

ISABETH DA FONSECA ESTEVÃO

**FREQÜÊNCIA DOS MUTANTES C282Y E H63D DO GENE
HFE E SUA INFLUÊNCIA NO METABOLISMO DO FERRO E
NA EXPRESSÃO DA BETA TALASSEMIA HETEROZIGOTA**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini - Domingos
Co-orientador: Prof. Dr. Antonio José Manzato**

São José do Rio Preto, 2007.

Estevão, Isabeth da Fonseca.

Freqüência dos mutantes C282Y e H63D do gene *HFE* e sua influência no metabolismo do ferro e na expressão da beta talassemia heterozigota. / Isabeth da Fonseca Estevão. - São José do Rio Preto: [s.n], 2007.

114 f. : il ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Co-orientador: Antonio José Manzato

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

1. Hematologia. 2. Talassemia. 3.. Beta talassemia. 4. Ferro - Metabolismo. 5. Gene HFE - Mutações. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Manzato, Antonio José. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616.155.194

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos.

ISABETH DA FONSECA ESTEVÃO

**FREQÜÊNCIA DOS MUTANTES C282Y E H63D DO GENE *HFE* E SUA
INFLUÊNCIA NO METABOLISMO DO FERRO E NA EXPRESSÃO DA
BETA TALASSEMIA HETEROZIGOTA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

2° Examinador: Prof. Dr. Celso Carlos de Campos Guerra

3° Examinador: Profa. Dra. Paula Rahal Liberatore

São José do Rio Preto, 27/02/2007.

"Estou convencido das minhas
próprias limitações e esta
convicção é minha força"

Mahatma Gandhi

**Esse trabalho é dedicado a todas as pessoas
que têm coragem e determinação para buscar a
realização de um sonho e, em especial àqueles que me
ajudaram a alcançar o meu.**

Aos meus pais, Sebastião Pereira Estevão (in memorian) e Maria de Lourdes Estevão, pela formação e apoio em todos os momentos.

À minha irmã, Lia Estevão, pelo apoio e colaboração no cuidado com minhas filhas.

Ao meu companheiro, Fábio Vallin Antunes, pela paciência, pelos conhecimentos e, sobretudo pelo amor sempre presente.

Às minhas filhas, Renata Estevão Pollini, Juliana Estevão de Sousa, Fernanda Estevão Pollini e Paula Estevão Antunes, pelos momentos mais felizes de minha existência.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Claudia Regina Bonini–Domingos, pela confiança, pelo acolhimento, pela amizade, pelas orientações e pelo incentivo sempre presente nesses dois anos de convivência.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antonio José Manzato, pela paciência de me devolver os conhecimentos matemáticos necessários nesse trabalho e já há muito tempo esquecidos.

À Secretaria de Saúde de São Carlos, na pessoa do Dr. Marcelo de Paula, pelo esforço na minha liberação para esse projeto.

Ao Laboratório Unilab de São Carlos, pela colaboração e realização dos exames bioquímicos e hematológicos.

Ao amigo, Adriano M. Del Vale, pela amizade, colaboração e apoio técnico na realização dos exames laboratoriais necessários para a realização desse trabalho.

Às minhas secretárias, Alessandra A. R. Arantes e Ana Claudia S. de Souza, pela paciência durante minhas ausências no consultório e pela dedicação aos meus pacientes.

À minha amiga, Carmem Brevis, pela tradução dos textos em inglês.

Às minhas amigas, Blaranis H. Pauletto, Edeltraut N. Zóia, Fernanda T. A. Caballero, pelo incentivo, apoio e colaboração sem os quais eu não poderia realizar esse trabalho.

À minha amiga, Jane M. Pauna, pelo acolhimento em São José do Rio Preto, sem o qual talvez eu não tivesse iniciado essa jornada.

À minha amiga, Sílvia M. P. Rizzo, pela amizade, pelo apoio e na ajuda no recrutamento dos pacientes e nas coletas das amostras.

À minha amiga, Tânia Marcondes, pela amizade e as palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos do laboratório, Paula J. A. Zamaro, Luciana de S. Ondei, Lígia M. S. V. Baracioli, Nelson C. Tukamoto Junior, Carlos E. S. Zago, Carlos Fabian Mendiburu, Ana Luíza B. Domingos e Ana Carolina B. Domingos, pelo companheirismo, pela amizade, pela ajuda em todas as etapas de meu projeto, pelas risadas e, principalmente por nos tornarmos uma grande família.

Às minhas amigas de moradia, Rita Peruqueti, Renata V. Nobre e Thaís B. Carvalho, pelo acolhimento, pela amizade, pela ajuda sempre que necessária e, finalmente por dividirem comigo momentos inesquecíveis.

À minha amiga, Marilanda Bellini, pela presença sempre amiga e forte, nas vitórias e nas derrotas que ocorreram nessa trajetória.

Lista de Abreviaturas

Kb	Kilobases
LCR	Região Controladora do Locus
bp	Pares de bases
IVS	Seqüências intercaladoras
UTR	Região não traduzida
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
EKLF	Fator semelhante Kruppel eritróide
CAP	Início da transcrição
CD	Códon
VCM	Volume corpuscular médio
HBCM	Hemoglobina corpuscular média
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
RDW	Coefficiente de variação do tamanho das hemácias
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMT1	Transportador de metal bivalente
TRF	Receptor da transferrina

IRPs	Proteínas reguladoras do ferro
IREs	Elementos responsivos ao ferro
HLA	Antígenos de histocompatibilidade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
TIBC	Capacidade total de ligação do ferro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RLFP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por restrição
Hb	Hemoglobina
$\bar{X} \pm ep$	Média \pm erro padrão

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características das formas hereditárias de hemocromatose.....	42
Tabela 2. Valores de referência para os parâmetros do eritrograma.....	48
Tabela 3. Valores de referência dos testes utilizados.....	51
Tabela 4. Caracterização da amostra utilizada para determinação.....	55
Tabela 5. Caracterização da amostra utilizada na avaliação.....	55
Tabela 6. Parâmetros hematológicos obtidos.	57
Tabela 7. Frequência das mutações do gene HFE nos portadores.....	58
Tabela 8. Avaliação do metabolismo do ferro.....	60
Tabela 9. Distribuição da amostragem de acordo com os valores.....	60
Tabela 10. Características gerais e dados bioquímicos dos.....	61
Tabela 11. Frequência das mutações do gene <i>HFE</i> nos.....	63
Tabela 12. Comparação entre os valores de saturação de transferrina.....	64
Tabela 13. Comparação entre os valores de ferritina e a presença.....	65
Tabela 14. Avaliação da saturação de transferrina de acordo com a idade.....	65
Tabela 15. Avaliação da saturação de transferrina de acordo com o gênero.....	66
Tabela 16. Avaliação da ferritina sérica de acordo com a idade.....	66
Tabela 17. Avaliação da ferritina sérica de acordo com o gênero.....	67
Tabela 18. Características bioquímicas dos sete indivíduos.....	68
Tabela 19. Características bioquímicas dos três indivíduos.....	69
Tabela 20. Influência dos níveis da hemoglobina na saturação.....	70
Tabela 21. Influência dos valores de VCM na saturação de.....	71

Tabela 22. Influência do número de reticulócitos na saturação.....	71
Tabela 23. Influência da quantidade de A ₂ na saturação.....	72
Tabela 24. Influência dos níveis de hemoglobina na ferritina sérica.....	72
Tabela 25. Influência dos valores do VCM na ferritina sérica.....	73
Tabela 26. Influência do número de reticulócitos na ferritina sérica.....	73
Tabela 27. Influência na quantidade de A ₂ na ferritina sérica.....	74
Tabela 28. Comparação da evolução bioquímica entre os indivíduos.....	92
Tabela 29. Comparação da evolução bioquímica entre os indivíduos.....	92

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo tridimensional da estrutura quaternária.....	19
Figura 2. Estrutura dos genes que codificam a alfa e a beta.....	23
Figura 3. Absorção do ferro.....	31
Figura 4. Estrutura básica da proteína HFE.....	35
Figura 5. Representação esquemática dos produtos de amplificação.....	53
Figura 6. Gel de agarose (2%) mostrando heterozigose.....	58
Figura 7. Gel de poliacrilamida mostrando heterozigose.....	59
Figura 8. Relação entre a saturação de transferrina e a concentração.....	62
Figura 9. Demonstração gráfica da influência da idade e do gênero.....	67
Figura 10. Correlação entre a hemoglobina e a saturação de transferrina.....	75
Figura 11. Correlação entre a hemoglobina e a saturação de transferrina.....	75
Figura 12. Correlação entre a hemoglobina e a saturação de transferrina.....	76
Figura 13. Correlação entre a hemoglobina e a saturação de transferrina.....	76
Figura 14. Correlação entre a hemoglobina e a ferritina.....	77
Figura 15. Correlação entre a hemoglobina e a ferritina.....	77
Figura 16. Correlação entre a hemoglobina e a ferritina.....	78
Figura 17. Correlação entre a hemoglobina e a ferritina.....	78
Figura 18. Correlação entre o VCM e a saturação da transferrina.....	79
Figura 19. Correlação entre o VCM e a saturação da transferrina.....	79
Figura 20. Correlação entre o VCM e a saturação da transferrina.....	80
Figura 21. Correlação entre o VCM e a saturação da transferrina.....	80

Figura 22. Correlação entre o VCM e a ferritina.....	81
Figura 23. Correlação entre o VCM e a ferritina.....	81
Figura 24. Correlação entre o VCM e a ferritina.....	82
Figura 25. Correlação entre o VCM e a ferritina.....	82
Figura 26. Correlação entre a quantidade de A_2 e a saturação.....	83
Figura 27. Correlação entre a quantidade de A_2 e a saturação.....	84
Figura 28. Correlação entre a quantidade de A_2 e a saturação.....	84
Figura 29. Correlação entre a quantidade de A_2 e a saturação.....	85
Figura 30. Correlação entre a quantidade de A_2 e a ferritina.....	85
Figura 31. Correlação entre a quantidade de A_2 e a ferritina.....	86
Figura 32. Correlação entre a quantidade de A_2 e a ferritina.....	86
Figura 33. Correlação entre a quantidade de A_2 e a ferritina.....	87
Figura 34. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a saturação.....	87
Figura 35. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a saturação.....	88
Figura 36. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a saturação.....	88
Figura 37. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a saturação.....	89
Figura 38. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a ferritina.....	89
Figura 39. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a ferritina.....	90
Figura 40. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a ferritina.....	90
Figura 41. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a ferritina.....	91
Figura 42. Representação gráfica das diferenças obtidas entre a.....	93
Figura 43. Representação gráfica das diferenças obtidas entre a.....	93

Resumo

A beta talassemia é um dos mais freqüentes distúrbios genéticos no mundo. Estima-se que 1,5% a 3% da população mundial seja portadora do traço talassêmico. Esses portadores geralmente são oligo ou assintomáticos e têm uma expectativa de vida semelhante à dos não portadores. Entretanto, níveis elevados de ferritina sérica têm sido observados em alguns estudos comparativos entre beta talassemia heterozigota e não portadores e, alguns indivíduos, que nunca foram transfundidos, apresentam sinais clínicos e laboratoriais de sobrecarga de ferro. A fisiopatologia dessa complicação continua em discussão. Vários pesquisadores têm sugerido um efeito modulador da mutação do gene da beta globina e mutações em genes codificadores de proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro. Mutações no gene *HFE* são as mais freqüentemente associadas à hemocromatose hereditária. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a freqüência das mutações C282Y e H63D no gene *HFE* em portadores de beta talassemia heterozigota e analisar sua influência no metabolismo do ferro. Foram estudados 162 portadores de beta talassemia heterozigota, residentes na cidade de São Carlos ou região, caucasóides e, acompanhados no serviço de Hematologia. O diagnóstico de traço talassêmico foi confirmado em todos por meio do eritograma e da quantificação da Hb A₂ e Hb fetal por HPLC. O metabolismo do ferro foi avaliado pelas dosagens de ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro, ferritina e saturação da transferrina e, a análise molecular das mutações no gene *HFE*, pela técnica de PCR-RLFP. Foram realizadas análises de correlação linear de Pearson por idade e gênero entre hemoglobina, Hb A₂, VCM e contagem de

reticulócitos e os valores de saturação de transferrina e a ferritina sérica. As comparações, entre os grupos, para avaliação da saturação de transferrina foram feitas pelo teste *t-student* e, para a ferritina, pelo teste Mann Whitney. Foram detectados 36 heterozigotos e três homozigotos para H63D; sete heterozigotos para C282Y e dois duplo heterozigotos. Ferritina sérica abaixo de 20 ng/mL foi observada em 3,7% e acima de 200 ng/mL em mulheres e 300 ng/mL em homens em 22,22% dos indivíduos. Desses, apenas 16,7% tinham saturação de transferrina acima de 45%. Dos cinco talassêmicos que eram portadores de homozigose para H63D ou duplo heterozigotos para H63D e C282Y, apenas dois tinham ferritina acima de 500 ng/ml. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de ferritina e saturação de transferrina entre os portadores de heterozigose para H63D e os com genótipo normal. Entretanto, a diferença foi estatisticamente significativa entre homens e mulheres e entre as faixas etárias. Não foi observada correlação entre os parâmetros hematológicos e os valores da ferritina e os da saturação de transferrina. Os resultados obtidos confirmam a alta frequência do polimorfismo H63D e de níveis elevados de ferritina sérica nos portadores de beta talassemia heterozigota. Todavia, não confirmam a influência desta mutação, em heterozigose, no metabolismo do ferro desses indivíduos, nem sua correlação com os parâmetros hematológicos.

Palavras-Chave: hemocromatose hereditária; gene *HFE*; beta talassemia; ferritina; saturação da transferrina, sobrecarga de ferro.

Summary

Beta thalassemia is one of the most frequent genetic disorder in the world. It is estimated that 1.5% to 3% of the world population is a thalassemia carrier. These individuals are generally slightly symptomatic or asymptomatic and they have a life expectancy similar to those who are non-carriers. However, high levels of serum ferritin have been observed in some comparative studies between heterozygous for beta thalassemia and non-carriers, and some individuals that were never transfused, present clinic and laboratories signs of iron overload. The physiopathology of this disease continues in discussion. Several researchers have suggested a modulator effect from the mutation of the beta globin gene and mutations in genes related with the iron metabolism. Mutations of the gene *HFE* are the most frequently associated to the hereditary hemochromatosis. The aim of this study was evaluate the frequency of C282Y and H63D mutations in the *HFE* gene in beta thalassemia carriers, and analyze its influence in the iron metabolism. 162 beta thalassemia carriers, Caucasoid, residing in the city of Sao Carlos or region and accompanied in the Hematology service were studied. The diagnostic of thalassemia trait was confirmed in every one through a complete erythrogram and quantification of Hb A₂ and Hb fetal by HPLC. The iron metabolism was evaluated by serum iron, total iron-binding capacity, serum ferritin and percent saturation of transferrin. The molecular analysis of the mutations in the *HFE* gene was made by PCR-RLFP. There were made analysis of linear Pearson' correlation, by age and gender, among hemoglobin, Hb A₂, VCM and among reticulocytes count and the values of saturation of transferrin and serum ferritin.

Comparisons between the groups for evaluation of the transferrin saturation were done by the *t-student* test and for the ferritin by Mann Whitney. There were detected 36 heterozygous and three homozygous for H63D; seven heterozygous for C282Y and two compound heterozygous C282Y/H63D. Serum ferritin under 20 ng/ml was observed in 3,7% and it was above 200 ng/ml in women and 300 ng/ml in men in 22,22% of the subjects. From those, only 16,7% had increased of the saturation of transferrin. From the five beta thalassemia with homozygous for H63D and compound heterozygote H63D /C282Y, just two had ferritin above 500 ng/ml. There wasn't a statistically significant difference of the values of ferritin and saturation of transferrin between the carriers of heterozygous for H63D and those with normal genotype. However, the difference was statistically significant between men and women and among the age range. There was not correlation between the hematological parameters and the values of ferritin and transferrin saturation. The results confirm the elevated frequency of H63D polymorphism and the elevated levels of serum ferritin in beta thalassemia carriers. Still, they do not confirm the influence of this mutation in heterozygous, in the iron metabolism of these individuals nor the correlation of the hematological parameters.

Key words: hereditary hemochromatosis; *HFE* gene; beta-thalassemia; ferritin; saturation of transferrin, iron overload.

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Beta Talassemia	19
1.2 Metabolismo do Ferro	28
1.3 Hemocromatose Hereditária.....	36
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo Geral.....	45
2.2 Objetivos Específicos.....	45
3 MATERIAL E MÉTODO	46
3.1 Casuística	46
3.1.1 Amostra	46
3.1.2 Aspectos Éticos	47
3.2 Metodologia	47
3.2.1 Confirmação do diagnóstico de beta talassemia minor.....	47
3.2.2 Avaliação do metabolismo do ferro.....	51
3.2.3 Análise molecular para as mutações do gene <i>HFE</i>	51
3.2.4 Análise estatística dos dados	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Casuística	54
4.3 Análise molecular das mutações C282Y e H63D do gene <i>HFE</i>	58
4.3 Avaliação do metabolismo do ferro	59
4.4 Correlação entre metabolismo do ferro e mutações no gene <i>HFE</i>	63
4.5 Evolução clínica e laboratorial.....	91
5 DISCUSSÃO	94
6 CONCLUSÕES	103
7 REFERÊNCIAS	105

1 Introdução

1.1 Beta Talassemia

A molécula de hemoglobina (Hb) (Figura 1) é uma proteína conjugada com peso molecular de aproximadamente 64500 daltons, formada por quatro subunidades, cada uma delas composta de uma cadeia globínica e um grupo heme (ferro e protoporfirina). Estas cadeias são dobradas e ajustadas para formar um tetrâmero globular. É o principal componente do citoplasma da célula vermelha, correspondendo a 90% do peso seco da hemácia. Sua principal função é transportar o oxigênio dos alvéolos pulmonares para os tecidos (DESSYPRIS, 1999; NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2002).

