas, sendo que tal toxicidade se deve ao seu alto poder redutor de moléculas de oxigênio (O_2), formando radicais livres, que são nocivos às células (PIETRANGELO, 2002).

A quantidade de ferro no organismo é essencialmente controlada pela absorção do mesmo no intestino, visto que não há conhecimento de vias significativas de excreção deste metal, sendo que as formas mais significativas de perda natural, são através da menstruação e do suor (FLEMING & SLY, 2001; HASH, 2001; TOWNSEND & DRAKESMITH, 2002). Indivíduos normais absorvem de 1 a 2 mg de ferro por dia, porém há pessoas que sofrem distúrbios relacionados à absorção deste metal, realizando-a de maneira aumentada, chegando a absorver de 3 a 4 mg por dia (HASH, 2001), levando a um quadro de hemocromatose, doença caracterizada pelo acúmulo de ferro no organismo, sendo progressiva e multi-sistêmica (GRIFFITHS & COX, 2000; HASH, 2001).

O acúmulo de ferro pode se ocasionar devido a falhas nas vias metabólicas do mesmo, portanto, vários genes podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença (GRIFFITHS & COX, 2000; ROY & ANDREWS, 2001). O ferro, no seu metabolismo, é reduzido, no lúmen intestinal, pelo citocromo b duodenal (Dcytb) para apresentar-se sob a forma de ferro ferroso



(Fe^{2+}), que é absorvido pelos enterócitos através da proteína transportadora de metal duodenal 1 (DMT1), sendo liberado na corrente sanguínea pela ferroportina 1 (FP1), presente na membrana basal do enterócitos, após oxidação pela hepaestina (HP). No sangue, o ferro férrico (Fe^{3+}), liga-se à transferrina (Tf), que o transporta. Sua absorção pelas células do organismo, se dá pela interação da transferrina com o seu receptor (receptor de transferrina 1 ou Tfr 1) situado na membrana celular, desencadeando a formação de um pinossomo, no qual o pH é reduzido pela união a um lisossomo, alterando a forma iônica do metal para ferro ferroso (Fe^{2+}), liberando-o da transferrina, sendo em seguida transportado para o meio intracelular, onde é armazenado pela enzima ferritina (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; BOMFORD, 2002).

Até o momento foram descritos pelo menos seis genes que causam hemocromatose, relacionados no quadro 1:

Quadro 1. Base genética das hemocromatoses.

Gene	Locus	Tipo de hemocromatose	Referência
HFE	6p 21.3	Hemocromatose Hereditária ou tipo 1	Feder et al., 1996
Desconhecido	1q21	Hemocromatose juvenil ou tipo 2	Roetto et al., 1999
HAMP	19q13	Hemocromatose juvenil ou tipo 2	Pigeon et al., 2001
TFR2	7q22	Hemocromatose tipo 3	Camaschella et al., 2000
SLC11A3	2q32	Hemocromatose tipo 4	Njajou et al., 2001
H-ferritina	2p16.3	Hemocromatose tipo 5	Kato et al., 2001



A Hemocromatose Hereditária é o subtipo mais importante em termos de prevalência e efeito na saúde (BOMFORD, 2002), sendo foco de diversos estudos na população européia (MELLS et al., 2002; CHAMBERS et al., 2003; ANDERSEN et al., 2004; MILMAN et al., 2004).

1. Hemocromatose Hereditária

A Hemocromatose Hereditária é um distúrbio autossômico recessivo, que afeta o gene HFE, acometendo um em cada 300 indivíduos descendentes de caucasianos do norte europeu (BRISSOT et al., 2000; VAUTIER & OLYNYK, 2000). Caracterizada pela absorção excessiva de ferro pelas células gastrointestinais e acúmulo deste no parênquima de órgãos como o fígado, pâncreas e coração, comprometendo suas funções ao longo do tempo (WAHEED et al., 1997; VAUTIER & OLYNYK, 2000). A doença pode levar ao desenvolvimento de diabetes mellitus, cardiopatia, artrite, hipogonadismo, pigmentação diferenciada da epiderme, cirrose hepática seguida de carcinoma hepatocelular (WAHEED et al., 1997; BRISSOT et al., 2000).

O gene HFE foi primeiramente descrito em 1996, por Feder et al., que o localizaram no cromossomo 6p21.3, chamando-o por HLA-H, por se tratar de um gene muito semelhante aos genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I. Porém, como tal nomenclatura já havia sido adotada para um pseudogene, um comitê de nomenclatura determinou a utilização de um novo nome, HFE (FEDER et al., 1997; WAHEED et al., 1997; FEDER et al., 1998).



O produto protéico deste gene é uma proteína de membrana, expressa na maioria das células do organismo (MOALEM et al., 2002). Sua função ainda é desconhecida, sendo alvo de diversos estudos e muita controvérsia no meio científico (FEDER et al., 1998; LEBRON et al., 1999; ZHANG et al., 2003).

A proteína HFE é composta por 343 aminoácidos sendo estruturalmente semelhante às proteínas do MHC de classe I, com três domínios α voltados para o exterior celular, uma região transmembrânica e uma cauda citoplasmática (FEDER et al., 1997; WAHEED et al., 1997). Tem sido proposto que quatro resíduos de cisteína devem ser invariantes, para que as estruturas secundária e terciária não sejam afetadas e assim não comprometam a interação da proteína com moléculas acessórias, como a β_2 -microglobulina, e por conseguinte a sua função (FEDER et al., 1997).

Alguns estudos sugerem o agravamento dos sintomas clínicos da hemocromatose quando associada à anemias hemolíticas, como a alfa e a beta talassemias. Mells et al. (2002) observaram um aumento nos níveis de ferritina em portadores de beta talassemia, quando associada a homozigose para a mutação H63D. Por outro lado, Politou et al. (2004) não encontraram, em pacientes com beta talassemia, associação das mutações causadoras de hemocromatose com os níveis de ferritina.

1.1. Fisiopatologia e Genética da Hemocromatose Hereditária

Algumas mutações no gene HFE têm sido descritas e associadas à Hemocromatose Hereditária, sendo consideradas marcadores genéticos para esta doença. Dentre várias mutações, as mais importantes são: C282Y, H63D, S65C (BOMFORD, 2002; JONES et al., 2002). Outras mutações, menos freqüentes são: E168X e W169X no norte da Itália (MARIANI et al., 2003; SALVIONI et al., 2003), Q283P na França (LE GAC et al., 2003), I105T e G93R nos EUA (BARTON et al., 1999).

A mutação C282Y é a mais freqüente nos indivíduos com Hemocromatose Hereditária, com cerca de 80% de incidência (HASH, 2001; JONES et al., 2002). Tal mutação se deve a transição da guanina 845 por uma adenina, resultando numa mutação de sentido trocado, da cisteína 282 por uma tirosina (FEDER et al., 1998; JONES et al. 2002). A mutação C282Y, se localiza no domínio $\alpha 3$, no qual há a ligação da β_2 -microglobulina assim, a associação desta proteína não ocorre, impossibilitando seu transporte e inserção na membrana celular (GRIFFITHS & COX, 2000).

Enquanto a mutação H63D, em que ocorre uma transversão da citosina 187 para guanina, substituindo o aminoácido 63 de histidina por ácido aspártico (H63D) (FEDER et al., 1997). Nos indivíduos com hemocromatose, a prevalência desta mutação corresponde de 15 a 20% dos casos (VAUTIER & OLYNYK, 2000). Essa mutação ocorre no domínio $\alpha 1$, permitido a associação com a β_2 -microglobulina, porém, há uma perda parcial de função, levando a um quadro de hemocromatose mais brando (GRIFFITHS & COX, 2000).



Já a mutação S65C tem uma incidência de 2 a 3%, nos indivíduos com Hemocromatose Hereditária, porém não é muito estudada (BOMFORD, 2002). Resultado da transversão da A₁₉₃ por uma T, trocando a serina 65 por uma cisteína. Com localização no domínio $\alpha 1$, está relacionada a uma forma mais branda de hemocromatose, cujo mecanismo ainda não foi elucidado (MURA et al., 1999; JONES et al., 2002).

No Brasil, há ainda poucos estudos sobre hemocromatose, entre eles há a investigação da associação das mutações C282Y e H63D com outras enfermidades, como a porfiria cutânea tarda e hepatite C (MARTINELLI et al., 2000), assim como avaliação destas mutações em pacientes com altos níveis de ferro no organismo (BITTENCOURT et al., 2002). Outros trabalhos relacionam a hemocromatose hereditária com etnias (AGOSTINHO et al., 1999; PEREIRA et al., 2001). Em 2000, um grupo brasileiro relatou o caso de uma família com indivíduos homozigotos e heterozigotos para a mutação C282Y, todos em associação com a beta talassemia, sendo que em todos os portadores de pelo menos um alelo C282Y foi encontrada alta carga de ferro no organismo, sugerindo um efeito sinérgico das enfermidades (ARRUDA et al., 2000).

1.2. Origem das Mutações

Estudos indicam que o haplótipo ancestral que carrega a mutação C282Y, tem em média 6 Mb, sugerindo o aparecimento da mutação nos últimos 2000 anos. Enquanto a mutação H63D é muito mais antiga, sendo encontrada em vários haplótipos, porém há hipóteses que propõem a



espontaneidade desta mutação, visto que é amplamente distribuída geograficamente (BOMFORD, 2002).

Alguns estudos indicam que a mutação C282Y tenha se originado há 60-70 gerações, na população Celta, porém há pesquisadores que defendem a origem na população Viking, devido a maior frequência da mutação na Escandinávia, às altas frequências em regiões litorâneas e também à queda na frequência da mutação do Norte para o Sul europeu (MILMAN & PEDERSEN, 2003).

Moalem et al. (2002) sugerem que a mutação C282Y conferiu resistência a infecções como a peste negra, sendo selecionada durante a Idade Média.

1.3. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico de Hemocromatose Hereditária é, em geral, tardio, ocorrendo com muita frequência a observação de um quadro clínico típico, caracterizado por um indivíduo do sexo masculino, com meia idade, apresentando sintomas como: melanoderma, hepatomegalia e diabetes mellitus (BRISSOT et al., 2000).

O tratamento indicado para a maioria dos pacientes é a flebotomia acompanhada por uma dieta adequada, enriquecida com proteínas, vitamina B₁₂ e folato, para que a eritropoese, que apresenta-se aumentada, seja eficiente. A terapia ferroquelante deve ser aplicada somente para pacientes com anemias severas, visto que há efeitos adversos, além de não ser confortável



(HASH, 2001). Os testes com quelantes orais diminuem o desconforto do uso tradicional sub-cutâneo ou intra venoso, mas não apresentam eficácia comprovada para a hemocromatose.

2. Talassemias

As talassemias são definidas como um grupo heterogêneo de alterações hereditárias que se caracterizam por ausência ou redução na síntese de uma ou mais cadeias de globina, gerando desequilíbrio entre as subunidades resultando, geralmente, em anemia microcítica e hipocrômica (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; DOMINGOS & SIQUEIRA, 2000). De acordo com a cadeia globínica afetada, as talassemias podem ser classificadas como: alfa, beta, delta, delta-beta e gama-delta-beta (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; WEATHERALL & CLEGG, 2001).

Em casos graves, pode-se observar alterações esqueléticas, cardiológicas, endócrinas, complicações hepatobiliares e maior suscetibilidade a doenças infecciosas. O tratamento dá-se, em geral, por transplantes de medula óssea ou por regime crônico de transfusões de sangue, terapia quelante intensiva e esplenectomia (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; NAOUM, 1997).

2.1. Talassemia Alfa

A talassemia alfa é a alteração genética mais comum no homem, com distribuição mundial e maior prevalência em populações do continente asiático, principalmente em algumas regiões da China, Tailândia, Birmânia,



Malásia e África (NAOUM, 1997; GREENBERG et al., 2001). No Brasil, a prevalência de um ou dois genes alfa afetados é relatada em torno de 10-20% (SIQUEIRA, 2000; WENNING et al., 2000).

A síntese de cadeias alfa envolve um gene, que apresenta-se duplicado, α_2 e α_1 , sendo localizados no braço curto do cromossomo 16. Estes podem estar parcial ou totalmente afetados, gerando várias combinações que originam fenótipos bastante variáveis (ALVARES et al., 1996; NAOUM & DOMINGOS, 1998).