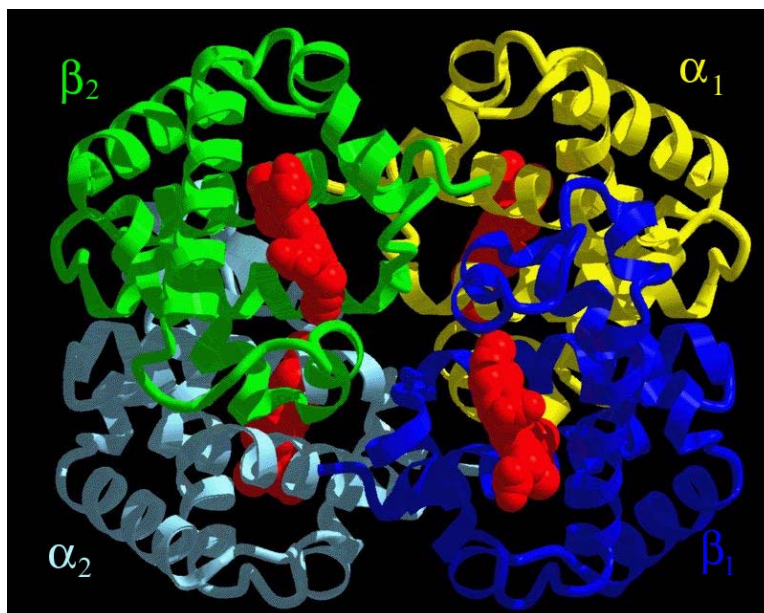


Figura 1. Modelo tridimensional da estrutura quaternária da molécula da hemoglobina*.

* Disponível em http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring/2005/Heiner/hemoglobin_ribbon_4subunits.jpg acesso em 8/01/07.

No indivíduo adulto encontram-se três tipos de hemoglobinas: a do tipo A, formada por duas cadeias alfa e duas cadeias beta; a HbA₂ com duas cadeias alfa e duas delta; a Hb fetal com duas cadeias alfa e duas gama. No período embrionário são produzidas também as hemoglobinas Grower1 ($\zeta 2\epsilon 2$), Grower2 ($\alpha 2\epsilon 2$) e a Portland ($\zeta 2\lambda 2$). A hemoglobina Grower 1 está presente até a 4ª semana de gestação. Após este período e até a 12ª semana as hemoglobinas encontradas são a Portland e a Grower 2. Ao término desta semana não ocorre mais produção de hemoglobinas embrionárias, predominando a síntese da hemoglobina fetal, que se inicia ao redor da 4ª semana. Essas mudanças temporais são acompanhadas também da mudança no sítio principal da eritropoese (NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2002). As hemoglobinas embrionárias são sintetizadas no saco vitelino entre a 3ª e a 8ª semana. A partir da 5ª semana a produção hepática se inicia.

A síntese da Hb A ocorre a partir da 10ª semana mantendo-se em concentrações próximas a 10%, até o nascimento. A Hb A₂ é sintetizada em concentrações reduzidas da 25ª semana até o nascimento. Nos primeiros meses aumenta lentamente até se estabilizar no 6º mês de vida. A Hb fetal é predominante durante a vida fetal e constitui cerca de 70% da hemoglobina total do recém nascido. Ao contrário da Hb A, diminui progressivamente até que, ao redor do 6º mês, é de aproximadamente 1%.

Embora as cadeias beta possam ser detectadas no início da gestação, sua síntese torna-se significativa apenas perto do nascimento. Aos seis meses quase toda a hemoglobina presente é do tipo A. A síntese das cadeias gama também

continua após o nascimento, mas, a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) geralmente não contribui com mais de 3,5% da hemoglobina total do adulto.

Os genes para as cadeias alfa ou similares a alfa (ζ) estão agrupados em uma disposição em *tandem* no cromossomo 16 (DIESSEROTH et al.,1977) e aqueles para cadeias beta ou similares a beta ($G\gamma$, $A\gamma$, δ , e ϵ) estão no cromossomo 11 (FRITSCH et al., 1980). Em cada cópia do cromossomo 16 existem dois genes idênticos de alfa globina (α_1 e α_2) e o gene zeta. Dentro do complexo gênico da beta globina existe uma grande homologia entre os diferentes genes, por exemplo, as globinas beta e delta diferem em apenas 10 aminoácidos dentre os 146. Os genes dos agrupamentos alfa e beta são dispostos na mesma orientação transcricional e, em cada grupo estão situados na mesma ordem seqüencial na qual são expressos durante o desenvolvimento.

A mudança na expressão dos vários genes de globina durante o desenvolvimento é um exemplo clássico da regulação ordenada da expressão gênica desenvolvimental. Acredita-se que todos os genes de globina surgiram de um gene ancestral comum, pois os dois tipos assemelham-se muito, tanto no tamanho como na seqüência dos aminoácidos e na configuração tridimensional. A cadeia alfa possui 141 aminoácidos e a beta 146. Como são codificadas por genes em locos separados, uma mutação de ponto afeta apenas uma ou outra cadeia e não ambas. A produção de cadeias de globina similares a α e a β é equimolar (NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2002).

A beta globina é codificada por um gene estrutural, localizado no braço curto do cromossomo 11 em uma região de 70 kb (Figura 2). O grupamento

contém cinco genes funcionais e um pseudogene: 5' $\epsilon - \gamma - \alpha - \delta - \beta$ 3'. Antes do início do complexo da β globina localiza-se a região controladora do locus (LCR), que é essencial para a expressão de todos esses genes. A seqüência genômica abrange 1600 bp, sendo que a região transcrita está contida em 3 exons separados por 2 introns ou seqüências intercaladoras (IVS). O primeiro exon codifica os primeiros 29 aminoácidos e as duas primeiras bases do códon 30, o exon dois os aminoácidos de 31 a 104 e a terceira base do códon 30 e o exon três os aminoácidos de 105 a 146. Além disso, o exon dois codifica os resíduos envolvidos na ligação do heme e na formação do dímero $\alpha\beta$, enquanto os exons um e três codificam as regiões de não ligação com o heme da cadeia da beta globina. Seqüências importantes para a função do gene são encontradas na região promotora 5', nas junções exon-intron e na região não traduzida 3' (3'-UTR) no final das seqüências do RNA mensageiro (THEIN, 2005).

O promotor do gene da beta globina inclui três elementos: o TATA (posições -28 a -31), o CCAAT (-72 a -76) e o motivo CACCC duplicado (proximal a posição -86 a -90 e distal a posição -101 a -105). Os elementos CCAAT e TATA são encontrados na maioria dos promotores eucariotos, porém, a seqüência CACCC é encontrada predominantemente nos promotores das células eritróides e sua ligação ao fator semelhante Kruppel eritróide (EKLF), parece ser crucial para a expressão do gene da beta globina (MARINI et al., 2004). Além desses motivos, a região anterior ao promotor do gene da β globina contém dois outros ligantes do fator de transcrição eritróide GATA 1. Um outro acentuador também é encontrado no intron dois na posição 3' do gene da beta globina e, está

localizado a 500 a 900 bp do sítio da cauda de poli A (TRUDEL; CONSTANTINI, 1987).

A região 5'UTR ocupa uma região de 50 nucleotídeos entre o sítio CAP (início da transcrição) e o códon de início (ATG). Há duas seqüências conservadas em 5'UTR, a CTTCTG encontradas entre 8 e 13 nucleotídeos abaixo do sítio CAP (+8 e +13) e a CACCATG localizada três nucleotídeos após o sítio de iniciação (ATG). A região 3'UTR abrange a região entre o códon de término (TAA) e a cauda de poli(A). É composta de 132 nucleotídeos com uma seqüência conservada, a AATAAA, localizada 20 nucleotídeos antes da cauda de poli (A). Essa seqüência é o sinal para a clivagem no final 3' do primeiro transcrito e adição da cauda de poli A, que confere estabilidade ao RNAm processado e aumento da tradução (THEIN, 2005).

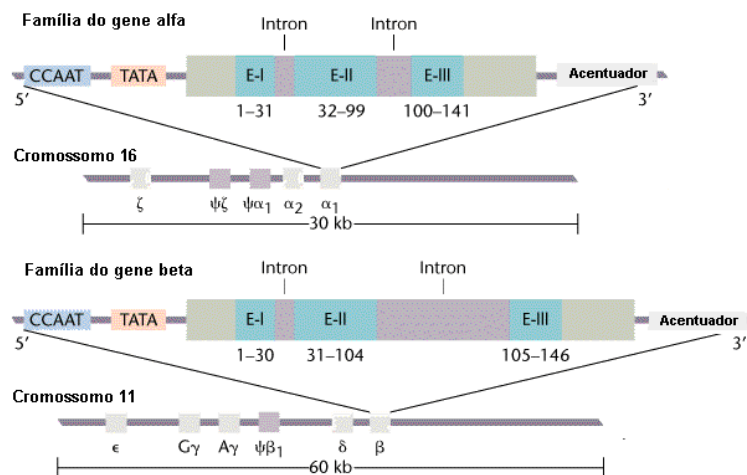


Figura 2. Estrutura dos genes que codificam a alfa e a beta globina, ilustrando dois dos três motivos presentes no promotor do gene da beta globina*.

* Disponível em http://www.mun.ca/biology/scarr/Fg17_19.gif acesso em 5/01/07.

As síndromes beta talassêmicas constituem um grupo de doenças hereditárias caracterizadas por deficiência genética na síntese das cadeias de beta globina. Cerca de 200 mutações já foram identificadas*. Diferentes graus de lesões nos genes do agrupamento beta podem ocorrer como mutações pontuais, pequenas deleções ou adições de bases tanto em regiões flanqueadoras 5' ou 3' do gene, como em regiões codificadoras. Porém, somente algumas destas atingiram frequência elevada, provavelmente relacionada com a proteção contra a malária (LUKES,1999; SINISCALCO et al., 1966).

As mutações no gene da beta globina freqüentemente causam doença, pois uma única mutação afeta 50% das cadeias produzidas enquanto que, na cadeia alfa, afeta apenas 25% delas. Por outro lado, as mutações de beta globina não têm conseqüências pré-natais, já que a γ globina é a principal cadeia antes do nascimento.

A talassemia beta tem sido descrita em vários grupos étnicos sendo especialmente comum no Mediterrâneo, Ásia e algumas regiões da África. Estima-se que 1,5% a 3% da população mundial é portadora do traço talassêmico o que corresponde a 90 a 150 milhões de pessoas, e que aproximadamente 60.000 novos casos ocorram anualmente (LUKES,1999; GALANELLO et al., 2003). Em regiões de alta prevalência sua incidência pode alcançar até 30% (CAO et al., 1996).

* <http://www.globin.cse.psu.edu/>

Existem duas variantes alélicas da beta talassemia: β^0 talassemia na qual não há nenhuma síntese de beta globina e β^+ onde há apenas redução dessa síntese. A maioria das beta talassemias são causadas por mutações de ponto no gene ou próximas as regiões flanqueadoras. A única deleção comum é parcial, de 619 pares de bases na extremidade 3' do gene, em pacientes de origem asiática. A maioria das mutações que reduz a quantidade do RNAm de β -globina são de três tipos: mutantes de promotor, de recomposição do RNA e de acréscimos nas extremidades 5' e 3'. Uma pequena porcentagem de pacientes tem mutações sem sentido ou mudança de matriz de leitura na região codificante do gene, o que leva à síntese de polipeptídeos instáveis e curtos de beta globina. Algumas variantes estruturais de hemoglobina também prejudicam o processamento do RNAm, como na hemoglobina E (DESSYPRIS, 1999; NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2002). Na região sudeste do Brasil as mutações mais freqüentes são β^0 CD 39, β^+ IVSI-110, β^+ IVSI-6 e β^0 IVSI-1 (SONATI et al., 1996).

A fisiopatologia da beta talassemia está relacionada ao desequilíbrio entre as globinas alfa e beta. As cadeias alfa, sintetizadas normalmente, acumulam-se nos eritroblastos e em seus precursores durante a hematopoese sob forma de corpos de inclusão, que danificam a membrana celular levando à destruição prematura destas células, eritropoese ineficaz e, finalmente anemia. Na beta talassemia major (homozigota ou mais freqüentemente duplo heterozigota) a produção de cadeia beta é significativamente comprometida, porque ambos os genes são mutantes. O acentuado desequilíbrio de produção dessas cadeias

ocasiona anemia grave, hiperplasia eritróide e hematopoese extramedular (TAKESHITA, 2002).

Os pacientes geralmente apresentam retardo de crescimento, icterícia, hepatoesplenomegalia e expansão da medula óssea. Aproximadamente 80% dos que não recebem tratamento morrem antes dos cinco anos. Aqueles que recebem apenas transfusão sanguínea morrem antes dos trinta anos, em decorrência de infecções ou hemocromatose, e os que são tratados com transfusões e terapia de quelação do ferro, sobrevivem além da terceira década. Nesses pacientes a sobrecarga de ferro parece ser decorrente das repetidas transfusões de sangue e do aumento da absorção intestinal do ferro, ocasionado pela intensa eritropoese ineficaz. Esse acúmulo acarreta problemas clínicos semelhantes aos da hemocromatose primária (TAKESHITA, 2002).

Na talassemia minor, apenas um gene da globina beta é defeituoso. Os portadores podem ser β^+ ou β^0 de acordo com a diminuição ou ausência na síntese de cadeia beta, respectivamente. O portador geralmente é assintomático e seu diagnóstico realizado através de exames de rotina (TAKESHITA, 2002). A anemia é leve ou ausente. A contagem global de eritrócitos geralmente é elevada com redução acentuada do volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM). A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) é normal ou ligeiramente diminuído. O grau de redução do VCM parece estar diretamente relacionado ao grau de redução da síntese da beta globina (RUND et al., 1992).

Laboratorialmente a forma minor é caracterizada por aumento da Hb A₂ (3,5% a 8%) e níveis discretamente aumentados ou normais de Hb Fetal. As hemácias apresentam resistência osmótica bastante elevada. A eritrocínética geralmente é normal, porém, pode haver discreta diminuição da sobrevivência dos eritrócitos e leve eritropoese ineficaz (PEARSON et al., 1960; DESSYPRIS, 1999), não estando relacionada com o risco de grave sobrecarga de ferro (PIPPARD; WAINSCOAT, 1987).

Os portadores de beta talassemia geralmente evoluem sem complicações clínicas relacionadas ao defeito genético. Todavia, alguns estudos têm demonstrado a presença de sobrecarga de ferro em alguns desses pacientes. Edwards et al. (1981) estudando uma família de portadores de beta talassemia minor encontraram cinco indivíduos com hemocromatose não transfusional, três crianças com idade abaixo de dez anos e dois adultos jovens. Nesse estudo apenas os indivíduos homocigotos para hemocromatose tinham sobrecarga de ferro independente da presença ou não de talassemia. Fargion et al. (1982) detectaram elevação dos níveis de ferritina, principalmente em homens e, em 1985, os mesmos autores sugeriram um possível sinergismo entre a talassemia e mutações em genes relacionados à absorção de ferro.

Após a descoberta do gene *HFE* em 1996 as pesquisas se intensificaram e, já em 1997 Rees et al. relatou a ocorrência de hemocromatose não transfusional em talassemia intermediária associada à mutação C282Y do gene *HFE*. Piperno et al. (2000) estudando pacientes portadores de talassemia e hemocromatose concluíram que o traço talassêmico agrava o quadro clínico de hemocromatose

apenas em homozigotos para C282Y. Ruiz-Arguilles et al. (2001), no México e Melis et al. (2002), na Itália, detectaram sobrecarga de ferro em talassêmicos que possuíam outra mutação no gene *HFE*, a H63D. Maryam Jazayeri et al. (2003) estudando pacientes iranianos com níveis elevados de ferritina não observaram associação com mutações do gene *HFE*. Os mesmos resultados foram obtidos em iranianos por Garewal et al. (2005). Todavia, Rute Martins et al. (2004), em pacientes portugueses, detectaram agravamento do fenótipo da beta talassemia heterozigota quando associada à mutação H63D do gene *HFE*. Os autores sugeriram a existência de um efeito sinérgico entre essas duas mutações.

1.2 Metabolismo do Ferro

O ferro é um elemento essencial para a maioria dos seres vivos, indispensável em vários processos metabólicos. Sua principal característica é capacidade de doar e receber elétrons, sendo um importante componente de vários citocromos e enzimas, incluindo as utilizadas na síntese do DNA. Uma importante função do ferro é a participação deste elemento na eritropoese. Entretanto, devido ao seu potencial oxi-redutor, as quantidades desse metal devem ser rigorosamente controladas, pois, quando em excesso, podem produzir radicais livres que agredem os lipídeos, as proteínas e os ácidos nucléicos celulares (ANDREWS, 2005; FRAZER; ANDERSON, 2005).