A causa mais freqüente das talassemias alfa é a deleção de um ou mais alelos alfa. Estas podem atingir, parte do gene, diminuindo sua expressão, ou o gene integralmente, levando à ausência de expressão do alelo (NAOUM & DOMINGOS, 1998).

O excesso de cadeias de beta globina, na alfa talassemia, leva à formação de tetrâmeros de beta globina (hemoglobina H), que em condições adversas, como febre associada ou não com substâncias oxidativas liberadas durante processo de infecção, induz à precipitação da Hb H, formando corpos de inclusão nas hemáceas que posteriormente sofrem hemólise ou são retiradas da circulação pelas células do Sistema Macrofágico Tecidual (GREENBERG et al., 2001).



2.2. Talassemia Beta

As talassemias beta ocorrem com maior prevalência em populações originárias de regiões próximas ao mar Mediterrâneo e também em algumas localidades da China, Índia, Paquistão e Indochina (NAOUM, 1997).

O gene responsável pela síntese de cadeias da beta globina está localizado no cromossomo 11, em uma única cópia. Atualmente já foram identificados aproximadamente 140 tipos de talassemia beta, os quais, estão relacionados com os diferentes graus de lesões nos genes do *cluster* beta (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; NAOUM, 1997). A principal causa das beta talassemias são mutações pontuais, pequenas deleções ou adições de bases, seja em regiões flangeadoras 5' ou 3' do gene, quanto em sua região codificadora, porém somente algumas destas mutações atingiram altas frequências, o que leva a especulações que relacionam este fato à proteção desta contra a malária (THEIN, 2004).

O excesso de alfa globina gera tetrâmeros altamente instáveis, que por sua vez, agregam-se nas células precursoras das hemáceas, formando corpos de inclusão que causam danos mecânicos na membrana destas células, provocando sua destruição na medula óssea, e consequentemente eritropoiese ineficiente (WEATHERALL, 1997; THEIN, 2004). A baixa quantidade de hemáceas circulantes promove um estímulo para o aumento da eritropoiese, que induz um aumento na absorção de ferro e possivelmente uma sobrecarga deste metal (PARFREY et al., 1981; PIPPARD & WAINSCOT, 1987).



OBJETIVOS

Com base na contribuição deste estudo para o conhecimento da prevalência das mutações causadoras de Hemocromatose Hereditária em indivíduos com propensão ao aumento na absorção de ferro, o presente trabalho teve como objetivo:

- Avaliar a prevalência das mutações causadoras de Hemocromatose Hereditária em indivíduos com alfa e beta talassemia.

TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO



TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Revista British Journal of Haematology – ISSN: 0007-1048.



Analysis of the C282Y, H63D and S65C mutations of the *HFE* gene in Brazilian thalassemics

Tatiana Mendonça de Oliveira¹, Fátima Pereira de Souza², José Antonio Cordeiro³

Claudia Regina Bonini-Domingos¹ and Paula Rahal¹

¹ São Paulo State University, IBILCE, São José do Rio Preto – SP, 15054-000, Brazil

Fax: 55-17-221-2390

Phone: 55-17-221-2379

Correspondence: P Rahal (prahal@ibilce.unesp.br)

² USP – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo – SP.

³ Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, FAMERP – São José do Rio Preto – SP.



Abstract

Hereditary Hemochromatosis is a disorder of iron metabolism characterized by increased iron intake and progressive storage. The interaction of the beta thalassemia trait with the mutations in *HFE* gene may increase iron overload. In Brazil, the population constitution is ethnic heterogeneous, so the aim of this study was to evaluate the prevalence of the H63D, S65C and C282Y mutations in *HFE* gene in 102 samples of alpha thalassemia, 168 samples of beta thalassemia heterozigotes and 173 individuals without hemoglobinopathies like control group. The allelic frequencies found in these three groups for the C282Y mutation were 0.98%, 2.38% and 0.29%; for H63D 13.72, 13.7 and 9.54; and for the S65C 0% 0.60% and 0.87% respectively. For the C282Y mutation, the chi-squared test for multiple independent samples indicated a significant difference among the groups, which was confirmed between the beta thalassemia heterozigotes and the control group by Fisher exact test (p-value = 0.009). The inheritance of C282Y defect in *HFE* gene, in beta thalassemic may worsen the clinical picture of these individuals. In front of these results and considering the characteristic of the Brazilian population, this study focuses the importance of screening these mutations in beta thalassemic carriers, improving a normal life expectancy and the answer to specific anemia treatments.

Key words: Hereditary hemochromatosis, H63D, S65C, C282Y, Thalassemia



Introduction

Hereditary Hemochromatosis (HH) is a disorder of iron metabolism, characterized by increased iron absorption and storage, resulting in progressive and multisystemic oxidative organ damage (Griffiths & Cox, 2000; Hash, 2001). In 1996, the *HFE* gene was isolated on chromosome 6 and was considered a candidate gene for bearing the primary defect responsible for hemochromatosis (Feder et al., 1996). However the phenotypic expression of the mutated alleles seems to be highly variable and possibly related to other co-inherited genetic modifiers, such as hereditary anemias (Mells et al., 2002; Pietrangelo, 2004).

HH is most commonly found in northern European descendent, affecting one in three hundred persons (Brissot et al., 2000; Vautier & Olynyk, 2000). Three missense mutations have been described to be associated with the HH. About 85% of the patients with HH carry a cysteine-to-tyrosine substitution at amino-acid position 282 in *HFE* gene (C282Y mutation). This mutation is responsible for 60% of the HH cases in the Mediterranean populations (Candore et al., 2002), with a north to south reduction of the altered allele (Bomford, 2002; Leone et al., 2004). The second one is the H63D mutation that results from the transversion at nucleotide 187 of the gene, causing an aspartic acid-to-histidine conversion at amino-acid 63. This mutation is widely spread among many populations (Rochette et al., 1999; Papanikolaou et al., 2000; Campo et al., 2001; Candore et al., 2002), however it has a frequency of 15-20% in HH cases (Vautier & Olynyk, 2002). The third mutation is the S65C, with an allelic frequency of 1,4%. It results from a substitution at the nucleotide 193, with an

serine-to-cysteine conversion at the 65 amino-acid position (Mura et al., 1999). The last two are associated with milder forms of HH (Asberg et al., 2002; Pietrangelo, 2004). However, the compound heterozygous state of one of these and the C282Y defect increases the risk of HH phenotypically expression (Agostinho et al., 2002; Asberg et al., 2002).