A molécula de hemoglobina é formada de quatro subunidades, cada uma contendo um grupo heme e um átomo de ferro capaz de se ligar a uma molécula de oxigênio. Na medula óssea cerca de dois gramas de hemoglobina são produzidas diariamente. A quantidade de ferro absorvida e a disponível na

circulação, são cerca de 20 vezes menores que a necessária. Como resultado, o ferro ligado a transferrina é substituído várias vezes ao dia, reciclando o ferro armazenado. As reservas são mantidas, através do ferro liberado durante o processo de fagocitose das hemácias envelhecidas, que ocorre nos macrófagos do sistema retículo-endotelial. (CAVIL, 2002). A absorção diária de ferro é de aproximadamente 1 a 2 mg e, mesmo em situações de aumento da demanda, a taxa raramente excede 6 mg ao dia. Para a hemoglobinação de novos eritrócitos são necessários 20 a 25 mg de ferro diário.

As reservas desse elemento nos seres humanos são extremamente variáveis. Em mulheres pré-menopausa estão ao redor de 300mg, devido às perdas sanguíneas menstruais e do aumento das necessidades nas gestações, e, em adultos do sexo masculino pode alcançar até um grama. Metade desse ferro é encontrado na hemoglobina dos eritrócitos e seus precursores. Em condições normais sua concentração orgânica é estável e suficiente para satisfazer as necessidades da eritropoese e da incorporação na hemoglobina.

Para a manutenção do equilíbrio homeostático é necessário um controle rigoroso da absorção, pois, a eliminação é pequena, ocorrendo principalmente por perda sanguínea e descamação celular. Não existem mecanismos fisiológicos que regulem sua excreção.

O ferro presente nos alimentos se encontra sob duas formas: a heme e a não heme. A absorção do ferro, principalmente o não heme, é extremamente difícil e dependente de vários fatores como a sua forma química, os ácidos orgânicos e a secreção ácida gástrica (MACKENZIE; GERRICK, 2005). Os

mecanismos de regulação do ferro heme são pouco conhecidos. Sua absorção no lúmen da porção proximal do intestino delgado ocorre pela digestão proteolítica da hemoglobina e mioglobina. O heme liberado é absorvido pela membrana apical e, clivado no lisossomo pela enzima heme oxidase em bilirrubina e Fe^{2+} . O mecanismo de liberação do ferro desse compartimento para o citosol também não é conhecido (MACKENZIE; GARRICK, 2005).

Nas últimas décadas muitos estudos foram realizados para elucidar os mecanismos que controlam o processo de absorção do ferro não heme. Porém, somente nos últimos anos algumas moléculas chave foram descobertas.

A primeira etapa desse mecanismo é a captação do ferro, presente na luz intestinal, para o enterócito, através da membrana apical. A proteína responsável por esse transporte é um transportador de metal bivalente, a DMT1. Portanto, o ferro que em sua maioria se encontra no estado férrico (Fe^{3+}), necessita ser reduzido para a forma ferrosa (Fe^{2+}). A enzima responsável por esse processo parece ser uma ferroredutase, a Dcytb (ANDREWS, 2005). O DMT1 e a Dcytb estão presentes na membrana apical dos enterócitos maduros, nas vilosidades do duodeno proximal, e sua regulação está associada à quantidade de ferro corporal (MACKENZIE; GARRICK, 2005).

Dentro da célula o ferro pode ser armazenado sob a forma de ferritina e, posteriormente perdido na descamação celular, ou absorvido para a corrente sanguínea. O mecanismo de transporte para a membrana basocelular é pouco conhecido, sendo provável que o ferro se ligue a uma chaperona o que manteria sua solubilidade (ANDREWS, 2005). O transporte através da membrana

basocelular para o plasma é mediado por uma proteína transportadora, a ferroportina 1, encontrada em grande quantidade no fígado, baço, rins, coração, placenta e células duodenais, sendo também responsável pela liberação do ferro armazenado nos macrófagos e hepatócitos (DONOVAN et al., 2000). Finalmente, na corrente sanguínea o ferro necessita ser novamente oxidado para ser captado pela transferrina. A enzima responsável por esse processo parece ser a hefestina. (VULPE et al., 1999; DONOVAN, 2005) (Figura 3).

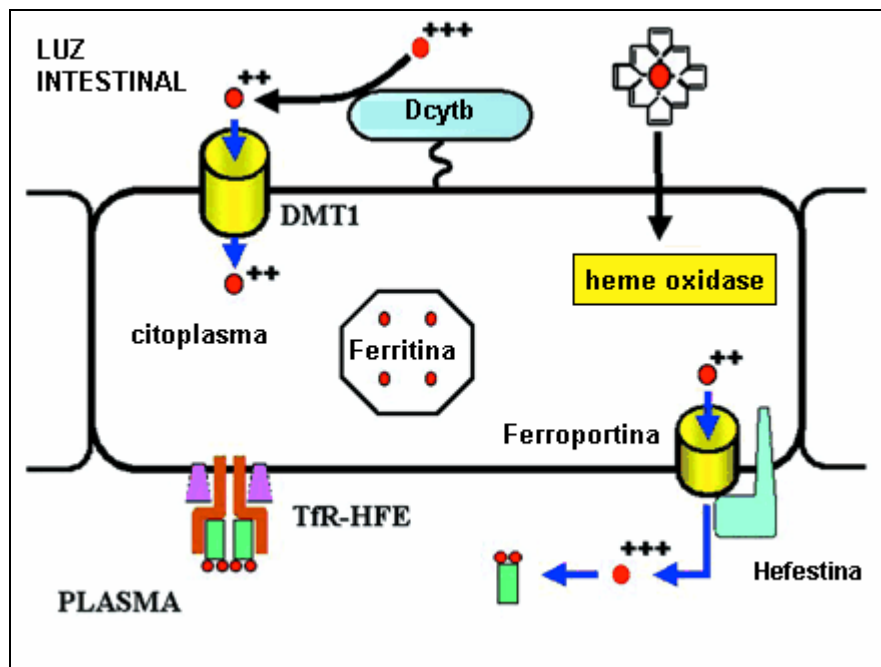


Figura 3. Absorção do ferro (Adaptado de BRITTENHAM et al., 2001).

O ferro ligado a transferrina é transportado, pelo sistema porta, para o fígado onde é armazenado, associado a ferritina e hemossiderina (KAWABATA et al., 1999; FLEMING et al., 2000). A transferrina é uma proteína plasmática que tem a capacidade de transportar dois átomos de ferro.

Seu transporte para dentro das células é realizado através dos receptores da transferrina, TRF₁ e TRF₂, localizados na superfície celular. Cada receptor pode se ligar a duas moléculas de transferrina. O TRF₁ é expresso em todas as células do organismo, geralmente em pequena quantidade, porém, é altamente expresso nos precursores eritróides, linfócitos ativados, trofoblastos do sincício placentário e células tumorais. O TRF₂ se expressa principalmente nos hepatócitos, não sendo regulado pela sobrecarga de ferro hepático (KAWABATA et al., 2000; FLEMING et al., 2000).

As principais células de armazenamento do ferro são os macrófagos e os hepatócitos, oriundos de fontes diferentes. O ferro liberado pela destruição dos eritrócitos e o ferro medicamentoso são estocados nos macrófagos. Os hepatócitos armazenam o ferro livre e o que estava ligado a transferrina. Essas células têm grande capacidade de armazenamento, podendo conter até 10 vezes a quantidade normal, sem evidências de dano hepatocelular (ANDREWS, 2005). Em nível molecular, o ferro é armazenado primariamente na forma de ferritina (THEIL, 2003). Cada molécula desta proteína acomoda cerca de 4500 átomos de ferro. A degradação da ferritina forma a hemosiderina, um conglomerado de ferro não homogêneo com restos de produtos de membrana e proteínas. O ferro da hemosiderina não consegue ser mobilizado.

A ferritina é encontrada em pequenas quantidades no plasma. Sua concentração é diretamente relacionada com a quantidade de ferro armazenado e, por isso, sua dosagem tem sido usada rotineiramente, para avaliação das reservas orgânicas (WALTERS et al., 1973; BASSET et al., 1984). A absorção de ferro é

influenciada por vários fatores como: as reservas de ferro, a taxa de eritropoese, hipóxia, inflamação e gravidez. Esses fatores atuam modificando a expressão duodenal da DMT1, Dcytb e ferroportina 1. Vários mecanismos de regulação têm sido sugeridos. A concentração de DMT1 e Dcytb é fortemente afetada pelas quantidades de ferro nos enterócitos. Esse mecanismo de regulação parece ser mediado pelas proteínas reguladoras do ferro (IRPs), que se ligam aos elementos responsivos (IREs) presentes no RNAm da enzima DMT1 intestinal, estabilizando a molécula, e aumentando sua concentração enzimática. A molécula da enzima Dcytb não possui domínio para ligação com proteínas reguladoras do ferro, sugerindo um mecanismo de controle diferente (MACKENZIE; GARRICK, 2005; FRAZER; ANDERSON, 2005).

O mais recente e importante avanço nessa área foi o reconhecimento do fígado como órgão central desse mecanismo. Sua ação está relacionada à síntese de um pequeno peptídeo de 25 aminoácidos, a hepcidina. Estudos indicam que a hepcidina se liga diretamente à ferroportina ocasionando sua interiorização e posterior degradação. Nas células intestinais a ausência da ferroportina leva a uma diminuição da liberação do ferro para a corrente sanguínea e, conseqüentemente aumento do ferro celular e bloqueio de sua absorção (NEMETH et al., 2005; WESSLING-RESNICK, 2005.) Da mesma maneira, a liberação do ferro dos macrófagos é inibida.

A síntese da hepcidina é regulada pelas quantidades de ferro, de oxigênio e por citocinas liberadas durante processos inflamatórios. O aumento da oferta de ferro, pela alimentação ou por transfusões sanguíneas, estimula sua síntese, e a

oferta inadequada de oxigênio, com aumento compensatório da eritropoese, diminui a concentração desse hormônio, facilitando a absorção intestinal e a liberação do ferro armazenado.

Estudos recentes em portadores de sobrecarga de ferro têm identificado três moléculas que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão da hepcidina (PAPANIKOLAOU et al., 2004; GANZ, 2005; FRAZER; ANDERSON, 2005; PIETRANGELO, 2006). A primeira descrita foi a HFE, uma proteína da superfície celular, composta de 343 aminoácidos, cuja estrutura inclui um grande domínio extracelular, formado de 3 alças ($\alpha 1$ a $\alpha 3$), um único domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática (FLEMING; BRITTON, 2006) (Figura 4). Para estabilização, transporte intracitoplasmático e expressão da HFE na superfície celular e nas membranas endossomais, é necessária a ligação com a β_2 microglobulina, que se faz pela alça $\alpha 3$. Nesse mesmo sítio ocorre a interação com oTfR1. Mutações que afetam essa associação podem ocasionar sobrecarga de ferro. A proteína HFE é expressa em vários tecidos, principalmente no fígado, sendo pouco influenciada pelas mudanças da concentração do ferro orgânico. Nenhum elemento responsivo ao ferro foi encontrado em seu RNAm e nem identificado na região promotora do gene *HFE*.



Figura 4. Estrutura básica da proteína HFE*.

Outra proteína importante no metabolismo do ferro e expressa principalmente pelas células hepáticas é o receptor de transferrina 2 (TfR2). Mutações no gene que a codifica ocasionam distúrbios semelhantes aos do *HFE*.

A última proteína a ser descrita foi a hemojuvelina. Até o momento, sua função não foi totalmente elucidada, porém indivíduos com mutações no *HJV* apresentam importante diminuição dos níveis de hepcidina, evoluindo com rápida sobrecarga de ferro e acentuado dano orgânico (PIETRANGELO, 2006). Os mecanismos exatos de como essas moléculas identificam a quantidade de ferro orgânico e regulam a expressão da hepcidina ainda não foram esclarecidos.

*Disponível em www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2005/Marcil/HFE.jpg acesso em 15/01/06.

1.3 Hemocromatose Hereditária

A hemocromatose hereditária é uma doença caracterizada pelo acúmulo progressivo de ferro orgânico, acarretando danos estruturais e funcionais em vários órgãos (PIETRANGELO, 2006; EZQUER, 2006). A primeira referência dessa patologia data de 1865, na França, por Trousseau. Somente após 24 anos o termo foi usado pela primeira vez por Von Recklinghausen, em 1889, na Alemanha, descrevendo os achados anatomopatológicos de um acentuado dano orgânico associado a uma coloração escura do tecido afetado, que ele atribuiu a um pigmento sanguíneo. Em 1935, Sheldon, revisando todos os casos publicados na literatura médica mundial, sugeriu que essa doença teria natureza “hereditária”. Finalmente, em 1970 a doença foi reconhecida como de herança autossômica recessiva relacionada ao braço curto do cromossomo seis, onde se localiza também o grupamento gênico que codifica os antígenos de histocompatibilidade (HLA-A) e, em 1996, Feder et al., identificaram o gene *HFE*, localizado na região 6p21.3.

A mutação C282Y, o defeito gênico mais freqüentemente associado a hemocromatose hereditária, é caracterizada por transição de guanina para adenina (G→ A) no nucleotídeo 845, ocasionando a substituição do aminoácido 282, tirosina pela cisteína, na proteína (FEDER et al., 1996). Essa substituição acarreta a quebra da ponte dissulfeto na alça $\alpha 3$ do domínio extracelular, diminuindo sua afinidade com a $\beta 2$ microglobulina e com o receptor de transferrina 1 (FEDER et al., 1997). A proteína mutante fica retida no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático onde é degradada (FLEMING; BRITTON, 2006). Desta forma,

há uma diminuição da captação do ferro, ligado a transferrina, pelas células criptas duodenais, levando a diminuição da sua concentração nessas células e, portanto sinalizando para o aumento da expressão das proteínas reguladoras do ferro (IRPs), da enzima DMT1 e da ferroportina. (SIAH et al., 2006).

Outro mecanismo proposto para a ação da proteína HFE no metabolismo do ferro é sua influência na regulação da expressão hepática da hepcidina, cuja concentração está diminuída, em portadores de hemocromatose hereditária apesar das grandes quantidades de ferro no organismo (BRIDLE et al., 2003).

O polimorfismo C282Y é altamente freqüente nas populações caucasóides, com uma freqüência alélica entre 10 a 15%. Em descendentes do norte europeu, a homozigose está presente em aproximadamente cinco de cada 1000 indivíduos (PIETRANGELO, 2004; OLYNYK et al., 1999). Em outras populações, como do sul e do leste europeu, a freqüência é bem menor, sendo rara em populações indígenas da África, na América do Sul e na Austrália (BOMFORD, 2002). Adams e et al., em 2005, em um estudo de quase 100.000 indivíduos observaram homozigose em 0,44% dos brancos não hispânicos, em 0,11% dos americanos nativos, 0,027% dos hispânicos e em 0,014% dos negros.

No Brasil, Agostinho et al. (1999), encontraram a mutação C282Y e a H63D em 1,4% e 16,3% dos caucasóides da região sudeste, respectivamente. Em 2001, Pereira e colaboradores obtiveram resultados semelhantes.

Nos portadores de hemocromatose hereditária descendentes do norte europeu, cerca de 80% são homozigotos para a mutação C282Y. Entretanto, em

outras regiões, como no sul da Europa, o mesmo não é observado. (CASSANELLI et al., 2001; DE MARCO et al., 2004). Na Itália, a hemocromatose associada ao *HFE* foi observada em apenas um terço dos portadores de sobrecarga de ferro (PIPERNO; SAMPIETRO; PIETRANGELO, 1998).

Bittencourt et al. (2002), observaram homozigose da mutação C282Y em 53% dos pacientes com manifestações clínicas de hemocromatose hereditária, residentes na região nordeste do Brasil. Na região sudeste, em 2006, Cançado et al. estudando indivíduos também com sobrecarga de ferro observaram homozigose da C282Y e de H63D em 11% e 17%, respectivamente.

A penetrância do genótipo C282Y/C282Y parece ser muito baixa, indicando que somente a homozigose não é suficiente para causar doença (WAALEN et al, 2002; SIAH et al., 2006). Vários fatores podem influenciar a expressão clínica dessa doença, dentre eles, o gênero, idade, doenças infecto contagiosas, anemias hemolíticas, o consumo de álcool e a associação com mutações em outros genes relacionados à absorção de ferro.

Além da C282Y, outras mutações têm sido descritas, como a H63D e a S65C. A mutação H63D é originada pela transversão de citosina por guanina (C→G) no nucleotídeo 187, determinando a substituição de ácido aspártico por histidina no aminoácido de número 63 (FEDER et al., 1996). Esta alteração acarreta uma maior dificuldade na interação do ferro com o receptor da transferrina, mas não altera a ligação da HFE com a β 2 microglobulina. Sua frequência alélica é muito variável. Em alguns lugares, como a Espanha, pode ser

extremamente elevada atingindo até 20% da população (SANCHEZ et al., 1998; MERRYWEATHER-CLARKE et al., 2000). Os efeitos clínicos desta mutação parecem ser limitados (GOCHEE et al., 2002). Entretanto 1 a 2% das pessoas com componente heterozigoto para C282Y e H63D é predisposta a expressar a doença (ROCHETTE et al., 1999).