In Brazil, a study of the C282Y and H63D mutations in several ethnic groups, indicated a low prevalence of the C282Y mutation, with its allelic frequency ranging from 0% for Parakanã Indians to 1.4% in Caucasian descendents, while for the H63D allele the frequency was 0% for Parakanã Indians and 16.3% for Caucasian descendents. However the high allelic frequency for both of these mutations (C282Y 1.1%; H63D 7.5%) in African descendents, may be an indication of the intense ethnic miscegenation that occurred in the country during its colonization (Agostinho et al., 1999).

The thalassemias are characterized by ineffective erythropoiesis that could induce excess of iron absorption and ultimately lead to iron overload (Weatherall, 1997; Piperno et al., 2000). The interaction of the HH mutations and the thalassemias may have a synergistic effect, increasing the iron intake and storage (Rees et al., 1998; Jazayeri et al., 2003).

The aim of this study was to evaluate the prevalence of C282Y, H63D and S65C mutations in the HFE gene in individuals with alpha thalassemia, beta thalassemia heterozygotes and in individuals without hemoglobinopathies.



Materials and Methods

We studied 102 patients with alpha thalassemia (69 women and 33 men), 168 patients with beta thalassemia trait (96 women and 72 men) and 173 patients without hemoglobinopathies (16 women and 157 men). Samples of 5 mL of blood were collected of individuals from different regions of Brazil (50% of the Southeast, 25% of the North, Northeast and Center-West, and 25% of the South). The screening for hemoglobinopathies were made by the Hemoglobin and Hematologic Diseases Laboratory of University of São Paulo State/IBILCE, in São José do Rio Preto, Brazil. Informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the pertinent Ethics Committee.

Genomic DNA was extracted from peripheral leucocytes by phenol-chloroform. For the amplification were used two primer sets, the first one, 5'ACATGGTTAAGGCCTGTTGC3' and 5'GCCACATCTGGCTTGAAATT3', create a 207pb fragment that comprises the H63D and S65C mutations sites. The second one, 5'GGGTATTTCTTCCTCCAACC3' and 5'CTCAGGCACTCCTCTCAACC3', produces a 441pb fragment, for the C282Y analysis.

The amplified PCR fragments were digested with restriction endonucleases *Bcl I* (H63D), *Hinf I* (S65C) and *Rsa I* (C282Y). The H63D mutation destroys the *Bcl I* site in the 207 pb PCR product, so while normal DNA is cut into two fragments of 69 and 138 pb, the mutated DNA is not cut. The S65C destroys the *Hinf I* site in the 207 pb PCR product, so while normal DNA is cut into two fragments of 60 and 147



bp, the mutated DNA is not cut. The C282Y mutation creates a new *Rsa I* site. The PCR product digested is cut into two fragments of 145 and 296 bp in the normal allele, while in the mutated DNA three fragments of 29, 116 and 296 bp are generated after digestion. The digestion products of the two first mutations were analyzed in 2.0% agarose gel stained with ethidium bromide, while the product of the digestion of the C282Y mutation was observed in 2.5% agarose gel using the same stain.

Statistical analysis

The data were analyzed utilizing the chi-squared test for multiple independent samples to identify the relationship among the mutations and the groups studied. The Fisher Exact test was used to compare results between two groups. A p-value < 0.05 was considered significant.



T. 1373/05

Results

The allelic frequency of the H63D mutation was 13.72% in the alpha thalassemic group, 13.70% in the beta thalassemia group and 9.54% in the control group. For the S65C mutation the allelic frequencies observed were 0%, 0.60% and 0.87%, respectively in the three groups. The allelic frequencies of the C282Y mutation were of 0.98%, 2.38% and 0.29% respectively (Table 1). There were no C282Y homozygous subjects in these groups, however 6 cases of compound heterozygosity were found, 1 in alpha thalassemics, 2 in beta thalassemics and 3 in the control group (Table 2).

Statistical analysis using the chi-squared test (χ^2) for multiple independent samples identified a significant difference for the C282Y mutation among the groups (p-value = 0.043). The Fisher exact test indicated a significant difference between the beta thalassemic and the control groups (p-value = 0.009). The H63D and S65C mutations did not present significant differences among the groups studied (p-value = 0.28; p-value = 0.42 respectively).



Discussion

Hereditary Hemochromatosis is thought to be the most common inherited disorder in Caucasians. However, it presents a variable prevalence among different ethnical groups (Brissot, 2001; Hash, 2001). Its phenotypically expression seems to be highly variable and possibly related to several factors, such availability of iron in the diet, loss of blood associated with menstruation and pregnancy, blood donation, hepatitis and hemolytic anemias (Lyon & Frank, 2001; Bomford, 2002).

The C282Y missense mutation is responsible for about 80% of the cases of hemochromatosis, while in Italy this frequency is much lower and decreases from the north to south of the country (Bomford, 2002). In Brazil, H63D and C282Y screening in four specific populations (Caucasians, African descendents, Parakanã Indians and a racially mixed group), indicated a low prevalence of the C282Y mutation with the allelic frequency ranging from 0% for Parakanã Indians to 1.4% in Caucasian descendents, while the H63D mutation varied from 0% also for Parakanã Indians to 16.3% for Caucasian descendents (Agostinho et al., 1999). The allelic frequencies obtained in this study were 13.72%, 13.70% and 9.54% for the H63D mutation in the alpha thalassemia, beta thalassemia and control groups, respectively. For the C282Y mutation the frequencies observed were 0.98%, 2.38% and 0.29% respectively, different to previously published results from Brazil. This may be due to the composition of the groups analyzed, which in our case were not based on races.