Mutações em outros três genes, envolvidos no metabolismo do ferro, podem resultar em padrões semelhantes de acúmulo de ferro: *HJV*, *HAMP* e *TfR2*, todos com padrão de herança autossômico recessivo (PIETRANGELO, 2006). Embora cada uma destas doenças tenha sido inicialmente descoberta em pacientes homozigotos em um único gene, sabe-se agora, que alguns pacientes com hemocromatose grave podem ser portadores de mutações em mais de um gene (LEE et al., 2001; MERRYWEATHER-CLARKE et al., 2003; JACOLOT et al., 2004; LE GAC et al., 2004).

Todas as formas de acúmulo de ferro, associadas a essas mutações, são caracterizadas por uma inadequada síntese de hepcidina. Em 2003, Bridle et al., demonstraram que os níveis de hepcidina estavam inapropriadamente baixos na hemocromatose relacionada ao *HFE*. Nicolas et al., no mesmo ano, corrigiram a sobrecarga de ferro, em camundongos “knock out” para o gene *HFE*, normalizando a hepcidina, confirmando o importante papel da proteína *HFE* na síntese dessa proteína. Acentuada diminuição da expressão hepática desse hormônio também foi observada em camundongos “knock out” para os genes *TfR2* e *HJV* (NEMETH et al., 2005; KAWABATA et al., 2005).

A hemocromatose hereditária juvenil é a forma mais grave da doença e se manifesta precocemente em ambos os sexos (CAZZOLA et al., 1998). As biópsias hepáticas e as autópsias destes pacientes revelam um padrão de distribuição do ferro parenquimatoso semelhante ao observado nas formas relacionadas ao *HFE* e ao *TfR2* (DE GOBBI et al., 2002). Os sintomas relacionados ao envolvimento orgânico aparecem já na segunda década de vida e, além do comprometimento hepático, as outras complicações da doença como diabetes, hipogonadismo, cardiomiopatia, arritmia e falência cardíaca são mais frequentes que na forma clássica (LAMON et al., 1979; CAZZOLA et al., 1983). Essa forma de sobrecarga de ferro pode ser causada por mutações no gene que codifica a hepcidina (*HAMP*) (ROETTO et al., 2003) ou a hemojuvelina (*HJV*) (ROETTO et al., 1999; PAPANIKOLAOU et al., 2004). A estreita semelhança entre estas alterações sugere que a hepcidina e a hemojuvelina sejam componentes do mesmo sistema de regulação.

Poucos casos têm sido relatados com fenótipo compatível com sobrecarga de ferro associado a mutações no gene que codifica o receptor de transferrina 2 (CAMASCHELLA et al., 2000; GIRELLI et al., 2002; HATTORI et al., 2003), com apresentação e evolução muito semelhantes à hemocromatose hereditária associada ao *HFE*.

Um quinto tipo de sobrecarga de ferro foi clinicamente reconhecido em 1999 e está associado à ferroportina, (PIETRANGELO et al., 1999). O gene que codifica esta proteína foi clonado em 2001 e denominado *SLC11A3* (MONTOSI et al., 2001; NJAJOU et al., 2001). A ausência da atividade de ferroportina leva a

retenção anormal e acúmulo de ferro, predominantemente, nos macrófagos do fígado e baço. O acometimento do parênquima é menor do que nos casos associado ao *HFE*, explicando a menor gravidade desse fenótipo. Sua herança é autossômica dominante e, atualmente, é considerada a causa mais freqüente de hiperferritinemia.

Inicialmente essas quatro doenças foram descritas em portadores de mutações em um único gene. Porém, vários autores têm relatado a ocorrência de hemocromatose grave em portadores de mutações em mais de um gene (LEE et al., 2001; MERRYWEATHER-CLARKE et al., 2003; JACOLOT et al., 2004; LE GAC et al., 2004).

Recentemente a hemocromatose hereditária foi classificada em quatro subtipos de acordo com a descrição cronológica*. Tipo 1 ou hemocromatose hereditária clássica (mutações no gene *HFE*); tipo 2 (mutações nos genes *HAMP* e *HJV*); tipo 3 (mutações no *TfR2*) e tipo 4 (mutações no gene da ferroportina) Na Tabela 1 estão resumidas as principais características dos diferentes tipos de hemocromatose.

Essa classificação tem sido criticada por alguns pesquisadores por não contemplar todas as formas de sobrecarga hereditária de ferro e pela inclusão da doença da ferroportina. Segundo esses autores, tal patologia deveria ser considerada separadamente, já que apresenta características fisiopatológicas completamente diferentes das demais. Além disso, as doenças relacionadas a mutações simultâneas em genes diferentes não foram incluídas. (PIETRANGELO et al., 2006; SWINKELE et al., 2006).

Tabela 1. Características das formas hereditárias de hemocromatose (Swinkele et al., 2006).

HH	Gene	Tipo	Frequência	Hepcidina	Gravidade	Bioquímica	Herança
Clássica	<i>HFE</i>	1	Frequente	↓	++	Aumento da saturação da transferrina e ferritina	Autossômica recessiva
Juvenil	<i>HJV</i>	2 A	Rara	↓↓	++++	Aumento da saturação da transferrina e ferritina	Autossômica recessiva
	<i>HAMP</i>	2 B	Muito Rara	↓↓	++++		
TfR2	<i>TFR2</i>	3	Muito Rara	↓	+++	Aumento da saturação da transferrina e ferritina	Autossômica recessiva
Doença da Ferroportina	<i>SLC40A1</i>	4	Rara	↑ ?	+	Aumento da ferritina e leve aumento da saturação da transferrina	Autossômica Dominante

Os sintomas clínicos se iniciam ao redor da quarta década de vida e são inespecíficos. Os mais habituais são fadiga, indisposição e dores articulares. Nas fases avançadas, a doença pode se manifestar com cirrose hepática, diabetes mellitus, hipogonadismo, cardiomiopatia, artrite, hiperpigmentação da pele e carcinoma hepatocelular.

* Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> acesso em 20/12/06.

O diagnóstico, antecedendo as lesões orgânicas, é fundamental para manter a expectativa de vida dos portadores. Os exames mais utilizados para triagem laboratorial de sobrecarga de ferro são a saturação de transferrina e a ferritina sérica.

Na hemocromatose associada ao *HFE*, a elevação da saturação é o marcador bioquímico mais precoce e freqüente, estando acima de 45% na maioria dos pacientes (SWINKELS et al., 2006).

O nível sérico de ferritina se correlaciona diretamente com as quantidades de ferro armazenadas no organismo. Porém, é menos sensível que a saturação para a detecção de doença e, além disso, o aumento de sua concentração está relacionado à outras patologias como: doenças inflamatórias, neoplasias e necrose hepatocelular (SWINKELS et al., 2006; SIAH, 2006). Entretanto, níveis séricos de ferritina acima de 200ng/ml e 300 ng/ml, em mulheres e homens, respectivamente, na ausência dessas patologias, são indicativos do aumento das reservas de ferro e necessita investigação (CAZZOLA et al., 2005; CAMASCHELLA, 2005).

A sobrecarga de ferro é bem conhecida em portadores de anemias crônicas que necessitam freqüentes transfusões sanguíneas. Entretanto, não é esperada nas anemias crônicas que não necessitem de terapia transfusional.

Em portadores de talassemia heterozigota têm sido observados níveis elevados de ferritina, alguns evoluindo com lesão e disfunção orgânica. A hemocromatose é uma doença de evolução lenta e assintomática por muitos anos. O reconhecimento de grupos de risco e fatores genéticos e/ou ambientais que

possam contribuir para sua manifestação é fundamental para o diagnóstico precoce e tratamento adequado.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência dos mutantes C282Y e H63D do gene *HFE* nos níveis de ferritina sérica em portadores de beta talassemia heterozigota.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil hematológico dos portadores de beta talassemia heterozigota, residentes em São Carlos e região.
- Avaliar a prevalência das mutações C282Y e H63D do gene *HFE*;
- Avaliar o perfil o metabolismo de ferro;
- Correlacionar as alterações no metabolismo de ferro com a presença ou não de mutações no *HFE*;
- Avaliar a influência dessas mutações na evolução clínica e laboratorial desses pacientes.
- Avaliar a influência dos parâmetros hematológicos nos valores da saturação de transferrina e da ferritina sérica.
- Avaliar a correlação entre a concentração de hemoglobina, o valor do VCM, a quantidade de A_2 e a contagem reticulocitária com os valores de saturação de transferrina e ferritina sérica.

3 Material e Método

3.1 Casuística

3.1.1 Amostra

A amostra utilizada na pesquisa foi recrutada a partir dos pacientes acompanhados no serviço de hematologia, localizado na cidade de São Carlos e, que tinham o diagnóstico prévio de beta talassemia menor. Os pacientes não foram selecionados e todos que compareceram a consulta médica entre março de 2005 e outubro de 2006 foram convidados a participar do estudo. Não houve distinção de gênero nem idade. Os critérios de inclusão foram: residência em São Carlos ou região e exames laboratoriais compatíveis com o diagnóstico de beta talassemia menor. Foram excluídos os portadores de processos inflamatórios ou neoplásicos e os que apresentaram relato do uso de ferro medicamentoso nos trinta dias que antecederam a coleta dos exames utilizados para avaliação do metabolismo do ferro. Dos 316 cadastrados, 166 consentiram em participar e, desses, 162 preencheram os critérios de inclusão.

O sangue periférico foi coletado sem determinação de horário e de jejum, por profissional qualificado e com material descartável. A confirmação da beta talassemia foi realizada no Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética de Doenças Hematológicas do IBILCE - UNESP. Os eritogramas, as contagens reticulocitárias, as análises do sangue periférico e os testes bioquímicos foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas Unilab de São Carlos.

O diagnóstico de beta talassemia heterozigota foi confirmada nos indivíduos que apresentavam concentração de hemoglobina acima de 9,0g/dl,

volume corpuscular médio inferior a 80 fL, quantificação da Hb A2 e fetal acima de 3,5% e 1,0%, respectivamente, e níveis de ferritina sérica acima de 20 ng/ml. Os pacientes com quadro laboratorial sugestivo de beta talassemia, porém com diminuição de ferritina, só foram incluídos se as alterações morfológicas dos eritrócitos persistiram após correção das reservas de ferro.

3.1.2 Aspectos Éticos

O projeto teve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), campus de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa com Humanos (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, Ministério de Saúde. De acordo com a resolução CNS 196/96, o recrutamento dos indivíduos envolvidos na pesquisa foi realizado pela pesquisadora que forneceu, aos participantes, explicação detalhada sobre a relevância e os objetivos do trabalho.

3.2 Metodologia

3.2.1 Confirmação do diagnóstico de beta talassemia minor

Eritrograma

Em todas as amostras foi realizado o eritrograma, para avaliação da hemoglobina e dos índices hematimétricos, utilizando o método automatizado no equipamento Pentra 120ABX. Os valores de referência dos parâmetros analisados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de referência para os parâmetros do eritrograma realizado no aparelho Pentra 120 e referendados pelo laboratório.

Parâmetros	Idade ≤ 12 anos	Idade > 12 anos	
		Mulheres	Homens
Glóbulos vermelhos ($10^6/\text{mm}^3$)	3600 – 5200	3700 – 5900	4300 – 5900
Hemoglobina (g/dL)	10,5 – 13,5	11,7 – 15,7	13,3 – 17,7
Hematócrito (%)	35,0 – 43,0	35,0 – 47,0	40,0 – 52,0
VCM (fL)	70,0 – 86,0	76,0 – 99,0	76,0 – 99,0
HBCM (pg)	27,0 – 33,0	27,0 – 33,0	27,0 – 33,0
CHCM (g/dL)	32,2 – 37,9	32,2 – 37,9	32,2 – 37,9
RDW (%)	11,0 – 15,0	11,0 – 15,0	11,0 – 15,0

Análise do sangue periférico

Para análise morfológica dos eritrócitos os esfregaços do sangue periférico foram corados pelo método May Giemsa (DACIE; LEWIS, 1985).

Contagem de reticulócitos

A contagem reticulocitária foi realizada pelo método do azul de crezil brilhante, segundo Dacie, 1985, com modificações.

Princípio:

O reticulócito é a última etapa imatura do eritrócito, e, normalmente permanece dois dias na medula óssea e um no sangue periférico antes de se

transformar na forma madura. Restos de RNA citoplasmático e organelas, como mitocôndrias e ribossomos, que se encontram dentro da célula, são corados pelo azul de cresil brilhante.

Procedimento:

Em um tubo de vidro foi colocado 100µl de sangue e 100µl do corante. A mistura foi incubada em banho Maria a 37°C por 20 minutos ou em temperatura ambiente por 60 minutos. Depois da retirada do banho foram preparados dois esfregaços. A visualização foi feita em objetiva de imersão. Foram contadas 500 hemácias em campos onde a distribuição era homogênea. O cálculo da porcentagem foi obtido multiplicando-se o número de reticulócitos encontrado por 100 e dividindo-se por 500. O número absoluto dos reticulócitos foi calculado multiplicando-se a porcentagem obtida pelo número total de glóbulos vermelhos e dividindo-se por 100. O valor de referência para o número absoluto de reticulócitos foi inferior a 120000/mm³.

Quantificação da Hb A₂ e fetal

A quantificação das Hb A₂ e fetal foi feita pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com o equipamento Variant (Bio Rad Laboratories) e Kit “beta thalassemia short”. Essa metodologia consiste na cromatografia de troca catiônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de embolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passa pela coluna detectando as alterações de absorvância a 415nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes

(EASTMAN et al., 1996). As mudanças na absorvância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorvância versus tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra ate o ápice do pico da hemoglobina. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma copia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Em um tubo foram misturados 5 μ L de sangue total com 1,0 ml de solução hemolisante, fornecida no kit de análise. Após a hemólise total, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento para realização dos procedimentos de leitura das amostras pré-programadas.

Interpretação:

A quantificação das diferentes frações de hemoglobina em cada amostra foi realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparados com os valores de calibração específicos, fornecidos pelo fabricante e emitidos em modelo próprio que inclui valores numéricos e perfil cromatográfico. Aos valores de HbA0 obtidos pelo HPLC foram incluídas as subfrações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas P2 e P3 respectivamente, pelo aparelho. Os valores normais de Hb A2, de 2,0 a 3,5% e os de Hb fetal, até 1%, foram previamente estabelecidos pelo fabricante e referendados pelo laboratório.

3.2.2 Avaliação do metabolismo do ferro

O metabolismo do ferro foi avaliado pelas dosagens do ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro (TIBC) e ferritina sérica. O ferro sérico foi obtido pela técnica enzimática de dois pontos, utilizando-se o Kit Lâminas Fe VITROS Chemistry (Ortho-Clinical Diagnostics Products Johnson & Johnson) e a ferritina pela tecnologia de quimioluminométrica direta, usando o sistema ADVIA Centaur[®]. A saturação de transferrina foi calculada dividindo-se o ferro sérico pela capacidade total de ligação do ferro e multiplicando-se por 100.

Os valores de referência do ferro sérico, da TIBC e da ferritina, fornecidos pelo fabricante e referendados pelo laboratório estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de referência dos testes utilizados para avaliação do metabolismo do ferro.

Testes	Homens	Mulheres
Ferro sérico (µg/dL)	37 – 170	37 – 170
Capacidade total de ligação do ferro (µg/dL)	250 – 450	250 – 450
Saturação de transferrina (%)	20 – 50	20 – 50
Ferritina (ng/mL)	22 – 322	10 – 291

3.2.3 Análise molecular para as mutações do gene *HFE*

Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico, segundo a técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol, descrita por Pena et al., 1991, com modificações.

PCR – RFLP

A pesquisa das mutações C282Y e H63D do gene *HFE* foi realizada pelo método PCR-RFLP, modificado de Lynas, 1997, seguindo protocolo estabelecido no laboratório.

Para a identificação da mutação C282Y foram utilizados os “primers sense” R 282 (5’ CTG AGG CAC TCC TCT CAA CC 3’) e o “anti-sense” L (5’ GGG TAT TTC CTT CCT CCA AC 3’) e para a identificação da mutação H63D foram utilizados os “primers sense” R 63 (5’ ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3’) e o “anti-sense” L (5’ ACA TGG TTA CCT GTT GC 3’).

Para amplificação, foram utilizados 5 µL de DNA numa reação de PCR contendo tampão de 1X (Invitrogen), 1,6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, uma unidade de *taq* polimerase (Invitrogen) e 0,25 µM de cada “primer”. Os produtos foram amplificados em termociclador I Cyclor (Bio-Rad) com desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 32 ciclos de 95°C por 45 segundos, acrescidos de 58°C, por 30 segundos e 72°C por 1 minuto com extensão final de 72°C por 5 minutos.

A digestão enzimática dos produtos amplificados foi obtida com a utilização das enzimas *Bcl I*, para a mutação H63D e, *RsaI* para a C282Y. As análises dos produtos de amplificação e de digestão para H63D foram realizadas em gel de agarose a 2%, em corrida de 80 volts por 30 minutos, corados com brometo de etídio 0,2%. As análises dos produtos de digestão para C282Y foram realizadas em gel de poliacrilamida, em corrida de 80 volts por 70 minutos, corados com solução de nitrato de prata (Figura 5).

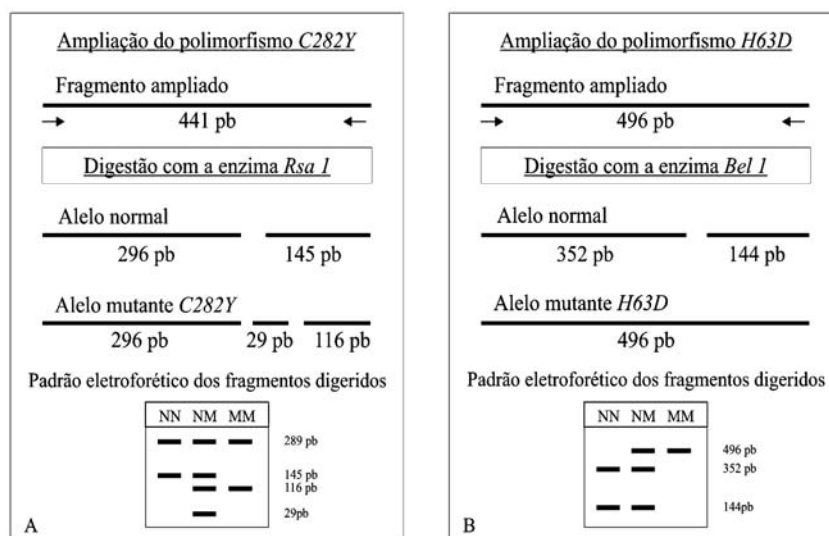


Figura 5. Representação esquemática dos produtos de amplificação e digestão dos polimorfismos C282Y e H63D.

3.2.4 Análise estatística dos dados

Foram comparados pelo teste *t-student* os resultados dos parâmetros hematológicos obtidos em crianças e adultos. Os valores entre os gêneros também foram analisados pelo mesmo teste estatístico. As correlações por idade e gênero, entre os parâmetros hematológicos (concentração de hemoglobina, Hb A₂, VCM e número de reticulócitos) e os valores de saturação de transferrina e a ferritina sérica foram analisadas pela correlação linear de Pearson. A existência de correlação, entre essas variáveis e os resultados dos exames de avaliação do metabolismo do ferro, foi considerada quando $r \geq 0,70$. Toda a análise estatística relacionada à saturação de transferrina foi feita pelo teste *t-student* e para a ferritina foi utilizado o teste Mann Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Casuística

Foram avaliados 162 portadores de beta talassemia heterozigota, caucasóides e residentes na cidade de São Carlos ou região. A idade dos indivíduos variou de 1 a 86 anos com média de 37 e desvio padrão de 21, a mediana foi de 33 anos, sendo 99 mulheres e 63 homens.

Para análise do perfil hematológico foram avaliados 154 indivíduos, pois do total, foram excluídos seis que apresentavam níveis de ferritina abaixo de 20 ng/ml e dois que evoluíram com poliglobulia de causa indeterminada. Esses indivíduos foram subdivididos de acordo com a idade, iguais ou abaixo de 12 anos e maiores de 12 anos e, nos adultos também de acordo com o gênero. Esse procedimento teve o objetivo de separar os indivíduos que, normalmente, têm valores hematológicos diferentes. Desses, 143 não tinham nenhuma das mutações estudadas no gene *HFE* ou eram heterozigotos para H63D e, seus resultados foram utilizados para análise da influência e da correlação das variáveis hematológicas nos valores da saturação da transferrina e da ferritina. A contagem de reticulócitos não foi realizada em três indivíduos. Para as análises estatísticas desses resultados, os indivíduos de cada faixa etária (abaixo da idade média e igual ou acima da idade média) e gênero, foram subdivididos em dois grupos, de acordo com os valores médios dos parâmetros analisados. A caracterização desse grupo está descrita na Tabela 4. A frequência das mutações do gene *HFE* e os parâmetros laboratoriais relacionados ao metabolismo de ferro foram analisados em todos os 162 indivíduos. Porém, em dois não foi possível dosar o ferro sérico e a capacidade total de ligação do ferro. Esse grupo também

foi dividido de acordo com a idade e o gênero. Sua caracterização está ilustrada na Tabela 5.

A evolução laboratorial dos pacientes com genótipo mutante e sem mutações e, que tinham acompanhamento médico de pelo menos um ano, também foi analisada.

Tabela 4. Caracterização da amostra utilizada para determinação do perfil hematológico.

Idade	Gênero	
	Feminino	Masculino
≤ 12 anos n = 21	12 (7,79)	9 (5,84%)
> 12 anos n = 133	82 (53,25%)	51 (33,12%)
Total n = 154	94 (61,04%)	60 (38,96%)

Tabela 5. Caracterização da amostra utilizada na avaliação do metabolismo do ferro.

Idade	Gênero	
	Feminino	Masculino
< 33 anos n = 80	46 (28,40%)	34 (20,99%)
≥ 33 anos n = 82	53 (32,71%)	29 (17,90%)
Total n = 162	99 (61,11)	63 (38,89%)

O perfil hematológico encontrado nos portadores de beta talassemia heterozigota está resumido na Tabela 6. No grupo infantil a contagem de glóbulos vermelhos variou de 5.280.000/mm³ a 6.510.000/mm³; os níveis de hemoglobina de 9,6 g/dL a 12,3 g/dL e a porcentagem do hematócrito de 30,0% a 38,0%. Nas mulheres os valores de glóbulos vermelhos variaram de 4.620.000/mm³ a 6.350.000/mm³; a concentração de hemoglobina de 9,1 g/dL a 13,3 g/dL e o hematócrito de 27,4% a 40,2%. Nos homens variaram de 4.240.000/mm³ a 7.300.000/mm³; de 9,1 g/dL a 16 g/dL e de 28,9% a 49,0%, respectivamente. As médias da contagem de glóbulos vermelhos, da concentração da hemoglobina e da porcentagem de hematócrito foram superiores em adultos do que em crianças ($p=0,024$, $p=0,013$ e $p=0,000$, respectivamente) e, estatisticamente maiores em homens do que em mulheres ($p=0,000$) nos três parâmetros analisados.

Nas crianças os valores do VCM variaram de 53,6 fL a 63,9 fL; do HBCM de 17,5 pg a 20,4 pg, do CHCM de 30,0g/dL a 33,8 g/dL e do RDW de 12,7% a 19,0%. Nas mulheres a variação foi de 55,8 fL a 71,0 fL para o VCM; de 17,5pg a 22,9 pg para o HBCM; de 29,3 g/dL a 34,5 g/dL para o CHCM e de 12,7% a 20,9% para o RDW. Nos homens os valores de VCM, HBCM, CHCM e RDW variaram de 55,2 fL a 71,0 fL, de 17,2 pg a 23,0 pg, de 29,1 g/dL a 35,0 g/dL e de 13,7% a 19,3%, respectivamente. Os valores de VCM e de HBCM também foram superiores nos adultos ($p=0,000$), porém não foram diferentes entre homens e mulheres ($p=0,773$).

Por outro lado, a média da quantidade de Hb A₂ foi maior em crianças ($p=0,008$), não sendo diferente entre os gêneros ($p=0,959$). Em crianças variou de

5,0% a 8,2%, nas mulheres de 3,0% a 8,7% e nos homens de 2,2% a 8,6%. Não houve diferença estatisticamente significativa nas médias dos valores do CHCM, do RDW, do número de reticulócitos e da porcentagem de Hb fetal entre os grupos avaliados.

Tabela 6. Parâmetros hematológicos obtidos nos portadores de beta talassemia heterozigota.

Parâmetros	Idade ≤ 12 anos n = 21	Idade > 12 anos n = 133	
	$\bar{X} \pm ep$	Feminino $\bar{X} \pm ep$	Masculino $\bar{X} \pm ep$
Glóbulos vermelhos ($10^6/mm^3$)	5874,3 ± 77,2	5451,0 ± 45,1	6036,9 ± 86,3
Hemoglobina (g/dL)	11,10 ± 0,16	11,01 ± 0,09	12,39 ± 0,17
Hematócrito (%)	34,18 ± 0,48	34,15 ± 0,29	38,13 ± 0,52
VCM (fL)	58,16 ± 0,54	62,66 ± 0,38	62,85 ± 0,52
HBCM (pg)	18,85 ± 0,16	20,12 ± 0,12	20,37 ± 0,17
CHCM (g/dL)	32,44 ± 0,19	32,20 ± 0,11	32,52 ± 0,16
RDW (%)	16,32 ± 0,25	16,04 ± 0,16	16,12 ± 0,16
Reticulócitos (mm^3)	138476 ± 13367	146477 ± 5428	140506 ± 9751
Hb A ₂ (%)	6,10 ± 0,15	5,63 ± 0,08	5,62 ± 0,15
Hb Fetal (%)	2,26 ± 0,43	1,95 ± 0,21	1,75 ± 0,34

4.2 Análise molecular das mutações C282Y e H63D do gene *HFE*

Foram encontrados 36 indivíduos heterozigotos para a mutação H63D (22,22%) e sete (4,32%) para C282Y. Não foi observado nenhum caso de homozigose para C282Y. O restante dos resultados está demonstrado na Tabela 7. A figura 5 ilustra um gel de agarose a 2 % evidenciando três homozigotos e um heterozigoto para H63D. Na Figura 6, um gel de poliacrilamida mostrando um heterozigoto para a mutação C282Y e várias outras amostras sem a mutação.

Tabela 7. Freqüência das mutações do gene *HFE* nos portadores de beta talassemia heterozigota.

Mutações n = 162	- / -	+ / -	+ / +	C282Y / H63D
H63D	121 (74,70%)	36 (22,22%)	3 (1,86%)	2 (1,23%)
C282Y	153 (94,44%)	7 (4,32%)	0	

- / - ausência de mutação

+ / - mutação em heterozigose

+ / + mutação em homozigose

C282Y / H63D duplo heterozigoto

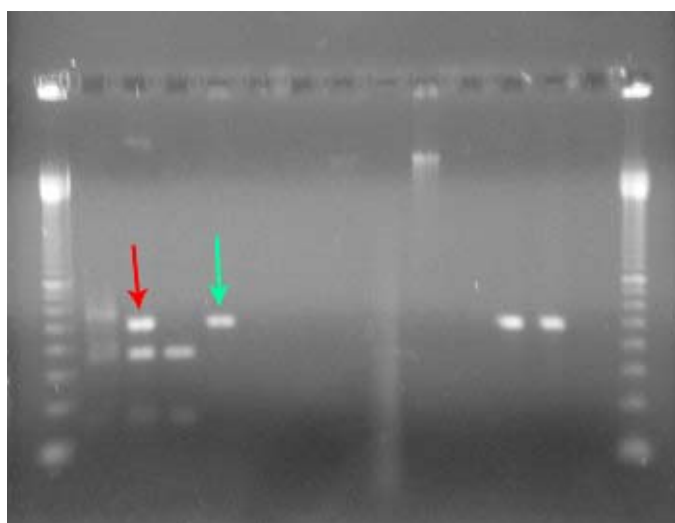


Figura 6. Gel de agarose (2%) mostrando heterozigose (seta vermelha) e homozigose (seta verde) para H63D e, entre ambos, um indivíduo sem a mutação.

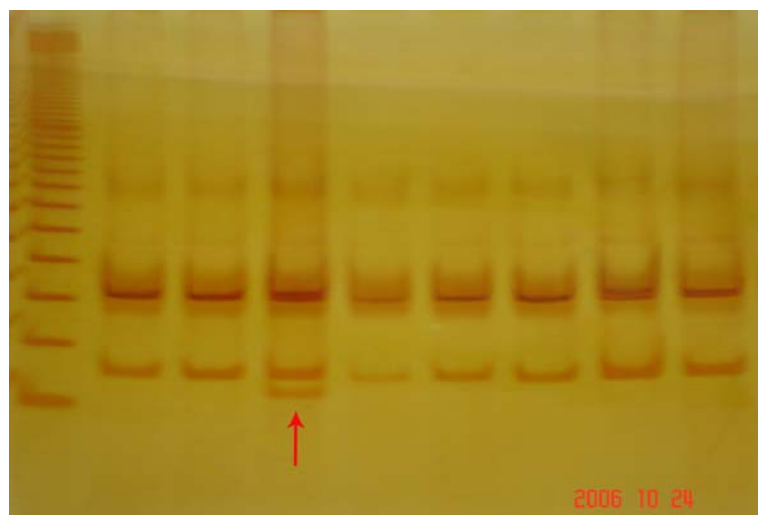


Figura 7. Gel de poliacrilamida mostrando um indivíduo heterozigoto para C282Y.

4.3 Avaliação do metabolismo do ferro

A concentração do ferro sérico variou de 25 μ g/dL a 265 μ g/dL e foi mais elevada em homens com 33 anos ou mais. A saturação de transferrina variou de 6% a 70,9%, sendo maior, também nesse grupo. Os valores de ferritina observados variaram de 5,1 ng/mL a 2982,0 ng/mL. Foram menores em mulheres com menos de 33 anos de idade e maiores em homens com 33 anos ou mais. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 8.

Foram detectados seis indivíduos com valores de ferritina inferiores a 20 ng/mL e 36 com valores acima de 200 ng/mL em mulheres e de 300 ng/mL em homens. Desses, 19 eram homens e 17 mulheres. Dos 29 homens com 33 anos ou mais, 13 (44,83%) tinham ferritina acima de 300 ng/mL e das mulheres, 28,30% apresentaram valores acima de 200 ng/mL (Tabela 9).

A porcentagem da saturação da transferrina foi superior a 45% em seis, sua correlação com os valores de ferritina está ilustrada na Figura 8.

Tabela 8. Avaliação do metabolismo do ferro nos portadores de beta talassemia heterozigota.

Parâmetros	Idade < 33 anos n = 80		Idade ≥ 33 anos n = 82	
	Feminino n = 46	Masculino n = 34	Feminino n = 53	Masculino n = 29
	$\bar{X} \pm ep$	$\bar{X} \pm ep$	$\bar{X} \pm ep$	$\bar{X} \pm ep$
Ferro (µg/dL)	98,0 ± 5,6	104,8 ± 8,1	82,7 ± 4,1	112,2 ± 7,1
CTL (µg/dL)	351,4 ± 10,3	324,4 ± 4,9	341,2 ± 6,7	332,8 ± 10,6
Saturação de transferrina (%)	28,3 ± 1,7	31,9 ± 2,3	24,7 ± 1,4	34,0 ± 1,9
Ferritina (ng/mL)	73,2 ± 9,3	213,6 ± 56,8	218,3 ± 57,0	386,4 ± 59,8

Tabela 9. Distribuição da amostragem de acordo com os valores de ferritina.

Parâmetros	Idade < 33 anos n = 80		Idade ≥ 33anos n = 82	
	Feminino n = 46 (28,39%)	Masculino n = 34 (20,99%)	Feminino n = 53 (32,72%)	Masculino n = 29 (17,90%)
	Ferritina < 20 ng/mL	2 (4,35%)	1 (2,94%)	3 (5,66%)
Ferritina ≥20 ng/mL e ≤ 200 ou ≤ 300 ng/mL	42 (91,30%)	27 (79,41%)	35 (66,04%)	16 (55,17%)
Ferritina > 200 ng/mL em mulheres e > 300 ng/mL em homens	2 (4,35%)	6 (17,65%)	15 (28,30%)	13 (44,83%)

Ferritina acima de 500 ng/mL foi detectada em 15 indivíduos (9,26%), 12 homens e três mulheres, com idade de 18 a 79 anos, com média de 50 anos e desvio padrão de 17 (Tabela 10). Valores superiores a 1.000 ng/mL foram observados em cinco (3,1%), quatro homens e uma mulher, com idade variando de 18 a 73 anos.

Tabela 10. Características gerais e dados bioquímicos dos indivíduos com valores de ferritina acima de 500 ng/mL.

Pacientes	Gênero	Idade (anos)	Ferritina (ng/mL)	Saturação da transferrina (%)	Mutação	Tempo de acompanhamento (anos)
JOM	M	73	1.021	26,8	Ausente	3
AA	M	53	1.010	44,0	Ausente	< 1
AAB	M	32	959	39,5	Ausente	5
JEBT	M	53	613	37,7	Ausente	1
JBO	M	40	576	26,9	Ausente	4
CKM	M	54	623	30,5	Ausente	2
JBM	M	79	882	44,8	C282Y/H63D	< 1
MAFMF	F	50	642	25,8	Ausente	< 1
MAS	M	26	706	65,4	Ausente	< 1
HV	M	56	1.192	21,8	Ausente	< 1
JRG	M	51	606	62,9	Ausente	< 1
EPR	F	64	2982	67,8	C282Y +/-	3
CRG	M	18	1720	70,9	Ausente	3
ADO	M	40	516	49,1	Ausente	< 1
CASF	F	59	657	35,8	H63D +/+	4

Dos indivíduos com ferritina maior que 500 ng/mL apenas cinco apresentavam saturação de transferrina acima de 45%, sendo que dois desses tinham ferritina acima de 1000 ng/mL e saturação de 67,8 % e 70,9 %.