A third mutation in the *HFE* gene, the S65C mutation, is being studied. No data about this mutation were found in Brazil, so this is possibly the first study. The low allelic frequencies observed, 0.0%, 0.60% and 0.87% for the alpha thalassemia, beta thalassemia and control groups respectively agree with the low frequencies found in other published studies (Mura et al., 1999, Beutler et al., 2000, Milman et al, 2004). In the Ecuadorian population was found 4.0% of allelic frequency, to S65C, one of the higher observed (Leone et al., 2004).

In the present study were found some cases of compound heterozygosity: one patient H63D/C282Y in alpha thalassemic group; in the beta thalassemic group were found two cases, one H63D/S65C and the other was H63D/C282Y; and in control group, three persons with S65C/C282Y. The compound heterozygosity for C282Y and H63D seems to predispose the disease expression. The clinical significance of other forms of compound heterozygosity, such as for C282Y and S65C or H63D and S65C, is still controversial (Pietrangelo, 2004). However some of these patients have another factor involving the iron status, the thalassemia, which may increase the metal levels.

In this study we observed a high incidence of the C282Y mutation in the beta thalassemia group, causing great concern about the levels of iron deposition in the organism of these patients, in light of the great discussion in the scientific world in respect of homeostasis of this metal when there is co-inheritance of these two disorders. Beta thalassemia minor screening, in Iran, indicated significant differences in the frequencies of C282Y and H63D mutants in these patients in relation to control



individuals (Jazayeri, 2003). However, these differences were not observed in Portugal or in India (Kaur et al., 2003, Martins et al., 2004).

There are suggestions that beta thalassemia sufferers have a greater advantage in balancing the iron storage in their organisms (Mehta & Pandya, 1987) considering the hypothesis of two metabolic regulators of this metal. One, the erythroid regulator (beta thalassemia) seems to present greater stimulation of iron absorption than the other one, of accumulation, the mutated HFE gene (Politou et al., 2004).

Published data indicates aggravation of the hemochromatosis symptoms in the presence of heterozygosis for the C282Y mutation in association with beta thalassemia (Rees et al., 1998) with indications of increase in serum iron in beta thalassemia co-inheritance with heterozygotes and homozygotes for H63D (Mells et al., 2002, Martins et al., 2004). However, these results are being discussed by several groups and remain controversial (Capellini et al., 1998, Politou et al., 2004).

The beta thalassemia trait may worsen the clinical picture of hemochromatosis, suggesting a need of screening this group in Brazil, mainly because of the Brazilian population characteristic and to improve a normal life expectancy and the answer to specific anemia treatments.



References

- Asberg, A., Thorstensen, K., Hveem, K., Bjerve, K. S. (2002) Hereditary hemochromatosis: the clinical significance of the S65C mutation. *Genetic Test*, **6**(1), 59-62.
- Agostinho, M. F., Arruda, V. R., Basseres, D. S., Bordin, S., Soares, M. C. P., Menezes, R. C., Costa, F. F., Saad, S. T. O. (1999) Mutation analysis of the *HFE* gene in Brazilian populations. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **25**(6), 324-327.
- Beutler, E., Felitti, V., Gelbart, T., Ho, N. (2000). The effect of *HFE* genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Annals of Internal Medicine*, **133**, 329-337.
- Bomford, A. (2002) Genetics of haemochromatosis. *Lancet*, **360**, 1673-1681.
- Brissot, P.; Guyader, D.; Loréal, O.; Lainé, F.; Guillygomarc'h, A.; Moirand, R.; Deugnier, Y. (2000) Clinical aspects of hemochromatosis. *Transfusion Science*, **23**, 193-200.



Brissot, P. (2001) Hemochromatosis at the intersection of classical medicine and molecular biology. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series III*, **324**, 795-804.

Campo, S., Restuccia, T., Villari, D., Raffa, G., Cucinotta, D., Squadrito, G., Pollicino, T., Raimondo, G. (2001). Analysis of haemochromatosis gene mutations in a population from the Mediterranean Basin. *Liver*, **21**, 233-236.

Candore, G., Mantovani, V., Balistreri, C. R., Lio, D., Colonna-Romano, G., Cerreta, V., Carru, C., Deiana, L., Pes, G., Menardi, G., Perotti, L., Miotti, V., Bevilacqua, E., Amoroso, A., Caruso, C. (2002) Frequency of the *HFE* gene mutations in five italian populations. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **29(3)**, 267-273.

Capellini, M. D., Fargion, S. R., Sampietro, M., Graziadei, G., Fiorelli, G. (1998) Nontransfusional iron overload in thalassemia intermedia: role of the hemochromatosis allele. *Blood*, **92**, 4479-4480.

Feder, J. N.; Gnirke, A.; Thomas, W.; Tsuschihashi, Z.; Ruddy, D. A.; Basava, A.; et al. (1996). A novel MHC class1-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nature Genetics*, **13**, 399-408.



Griffiths, W.; Cox, T. (2000) Haemochromatosis: novel gene discovery and the molecular pathophysiology of iron metabolism. *Human Molecular Genetics*, **9(16)**, 2377-2382.

Hash, R. B. (2001) Hereditary hemochromatosis. *Journal of the American Board of Family Practice*, **14(4)**, 266-273.

Jazayeri, M., Bakayev, V., Adibi, P., Haghighi, R. F., Zakeri, H., Kalantar, E., Zali, M. R. (2003). Frequency of the *HFE* gene mutations in Iranian beta-thalassaemia minor patients. *European Journal of Haematology*, **71**, 408-411.

Kaur, G., Rapthap, C. C., Xavier, M., Saxena, R., Choudhary, V. P., Reuben, S. K., Mehra, N. K. (2003). Distribution of C282Y and H63D mutations in the *HFE* gene in healthy Asian Indians and patients with thalassaemia major. *National Medical Journal of India*, **16(6)**, 309-310.

Leone, P. E., Giménez, P., Collantes, J. C., Paz-y-Miño, C. (2004) Analysis of the *HFE* gene mutations (C282Y, H63D, and S65C) in Ecuadorian population. *Annals of Hematology*, **84(2)**, 103-105.

Lyon, E., Frank, E. L. (2001) Hereditary hemochromatosis since discovery of the *HFE* gene. *Clinical Chemistry*, **47(7)**, 1147-1156.



Martins, R., Picanço, I., Fonseca, A., Ferreira, L., Rodrigues, O., Coelho, M., Seixas, T., Miranda, A., Nunes, B., Costa, L., Romão, L., Faustino, P. (2004) The role of *HFE* mutations on iron metabolism in beta-thalassemia carriers. *Journal of Human Genetics*, **49**(12), 651-655.

Mehta, B. C., Pandya, B. G. (1987) Iron status of beta thalassemia carriers. *American Journal of Hematology*, **24**, 137-141.

Mells, M. A., Cau, M., Deidda, F., Barella, S., Cao, A., Galanello, R. (2002) H63D mutation in the *HFE* gene increases iron overload in β -thalassemia carriers. *Haematologica*, **87**(3), 242-245.

Milman, N., Steig, T., Koefoed, P., Pedersen, P., Fenger, K., Nielsen, F. C. (2004) Frequency of the hemochromatosis *HFE* mutations C282Y, H63D, and S65C in blood donors in the Faroe Islands. *Annals of Hematology*, In: <http://www.springerlink.com/app/home/contribution.asp?wasp=legjyglwmr16181kvr10&referrer=parent&backto=issue,35,39;journal,1,125;linkingpublicationresults,1:100397,1> (accessed in 16/06/2004).



Mura, C.; Raguene, O.; F  re, C. (1999). HFE Mutations Analysis in 711 Hemochromatosis Probands: Evidence for S65C Implication in Mild Form of Hemochromatosis. *Blood*, **93**(8), 2502-2505.

Papanikolaou, G., Politou, M., Termos, E., Fourlemadis, S., Sakellaropoulos, N., Loukopoulos, D. (2000). Hereditary hemochromatosis *HFE* mutation analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **26**, 163-168.

Pietrangelo, A. (2004) Hereditary Hemochromatosis – A new look at an old disease. *The New England Journal of Medicine*, **350**, 2383-2397.

Politou, M., Kalotychou, V., Pissia, M., Romos, Y., Sakellaropoulos, N., Papanikolaou, G. (2004) The impact of the mutations of the *HFE* gene and of the *SLC11A3* gene on iron overload in Greek thalassemia intermedia and $\beta^S/\beta^{\text{thal}}$ anemia patients. *Haematologica*, **89**(4), 490-491.

Rees, D. C., Singh, B. M., Luo, L. Y., Wickramasinghe, S. (1998) Nontransfusional iron overload in thalassemia. Association with Hereditary Hemochromatosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **850**, 490-494.

Rochette, J., Poiton, J., Fisher, C. A., Perera, G., Arambepola, M., Arichchi, D. S., De Silva, S., Vandwalle, J. L., Monti, J. P., Old, J. m., Merryweather-Clarke, A. T., Weatherall, D. J., Robson, K. J. (1999). Multicentric origin of hemochromatosis gene (*HFE*) mutations. *The American Journal of Human Genetics*, **64**, 1056-1062.

Vautier, G.; Olynyk, J. K. (2000) Porphyria Cutanea Tarda in the *HFE*-Gene and Hepatitis C Virus Era. *American Journal of Gastroenterology*, **95(12)**, 3350-3352.

Weatherall, D. J. (1997) The thalassaemias. *British Medical Journal*, **314**, 1675-1678.



Table 1: Allelic frequencies of the H63D, S65C and C282Y mutations in the Alpha Thalassemia, Beta Thalassemia and Control Groups.

Subjects	H63D	S65C	C282Y
Alpha thalassemic	13,72%	0,0%	0,98%
Beta thalassemic	13,70%	0,60%	2,38%
Controls	9,54%	0,87%	0,29%

Table 2: Genotypic frequencies of the H63D, S65C and C282Y mutations in the Alpha Thalassemia, Beta Thalassemia and Control Groups; + indicates the mutated allele, - indicates the wild allele.

Genotypes			Alpha thalassemia		Beta thalassemia		Controls	
H63D	S65C	C282Y	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
++	--	--	1	0,98	4	2,38	0	0
+-	--	--	25	24,51	36	21,43	33	19,08
+-	+-	--	0	0	1	0,59	0	0
+-	--	+-	1	0,98	1	0,59	0	0
--	++	--	0	0	0	0	0	0
--	+-	+-	0	0	0	0	3	1,73
--	+-	--	0	0	1	0,59	0	0
--	--	+-	1	0,98	7	4,17	1	0,58
--	--	++	0	0	0	0	0	0
--	--	--	74	72,55	118	70,25	136	78,61
Total			102	100	168	100	173	100

CONCLUSÕES

O presente estudo apresentou as seguintes conclusões:

- As frequências alélicas para a mutação H63D nos grupos estudados, 13,72% para alfa talassêmicos, 13,70% para beta talassêmicos e 9,54% para o grupo controle, corroboraram com outros dados da literatura;
- As frequências alélicas para a mutação S65C nos grupos estudados, 0,0% para alfa talassêmicos, 0,60% para beta talassêmicos e 0,87% para o grupo controle;
- A mutação C282Y apresentou diferença significativa entre o grupo beta talassêmico (2,38%) e o grupo controle (0,29%) ($p=0,009$);
- Foram encontrados casos de heterozigotos compostos nos três grupos estudados.

Mais estudos devem ser realizados para maior entendimento da Hemocromatose Hereditária, assim como de sua relação com as talassemias.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVARES, F. F.; MOREIRA, H. W.; MATTOS, L. C.; DOMINGOS, C. R. B.; ALVARES, F. Talassemia alfa: aspectos genéticos. **HB Científica**. v. 3, n. 1, p. 71-76, 1996.

ANDERSEN, R. V.; TYBJÆRG-HANSEN, A.; APPELYARD, M.; BIRGENS, H.; NORDESTGAARD, B. G. Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. **Blood**. v. 03, n. 8, p. 2914-2919, 2004.

ARRUDA, V. R.; AGOSTINHO, M. F.; CANÇADO, R.; COSTA, F. F.; SAAD, T. O. β -Thalassemia trait might increase the severity of hemochromatosis in subjects with the C282Y mutation in the HFE gene. **American Journal of Hematology**. v. 63, p. 230-233, 2000.

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, and Diseases**. v. 25, n. 3-4, p. 147-155, 1999.