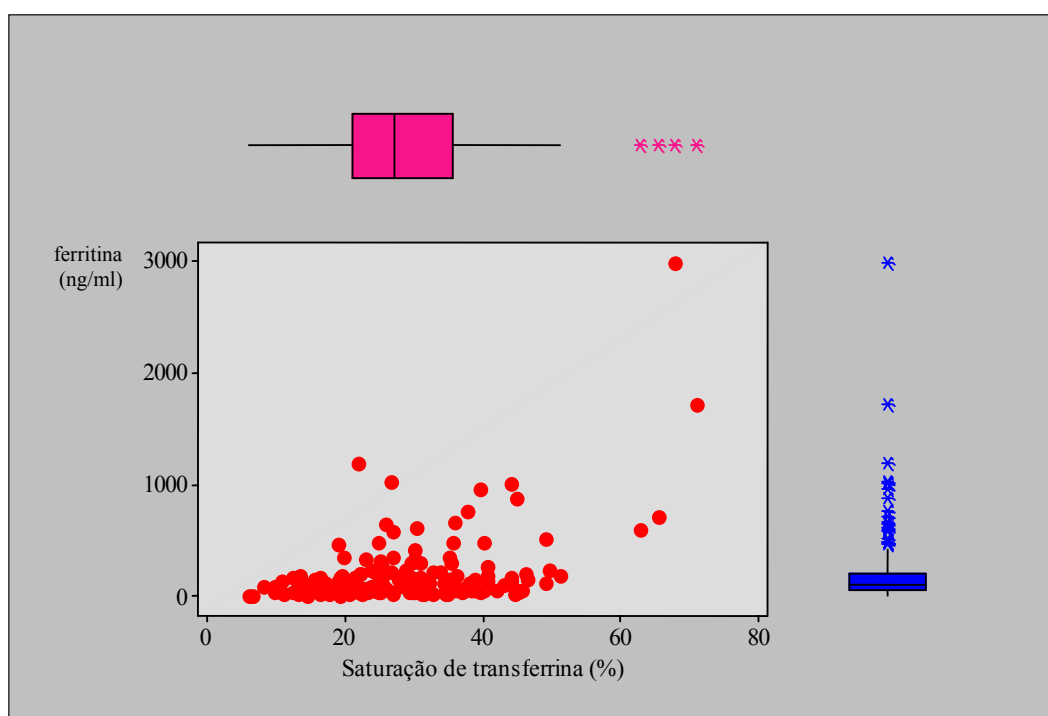


Figura 8. Relação entre a saturação da transferrina e a concentração de ferritina em 36 indivíduos com valores de ferritina acima de 200 ng/mL em mulheres e de 300 ng/L em homens. Representado no gráfico rosa os valores da saturação de transferrina e no azul os valores da ferritina.

As mutações no gene *HFE* foram encontradas em todos os subgrupos avaliados, ou seja, com ferritina normal, ferritina < 20 ng/mL, ferritina acima de 200 ng/mL em mulheres e acima de 300 ng/mL em homens, em diferentes combinações genotípicas (Tabela 11).

Tabela 11. Frequência das mutações do gene *HFE* nos portadores de beta talassemia heterozigota separados pelos valores de ferritina.

Mutação	Ferritina < 20 ng/mL n = 6	Ferritina normal n = 120	Ferritina > 200 ng/mL em mulheres n = 17
			Ferritina > 300ng/mL em homens n = 19
H63D - / -	3 (50%)	88 (73,33%)	30 (83,33%)
H63D + / -	3 (50%)	29 (24,17%)	4 (11,11%)
H63D + / +	0	2 (1,67%)	1 (2,78%)
C282Y - / -	5 (83,33%)	116 (6,66%)	32 (88,89%)
C282Y + / -	1 (6,37%)	3 (2,50%)	3 (8,33%)
C282Y / H63D	0	1 (0,83%)	1 (2,78%)

4.4 Correlação entre metabolismo do ferro e mutações no gene *HFE*

Os valores médios da saturação de transferrina, nos diferentes grupos analisados, variaram de $21,8\% \pm 3,6$ a $34,0\% \pm 5,0$ nos heterozigotos para H63D e de $23,9\% \pm 1,2$ a $33,9\% \pm 2,3$ nos sem a mutação. As medianas da concentração de ferritina variaram de $57,7 \text{ ng/mL} \pm 14,3$ a $249,8 \text{ ng/mL} \pm 40,4$ e de $78,0 \text{ ng/mL} \pm 11,8$ a $408,4 \text{ ng/mL} \pm 72,4$, nos grupos com e sem a mutação, respectivamente. Não houve diferença significativa nos resultados desses dois grupos (Tabelas 12 e 13). Entretanto, os valores da saturação de transferrina foram estatisticamente maiores em homens do que em mulheres, na faixa etária de 33 anos ou mais e, entre as mulheres, foi maior nas com menos de 33 anos (Tabelas

14 e 15). O valor mediano da ferritina no gênero feminino foi de 55,5 ng/mL em mulheres com menos de 33 anos e de 116,1 ng/mL nas com idade igual ou maior que 33 anos ($p= 0,001$). Nos homens com menos de 33 anos foi de 136 ng/mL e nos com 33 anos ou mais de 251,0 ng/mL ($p = 0,001$). Nos indivíduos com menos de 33 anos a diferença entre a mediana do gênero feminino e do masculino também foi estatisticamente significativa ($p= 0,002$). Portanto, os valores de ferritina foram estatisticamente diferentes entre as idades e os gêneros (Tabelas 16 e 17). A influência desses fatores nos valores da ferritina está ilustrada na Figura 9.

Tabela 12. Comparação entre os valores da saturação de transferrina e a presença ou ausência da mutação H63D em 148 indivíduos.

Gênero	Idade	H63D	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	- / - n = 33	26,9 ± 1,9	24,8	0,477
		+ / - n = 10	30,1 ± 4,0	34,5	
	≥ 33 anos	- / - n = 37	23,9 ± 1,2	23,0	0,599
		+ / - n = 10	21,8 ± 3,6	20,8	
Masculino	< 33 anos	- / - n = 21	32,5 ± 3,3	30,0	0,742
		+ / - n = 11	31,0 ± 3,1	30,9	
	≥ 33 anos	- / - n = 22	33,9 ± 2,3	30,9	0,990
		+ / - n = 4	34,0 ± 5,0	37,9	

* teste t-student

Tabela 13. Comparação entre os valores de ferritina e a presença ou ausência da mutação H63D em 150 indivíduos.

Gênero	Idade	H63D	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	- / - n = 33	78,0 ± 11,8	58,0	0,189
		+ / - n = 11	57,7 ± 14,3	38,30	
	≥ 33 anos	- / - n = 37	169,1 ± 24,6	116,1	0,706
		+ / - n = 10	121,9 ± 26,8	131,90	
Masculino	< 33 anos	- / - n = 22	273,8 ± 84,8	146,0	0,303
		+ / - n = 11	111,1 ± 22,9	99,7	
	≥ 33 anos	- / - n = 22	408,4 ± 72,4	256,5	0,749
		+ / - n = 4	249,8 ± 40,4	228,0	

* teste de Mann Whitney

Tabela 14. Avaliação da saturação de transferrina de acordo com a idade em 148 indivíduos.

Gênero	Idade	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos n = 43	27,6 ± 1,7	26,9	0,046
	≥ 33 anos n = 47	23,5 ± 1,2	22,9	
Masculino	< 33 anos n = 32	32,0 ± 2,4	30,1	0,551
	≥ 33 anos n = 26	33,9 ± 2,1	33,2	

* teste t-student

Tabela 15. Avaliação da saturação de transferrina de acordo com o gênero em 148 indivíduos.

Idade	Gênero	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Idade < 33anos	Feminino n = 43	27,6 ± 1,7	26,9	0,139
	Masculino n = 32	32,0 ± 2,4	30,1	
Idade ≥ 33 anos	Feminino n = 47	23,5 ± 1,2	22,9	0,002
	Masculino n = 26	33,9 ± 2,1	33,2	

* teste t-student

Tabela 16. Avaliação da ferritina sérica de acordo com a idade em 150 indivíduos.

Gênero	Idade	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos n = 44	72,9 ± 9,6	55,5	0,001
	≥ 33 anos n = 47	159,0 ± 20,3	116,1	
Masculino	< 33anos n = 33	219,6 ± 58,2	136,0	0,001
	≥ 33nos n = 26	384,0 ± 62,4	251,0	

* teste de Mann Whitney

Tabela 17. Avaliação da ferritina sérica de acordo com o gênero em 150 indivíduos.

Idade	Gênero	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Idade < 33anos	Feminino n = 44	72,9 ± 9,6	55,5	0,002
	Masculino n = 33	219,6 ± 58,2	136,0	
Idade ≥ 33 anos	Feminino n = 47	159,0 ± 20,3	116,1	0,000
	Masculino n = 26	384,0 ± 62,4	251,0	

* teste de Mann Whitney

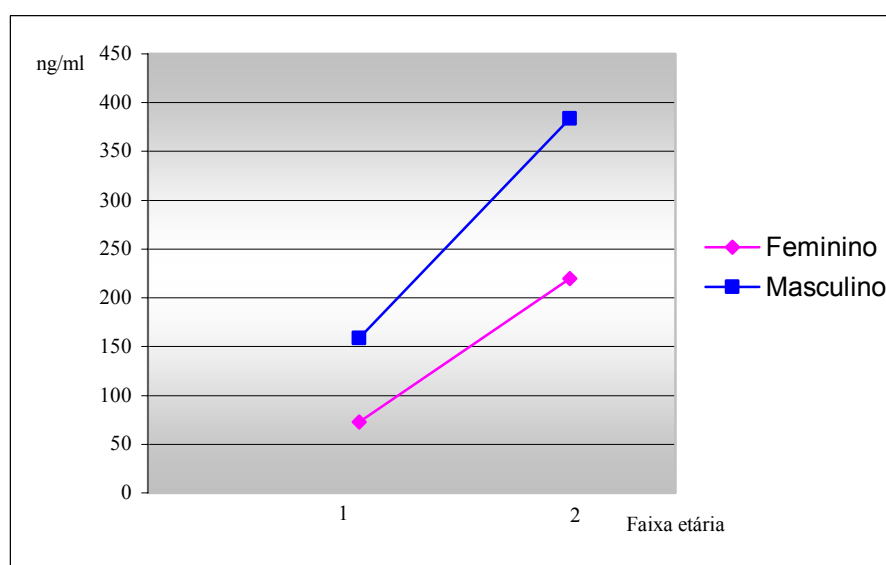


Figura 9. Demonstração gráfica da Influência da idade e do gênero na concentração da ferritina.

Não foi possível, devido ao pequeno número de amostras encontradas em cada um dos grupos, aplicar testes estatísticos para avaliar a influência da mutação C282Y, da homozigose para H63D e da dupla heterozigose.

A idade dos indivíduos heterozigotos para C282Y variou de 6 a 64 anos, sendo quatro femininos e três masculinos. Os valores de ferritina, nesse grupo, foram extremamente heterogêneos. Dois indivíduos do gênero feminino de 53 anos apresentaram níveis de ferritina extremamente diferentes, um 84 ng/mL e o outro 223 ng/ml. O mesmo ocorreu em dois indivíduos do gênero masculino de 54 anos (valores de ferritina de 38ng/mL e 303 ng/mL). Nesse grupo, uma mulher de 64 anos apresentou valores de ferritina e de saturação da transferrina compatíveis com hemocromatose. As características gerais e laboratoriais desses indivíduos estão descritas nas Tabelas 18.

A mesma heterogeneidade foi observada nos três pacientes com homozigose para a mutação H63D e nos dois com dupla heterozigose (Tabela 19).

Tabela 18. Características bioquímicas dos sete indivíduos com genótipo C282Y +/-.

Genótipo	C282Y +/-						
	6	27	53	53	54	54	64
Idade (anos)	6	27	53	53	54	54	64
Gênero	M	F	F	F	M	M	F
Saturação da transferrina (%)	27	38,1	24,4	24,3	35,5	23,3	67,8
Ferritina (ng/ml)	16	121	223	84	303	38	2982
Tempo de acompanhamento (anos)	3	2	5	5	< 1	2	3

Tabela 19. Características bioquímicas de três indivíduos com genótipo H63D + / + e dois com dupla heterozigose C282Y/H63D.

Genótipo		H63D + / +		C282Y/H63D	
Idade (anos)	22	49	59	83	79
Gênero	F	F	F	F	M
Saturação de transferrina (%)	45,20	34,80	35,80	19,80	44,80
Ferritina (ng/mL)	38	29	657	121	882
Tempo de acompanhamento (anos)	5	1	4	4	0

Para análise do efeito da concentração de hemoglobina, do VCM, da quantidade de Hb A₂ e do número de reticulócitos, foram utilizados apenas os 143 indivíduos que eram heterozigotos para H63D ou não apresentavam quaisquer das mutações estudadas. Para análise estatística, as amostras foram separadas de acordo com o gênero, a faixa etária e o valor médio do parâmetro analisado, obtido do estudo descritivo dos resultados utilizados para determinar o perfil hematológico desses indivíduos.

Os resultados da saturação da transferrina não foram influenciados pela concentração de hemoglobina, pelo VCM e pela contagem reticulocitária (Tabelas 20, 21, 22). Entretanto, a saturação foi maior em mulheres com 33 anos ou mais que tinham maiores quantidades de Hb A₂ (p= 0,048) (Tabela 23).

A mediana da concentração de ferritina foi maior em homens com 33 anos ou mais e que tinham contagens de reticulócitos acima de $143000/\text{mm}^3$ ($p= 0,005$) (Tabela 26). Para os outros parâmetros hematológicos não houve diferença estatisticamente significativa (Tabelas 24, 25 e 27).

Tabela 20. Influência dos níveis de hemoglobina na saturação de transferrina em 141 portadores de beta talassemia heterozigota.

Gênero	Idade	Hemoglobina (g/dl)	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	< 11,50 (n=29)	$27,2 \pm 2,0$	26,0	0,283
		$\geq 11,50$ (n=12)	$31,2 \pm 3,1$	33,6	
	≥ 33 anos	< 11,50 (n=30)	$24,6 \pm 1,4$	23,0	0,629
		$\geq 11,50$ (n=14)	$23,4 \pm 2,1$	24,2	
Masculino	< 33 anos	< 11,50 (n=10)	$27,5 \pm 3,1$	29,1	0,143
		< 11,50 (n=22)	$34,1 \pm 3,1$	30,9	
	≥ 33 anos	< 11,50 (n=4)	$33,7 \pm 3,9$	31,9	0,856
		< 11,50 (n=20)	$34,5 \pm 2,4$	33,2	

* teste t-student

Tabela 21. Influência dos valores de VCM na saturação de transferrina em 141 portadores de beta talassemia heterozigota.

Gênero	Idade	VCM (fL)	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	< 62 fL (n=28)	27,5 ± 2,0	26,5	0,474
		≥ 62 fL (n=13)	30,2 ± 3,2	30,7	
	≥ 33anos	< 62 fL (n=12)	22,6 ± 1,8	22,2	0,363
		≥ 62 fL (n=32)	24,8 ± 1,4	24,2	
Masculino	< 33 anos	< 62 fL (n=23)	29,8 ± 2,7	28,4	0,164
		≥ 62 fL (n=9)	37,7 ± 4,7	38,3	
	≥ 33anos	< 62 fL (n=4)	26,8 ± 5,0	23,7	0,173
		≥ 62 fL (n=20)	35,9 ± 2,2	35,1	

* teste t-student

Tabela 22. Influência do número de reticulócitos na saturação da transferrina em 140 portadores de beta talassemia heterozigota.

Gênero	Idade	Reticulócitos (mm ³)	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	< 143.000 (n=22)	28,6 ± 2,3	27,9	0,894
		≥ 143.000 (n=19)	28,1 ± 2,5	27,0	
	≥ 33anos	< 143.000 (n=26)	24,3 ± 1,5	24,6	0,719
		≥ 143.000 (n=17)	23,4 ± 1,9	22,3	
Masculino	< 33 anos	< 143.000 (n=22)	28,2 ± 2,1	28,0	0,056
		≥ 143.000 (n=10)	40,45 ± 5,4	35,2	
	≥ 33anos	< 143.000 (n=14)	32,9 ± 2,1	33,2	0,476
		≥ 143.000 (n=11)	36,4 ± 4,2	34,1	

* teste t-student

Tabela 23. Influência da quantidade de Hb A₂ na saturação de transferrina em 141 portadores de beta talassemia heterozigota.

Gênero	Idade	A2 (%)	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	< 5,7 (n=21)	31,0 ± 1,9	30,7	0,107
		≥ 5,7 (n=20)	25,6 ± 2,7	23,5	
	≥ 33anos	< 5,7 (n=19)	21,6 ± 1,6	22,3	0,048
		≥ 5,7 (n=25)	26,2 ± 1,5	24,9	
Masculino	< 33 anos	< 5,7 (n=11)	35,4 ± 4,1	31,8	0,313
		≥ 5,7 (n=21)	30,2 ± 2,9	29,8	
	≥ 33anos	< 5,7 (n=13)	31,3 ± 2,0	30,5	0,133
		≥ 5,7 (n=11)	38,0 ± 3,7	37,7	

* teste t-student

Tabela 24. Influência dos níveis de hemoglobina na ferritina sérica em 143 portadores de beta talassemia heterozigota.