BITTENCOURT, P. I.; PALÁCIOS, S. A.; COUTO, C. A.; CANÇADO, E. L. R.; CARRILHO, F. J.; LAUDANNA, A. A.; KALIL, J.; GAYOTTO, L. C. C.; GOLDBERG, A. C. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, n. 3, p. 329-335, 2002.

BOMFORD, A. Genetics of haemochromatosis. **Lancet**. v. 360, p.1673-1681, 2002.

BRISOT, P.; GUYADER, D.; LORÉAL, O.; LAINÉ, F.; GUILLYGOMARC'H, A.; MOIRAND, R.; DEUGNIER, Y. Clinical aspects of hemochromatosis. **Transfusion Science**. v. 23, p. 193-200, 2000.



CAMASCHELLA, C.; ROETTO, A.; CALI, A. et al. The TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. **Nature Genetics**. V. 25, p. 14-15, 2000.

CHAMBERS, V.; SUTHERLAND, L.; PALMER, K.; DALTON, A.; RIGBY, A. S.; SOKOL, R.; POLLITT, R.; TANNER, S.; GLEESON, D. Haemochromatosis-associated HFE genotypes in English blood donors: age-related frequency and biochemical expression. **Journal of Hepatology**. v. 39, p. 925-931, 2003.

DOMINGOS, C. R. B.; SIQUEIRA, F. A. M. Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **NewsLab**. n. 42, 2000.

FEDER, J. N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUSCHIHASHI, Z.; RUDDY, D. A.; BASAVA, A.; et al. A novel MHC class1-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. **Nature Genetics**. v. 13, p. 399-408, 1996.

FEDER, J.; 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 β_2 -microglobulin interaction and cell surface expression. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 22, p. 14025-14028, 1997.

FEDER, J. N.; PENNY, D. M.; IRRINKI, A.; LEE, V. K.; LEBRÓN, 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 Sciences of the United States of America**. v. 95, p. 1472-1477, 1998.

FLEMING, R. E.; SLY, W. S. Ferroportin mutation in autosomal dominant hemochromatosis: loss of function, gain in understanding. **Journal of Clinical Investigation**. v. 108, p. 521-522, 2001.

GREENBERG, P. L.; GORDEUK, V.; ISSARAGRISIL, S.; SIRTANARATKUL, N.; FUCHAROEN, S.; RIBEIRO, R. C. Major hematologic diseases in the developing world – new aspects of diagnosis and management of thalassemia,



malarial anemia, and acute leukemia. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)**. p. 479-498, 2001.

GRIFFITHS, W.; COX, T. Haemochromatosis: novel gene discovery and the molecular pathophysiology of iron metabolism. **Human Molecular Genetics**. v. 9, n. 16, p. 2377-2382. 2000.

HASH, R. B. Hereditary hemochromatosis. **Journal of the American Board of Family Practice**. v. 14, n. 4, p. 266-273, 2001.

JONES, D.C.; YOUNG, N.T.; PIGOTT, C.; FUGGLE, S.V.; BARNARDO, M.C.N.M.; MARSHALL, S.E.; BUNCE, M. Comprehensive hereditary hemochromatosis genotypin. **Tissue Antigens**. v. 60, p. 481-488, 2002.

KATO, J.; FUJIKAWA, K.; KANDA, M. et al. Mutation in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. **American Journal of Human Genetic**. v. 69, p. 191-217, 2001.

LEBRON, J. A.; WEST, A. P. Jr.; BJORKMAN, J. P. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. **Journal of Molecular Biology**. v. 294, p. 239-245, 1999.

LE GAC, G. 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, and Diseases**. v. 30, n. 3, p. 231-237, 2003.

MARIANI, R.; SALVIONI, A.; CORENGIA, C.; ERBA, N.; LANZAFAME, C.; DE MICHELI, V.; BALDINI, V.; AROSIO, C.; FOSSATI, L.; TROMBINI, P.; OBERKANINS, C.; PIPERNO, A. Prevalence of HFE mutations in upper Northern Italy: study of 1132 unrelated blood donors. **Dig Liver Dis**. v. 35, n. 7, p. 479-481, 2003.



MARTINELLI, A. L. C.; ZAGO, M. A.; ROSELINO A. M. F.; FILHO, A. B.; VILLANOVA, M. G.; SECAF, M.; TAVELLA, M. H.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; FRANCO, R. F. Porphyrria Cutanea Tarda in Brazilian Patients: Association With Hemochromatosis C282Y Mutation and Hepatitis C Virus Infection. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 95, n. 12, pp. 3516-3520, 2000.

MELLS, M. A.; CALI, M.; DEIDDA, F.; BARELLA, S.; CAO, A.; GALANELLO, R. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in β -thalassemia carriers. **Haematologica**. v. 87, p. 242-245, 2002.

MILMAN, N.; PEDERSEN, P. Evidence that the Cys282Tyr mutation of the HFE gene originated from a population in Southern Scandinavia and spread with the Vikings. **Clinical Genetics**. v. 64, n. 1, p. 36-47, 2003.

MILMAN, N.; PEDERSEN, P.; OVESEN, L.; MELSEN, G. V.; FENGER, K. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in 2501 ethnic Danes. **Annals of Hematology**. v. 83, n. 10, p. 654-657, 2004.

MOALEM, S.; PERCY, M. E.; KRUCK, T. P. A.; GELBART, R. R. Epidemic pathogenic selection: an explanation for hereditary hemochromatosis? **Medical Hypotheses**. v. 59, n. 3, p. 325-329, 2002.

MURA, C.; RAGUENES, O.; FÈRE, 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.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Savier, 1997.

NAOUM, P. C.; DOMINGOS, C. R. B. Talassemias alfa. **Laes & Haes**. n. 113, p. 70-98, 1998.



NJAJOU, O. T.; VAESSEN, N.; JOOSSE, M. et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. **Nature Genetics**. v. 28, p. 213-214, 2001.

PARFREY, P. S.; BARNETT, M.; SACHS, J. A.; POLLOCK, D. J.; TURNBULL, A. L. Iron overload in beta-thalassemia minor. **Scandinavian Journal of Haematology**. v. 27, p. 294-302, 1981.

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

PIETRANGELO, A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 282, p. G403-G414, 2002.