Gênero	Idade	Hemoglobina (g/dl)	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	< 11,50 (n=30)	83,2 ± 12,8	58,0	0,221
		≥ 11,50 (n=12)	57,6 ± 11,3	42,6	
	≥ 33anos	< 11,50 (n=30)	177,9 ± 24,4	139,5	0,457
		≥ 11,50 (n=14)	150,4 ± 40,0	119,7	
Masculino	< 33 anos	< 11,50 (n=10)	111,2 ± 36,5	60,0	0,132
		< 11,50 (n=23)	266,8 ± 80,6	150,0	
	≥ 33anos	< 11,50 (n=4)	495,0 ± 194,0	406,5	0,727
		< 11,50 (n=20)	390,1 ± 69,9	270,5	

* teste Mann Whitney

Tabela 25. Influência dos valores de VCM na ferritina sérica em 143 portadores de beta talassemia heterozigota.

Gênero	Idade	VCM (fL)	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	< 62 fL (n=29)	73,2 ± 12,1	57,8	0,634
		≥ 62 fL (n=13)	82,0 ± 17,1	54,3	
	≥ 33anos	< 62 fL (n=12)	138,2 ± 24,9	120,0	0,654
		≥ 62 fL (n=32)	180,7 ± 26,9	127,0	
Masculino	< 33 anos	< 62 fL (n=24)	218,9 ± 76,8	81,4	0,120
		≥ 62 fL (n=9)	221,5 ± 66,5	150,0	
	≥ 33anos	< 62 fL (n=4)	264,5 ± 70,7	228,0	0,416
		≥ 62 fL (n=20)	436,2 ± 75,9	292,5	

* teste Mann Whitney

Tabela 26. Influência do número de reticulócitos na ferritina sérica em 140 portadores de beta talassemia heterozigota.

Gênero	Idade	Reticulócitos (mm ³)	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	< 143.000 (n=22)	71,8 ± 8,5	61,0	0,574
		≥ 143.000 (n=19)	83,5 ± 19,3	54,0	
	≥ 33anos	< 143.000 (n=26)	146,6 ± 20,5	119,7	0,637
		≥ 143.000 (n=17)	184,7 ± 39,4	134,0	
Masculino	< 33 anos	< 143.000 (n=22)	116,3 ± 17,3	108,4	0,051
		≥ 143.000 (n=10)	465,0 ± 169,0	268,1	
	≥ 33anos	< 143.000 (n=14)	273,7 ± 67,1	189,5	0,005
		≥ 143.000 (n=10)	595,0 ± 101,0	561,0	

* teste Mann Whitney

Tabela 27. Influência da quantidade de Hb A₂ na ferritina sérica em 143 portadores de beta talassemia heterozigota.

Gênero	Idade	A2 (%)	$\bar{X} \pm ep$	Mediana	p*
Feminino	< 33 anos	< 5,7 (n=22)	81,3 ± 15,6	55,5	0,950
		≥ 5,7 (n=20)	69,9 ± 11,6	58,0	
	≥ 33anos	< 5,7 (n=19)	126,1 ± 23,6	96,0	0,051
		≥ 5,7 (n=25)	201,8 ± 30,7	150,0	
Masculino	< 33 anos	< 5,7 (n=12)	272,0 ± 134,0	146,0	0,489
		≥ 5,7 (n=21)	189,9 ± 52,2	117,0	
	≥ 33anos	< 5,7 (n=13)	425,7 ± 96,5	309,0	0,728
		≥ 5,7 (n=11)	386,2 ± 89,6	210,0	

*Teste Mann Whitney

O estudo não demonstrou correlação significativa entre as concentrações de hemoglobina e os valores de saturação de transferrina, sendo que o fator de correlação nos diferentes grupos variou de $r = -0,045$ a $r = 0,371$ (Figuras 10, 11,12 e 13). O mesmo foi observado entre a concentração de hemoglobina e os níveis de ferritina sérica (r de $-0,195$ a $0,277$) (Figuras 14, 15, 16 e 17).

O VCM também não se correlacionou com os valores de ferritina (Figuras 22, 23, 24 e 25), entretanto em homens com 33 anos ou mais, apresentou uma fraca correlação com a saturação de transferrina ($r = 0,432$) (Figuras 18, 19, 20 e 21).

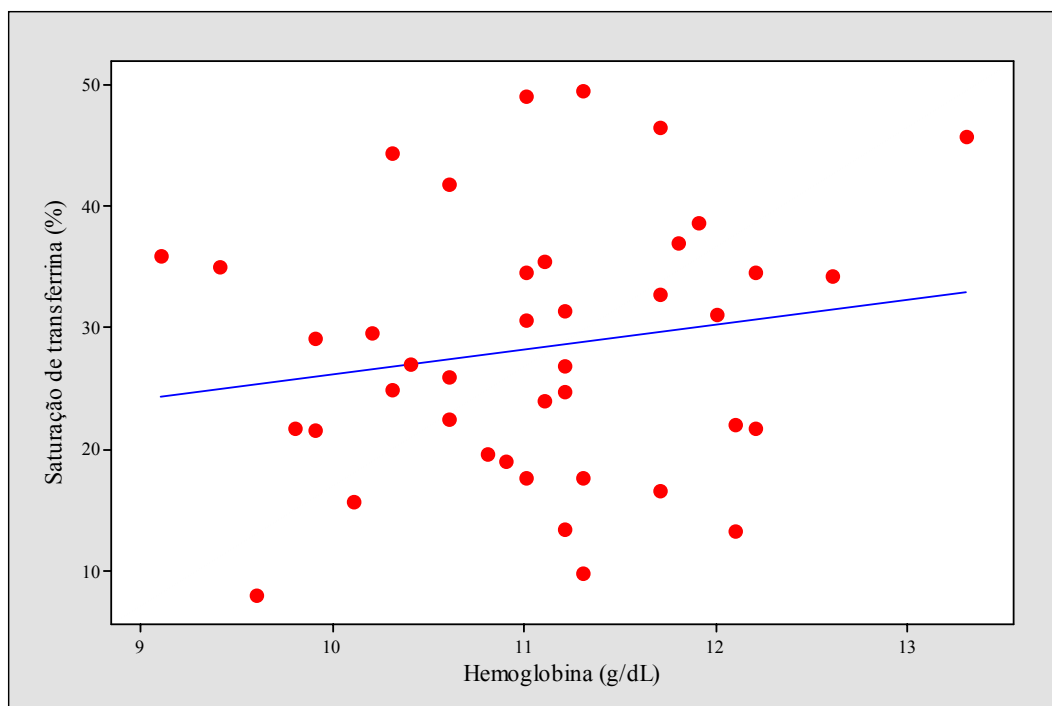


Figura 10. Correlação entre a hemoglobina e a saturação de transferrina em mulheres com menos de 33 anos ($r = 0,173$).

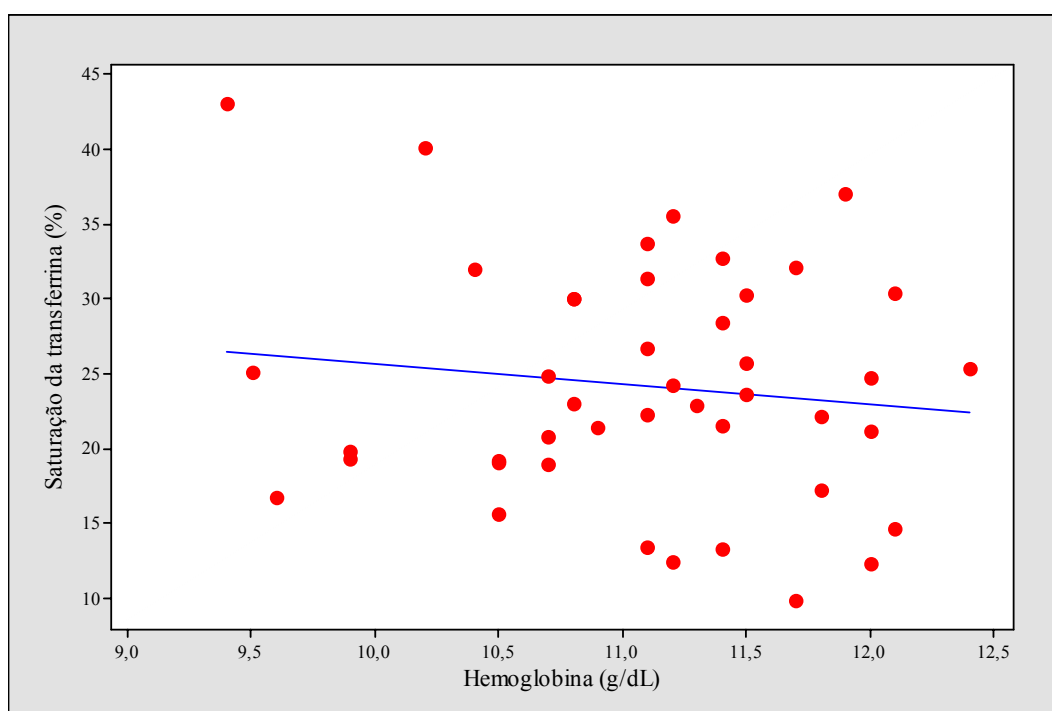


Figura 11. Correlação entre a hemoglobina e a saturação de transferrina em mulheres com 33 anos ou mais ($r = - 0,129$).

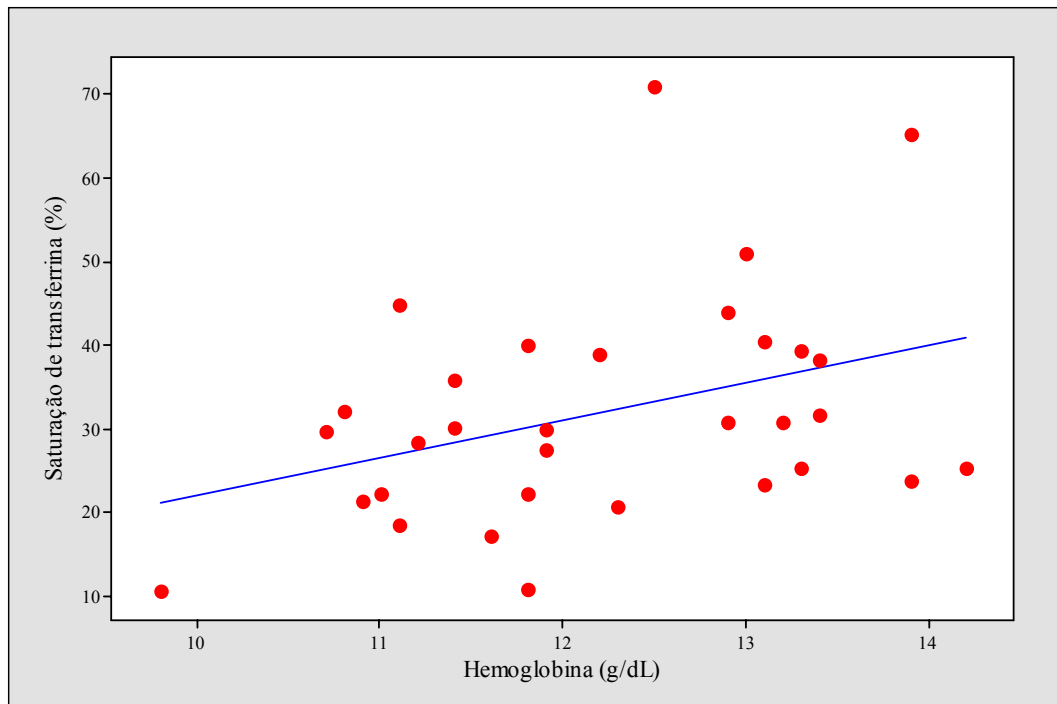


Figura 12. Correlação entre a hemoglobina e a saturação de transferrina em homens com menos de 33 anos ($r = 0,371$).

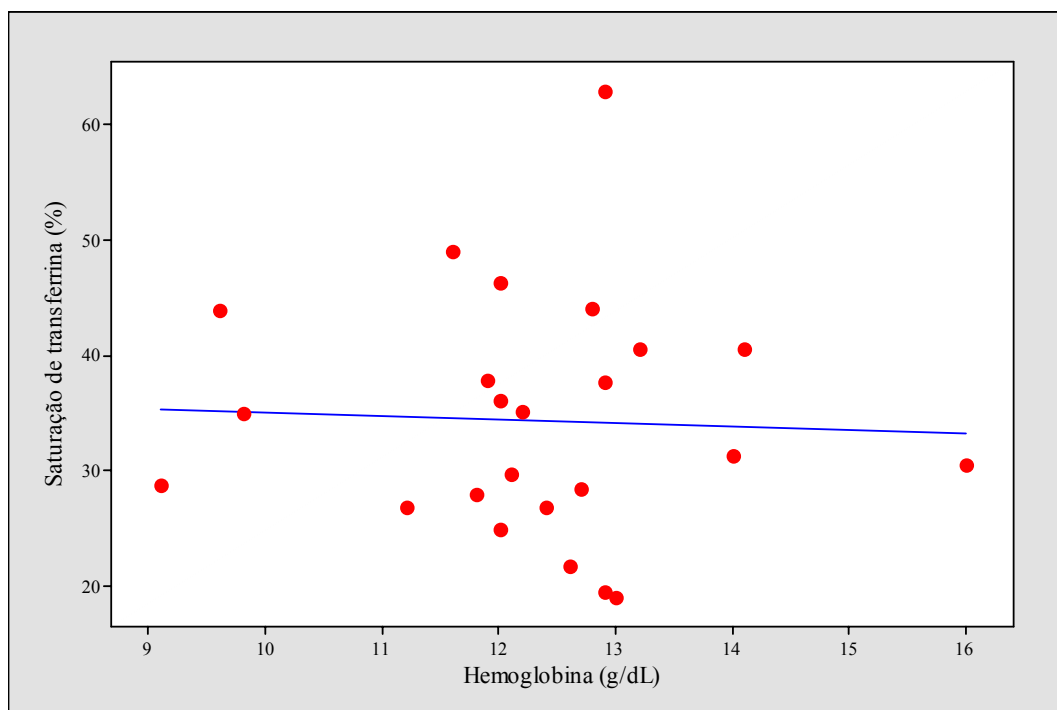


Figura 13. Correlação entre a hemoglobina e a saturação de transferrina em homens com 33 anos ou mais ($r = -0,045$).

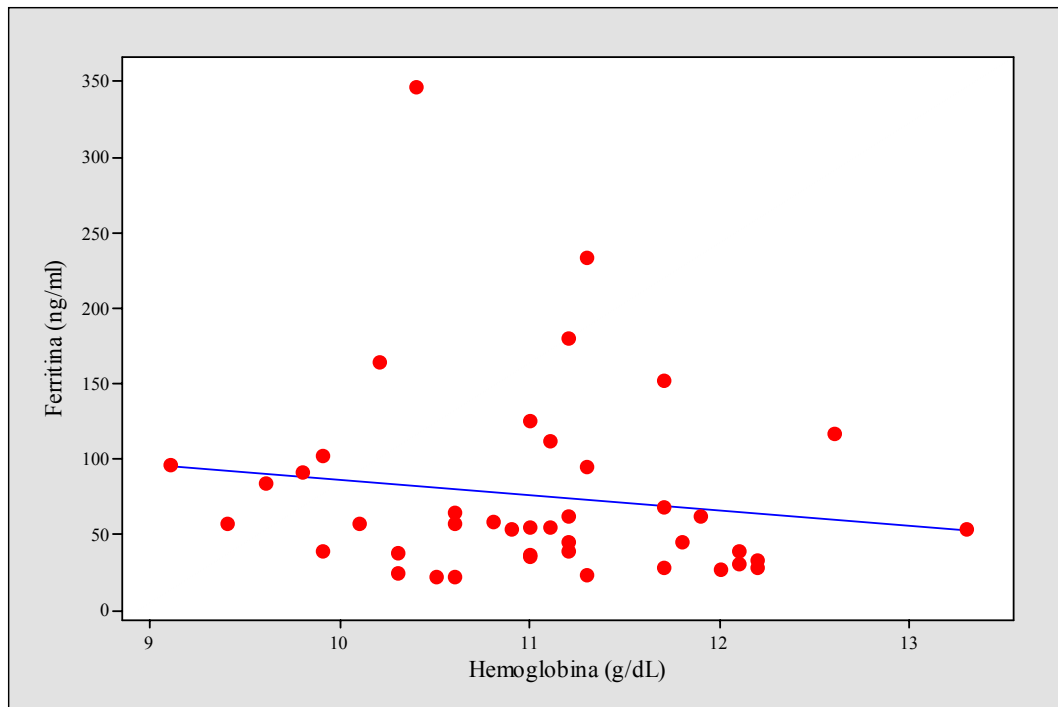


Figura 14. Correlação entre a hemoglobina e a ferritina sérica em mulheres com menos de 33 anos ($r = -0,141$).