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

PIPPARD, M. J. & WAINSCOT, J. K. Erythrokinetics and iron status in heterozygous beta-thalassemia, and the effect of interaction with alpha-thalassemia. **British Journal of Hematology**. v. 66, p. 123-127, 1987.

POLITOU, M.; KALOTYCHOU, V.; PISSIA, M.; ROMBOS, Y.; SAKELLAROPOULOS, N.; PAPANIKOLAOU, G. The impact of the mutations of the HFE gene and of the SLC11A3 gene on iron overload in Greek thalassemia intermedia and $\beta^S/\beta^{\text{thal}}$ anemia patients. **Haematologica**. v. 89, p. 490-492, 2004.

ROETTO, A.; TOTARO, A.; CAZZOLA, M. et al. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. **American Journal of Human Genetics**. v. 25, p. 14-15, 2000.



ROY, C. N.; ANDREWS, N. C. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations mechanisms and modifiers. **Human Molecular Genetics**. v. 10, n. 20, p. 2181-2186, 2001.

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.

SIQUEIRA, F. A. M. **Diagnóstico neonatal de hemoglobinopatias**. São José do Rio Preto, SP. 2000. 139f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Univesidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE.

STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A. W.; MAJERUS, P. W.; VARMUS, H. **The molecular basis of blood diseases**. 2nd, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1994, 986p.

THEIN, S. L. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassemia. **British Journal of Haematology**. v. 124, p. 264-274, 2004.

TOWNSEND, A.; DRAKESMITH, H. Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. **Lancet**. v. 359, p. 786-790, 2002.

VAUTIER, G.; OLYNYK, J. K. Porphyrria Cutanea Tarda in the HFE-Gene and Hepatitis C Virus Era. **American Journal of Gastroenterology**. v. 95, n. 12, p. 3350-3352, 2000.

WAHEED, A.; PARKKILA, S.; ZHOU, X. Y.; TOMATSU, S.; TSUHIHASHI, Z.; FEDER, J. N.; SHATZMAN, R. C.; BRITTON, R. S.; BACON, B. R.; SLY, W. S. Hereditary hemochromatosis: Effects of C282Y and H63D mutations on association with β_2 -microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cell. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.94, p. 12384-12389, 1997.



WEATHERALL, D. J. The thalassaemias. **British Medical Journal**. v. 314, p. 1675-1678, 1997.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: na increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 79, n.8, p. 704-712, 2001.

WENNING, M. R. S. C.; KIMURA, E.M.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. O.; GERVÁSIO, S.; JORGE, S. B.; SILVA, N. M.; SONATI, M. F. Alpha-globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**. v. 33, p. 1041-1045, 2000.

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 Sciences of the United States of America**. v. 100, p. 9500-9505, 2003.



RESUMO

Há diversas patologias relacionadas ao acúmulo de ferro no organismo, por exemplo a hemocromatose, a qual é ocasionada por falhas nas vias metabólicas deste elemento. O subtipo de hemocromatose mais prevalente é a Hemocromatose Hereditária ou Hemocromatose Tipo 1, que é desencadeada por mutações no gene HFE. O quadro de hemocromatose pode se agravar se esta estiver associada à anemias hemolíticas pode ocorrer um aumento ainda maior no acúmulo de ferro, visto que nas hemoglobinopatias há a liberação do ferro heme dos eritrócitos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência das mutações H63D, S65C e C282Y, no gene HFE, em alfa talassêmicos, beta talassêmicos heterozigotos e em indivíduos normais para hemoglobinopatias. Foram rastreadas, por PCR-RFLP, as mutações H63D, S65C e C282Y, em 102 amostras de alfa talassêmicos, 168 de beta talassêmicos e 173 controles sem hemoglobinopatias. As frequências alélicas encontradas para C282Y foram 0,98%; 2,38%; 0,29%, para H63D 13,72%; 13,70%; 9,54% e para S65C 0%; 0,60%; 0,87%, respectivamente aos grupos citados. Para a mutação C282Y, o teste de Qui-Quadrado para várias amostras independentes indicou diferença significativa entre os grupos, sendo confirmada entre o grupo beta talassêmico e o grupo controle pelo teste exato de Fisher ($p = 0,009$). A herança do defeito C282Y no gene HFE, em beta talassêmicos, pode agravar o quadro clínico destes indivíduos. Diante destes resultados e considerando a característica da população brasileira, destaca-se a importância do rastreamento destas mutações nos portadores de beta talassemia, melhorando a qualidade de vida e a resposta a tratamentos específicos para a anemia.

Palavras-chave: Hemocromatose Hereditária, H63D, S65C, C282Y e Talassemia.



ABSTRACT

There are many pathologies related to iron accumulation in the organism, for example the Hereditary Hemochromatosis (HH), which is caused by defects in its metabolic way. The hemochromatosis subtype more prevalent is the HH or Hemochromatosis Type 1, which is unchain by mutations in the HFE gene. When it is associated to hemolytic anemias, may occur a much higher increase of iron storage, considering that in the hemoglobinopathies heme iron is released of the erythrocytes. So, the goal of this study was to evaluate the prevalency of H63D, S65C and C282Y mutations in the HFE gene, in alpha thalassemics, beta thalassemics heterozigotes and in individuals without hemoglobinopathies. These mutations were screened by PCR-RFLP in 102 individuals with alpha thalassemia, 168 beta thalassemic heterozigotes and 173 controls individuals. The allelic frequencies found for the C282Y mutation were 0.98%, 2.38% and 0.29%; for H63D 13.72, 13.7 and 9.54; and for the S65C 0% 0.60% and 0.87% respectively. For the C282Y mutation, the chi-squared test for multiple independent samples indicated a significant difference among the groups, which was confirmed between the beta thalassemia heterozigotes and the control group by Fisher exact test (p -value = 0.009). The inheritance of the C282Y defect, in HFE gene, in beta thalassemic may worse the clinical picture of these individuals. In front of these results and considering the characteristic of the Brazilian population, this study focus the importance of screening of these mutations in beta thalassemic carriers, improving normal life expactancy and the answer to specific anemia.

Keywords: Hereditary Hemochromatosis, H63D, S65C, C282Y and Thalassemia.



Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Tatiana Mendonça de Oliveira