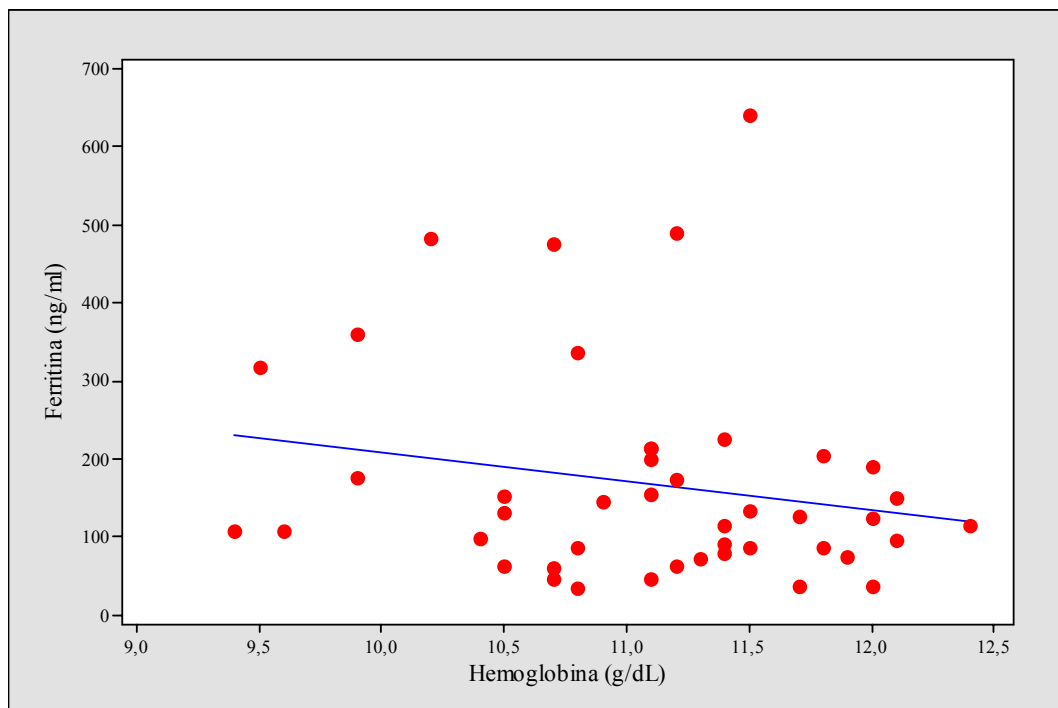


Figura 15. Correlação entre a hemoglobina e a ferritina sérica em mulheres com 33 anos ou mais ($r = -0,195$).

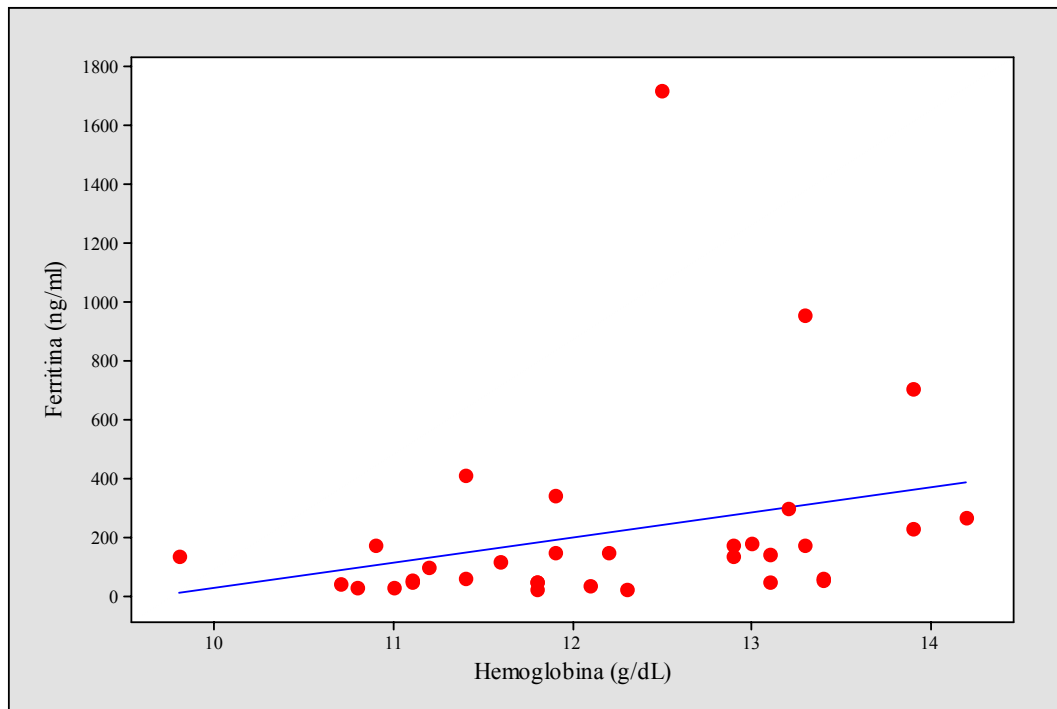


Figura 16. Correlação entre a hemoglobina e a ferritina sérica em homens com menos de 33 anos ($r = 0,277$).

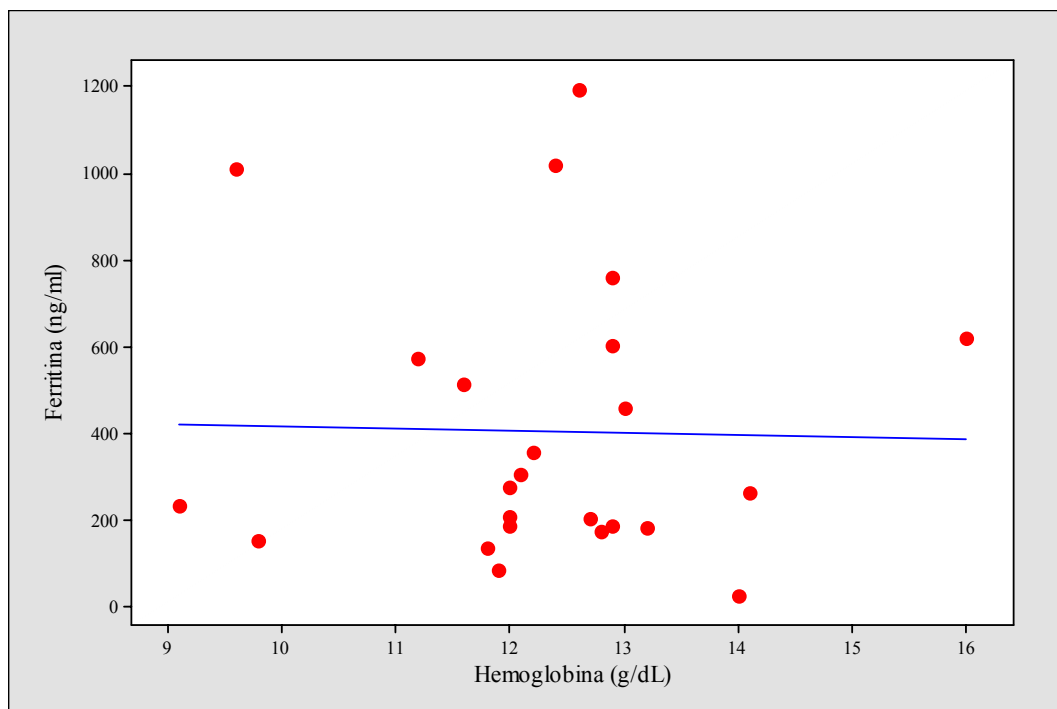


Figura 17. Correlação entre a hemoglobina e a ferritina sérica em homens com 33 anos ou mais ($r = -0,021$).

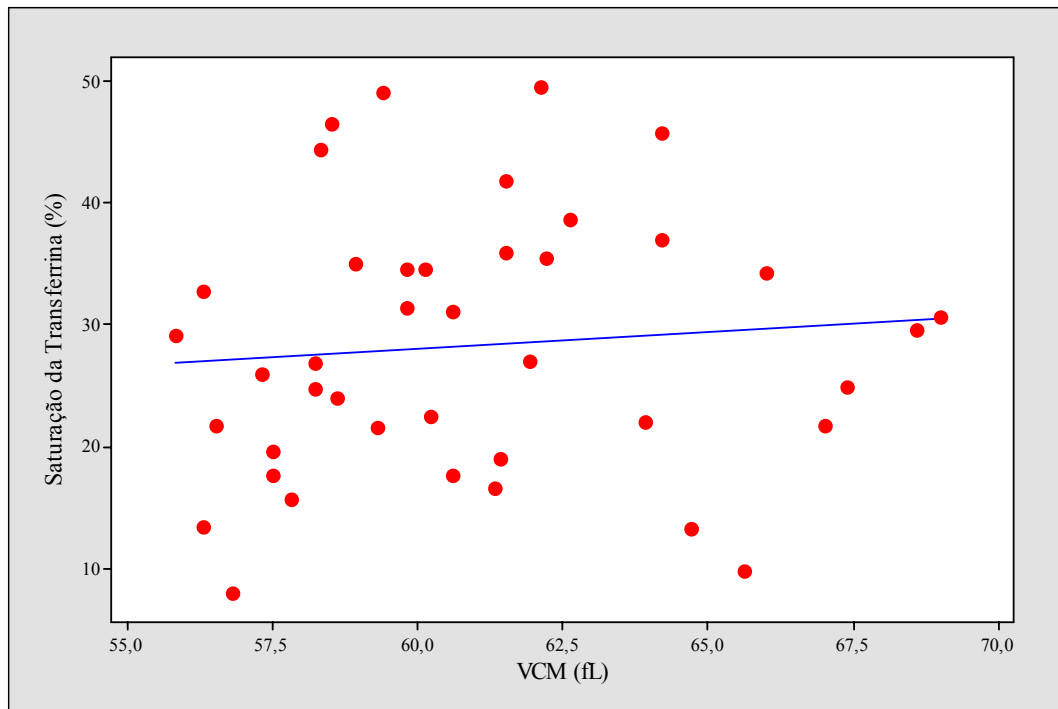


Figura 18. Correlação entre o VCM e a saturação da transferrina em mulheres com menos de 33 anos ($r = 0,092$).

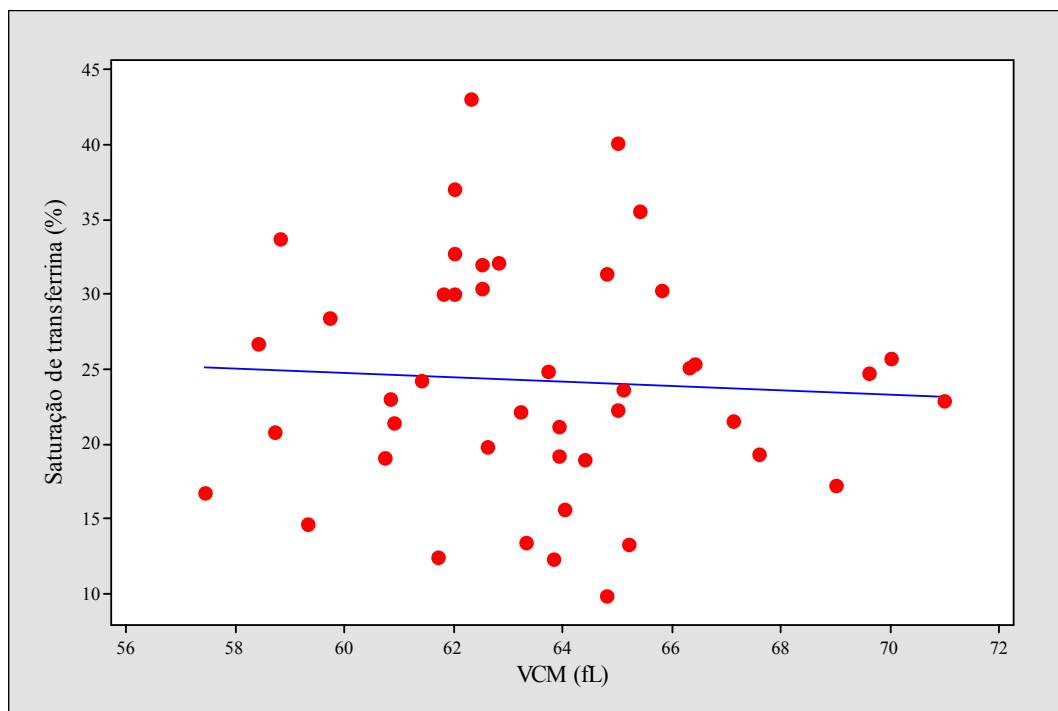


Figura 19. Correlação entre o VCM e a saturação da transferrina em mulheres com 33 anos ou mais ($r = -0,056$).

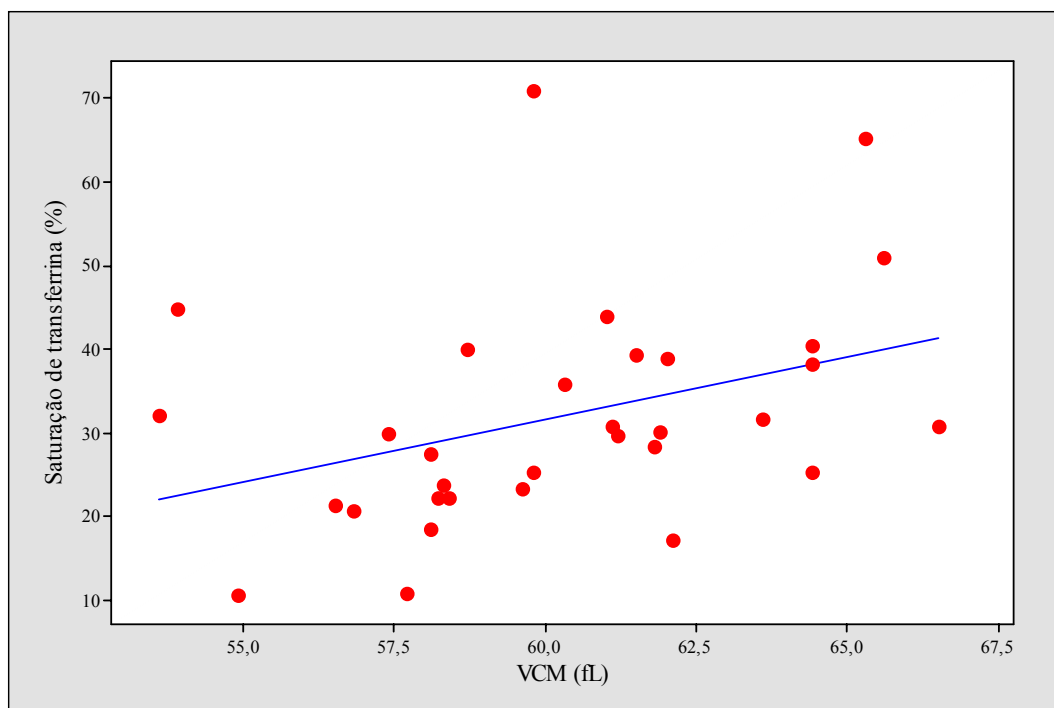


Figura 20. Correlação entre o VCM e a saturação da transferrina em homens com menos de 33 anos ($r = 0,377$).

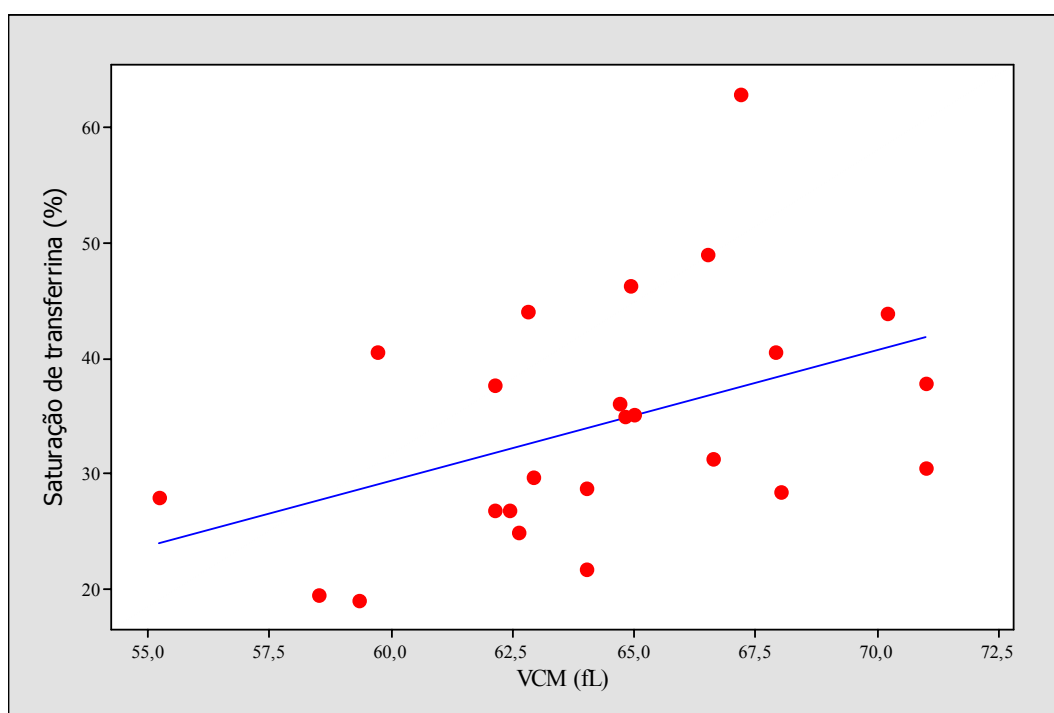


Figura 21. Correlação entre o VCM e a saturação da transferrina em homens com 33 anos ou mais ($r = 0,432$).

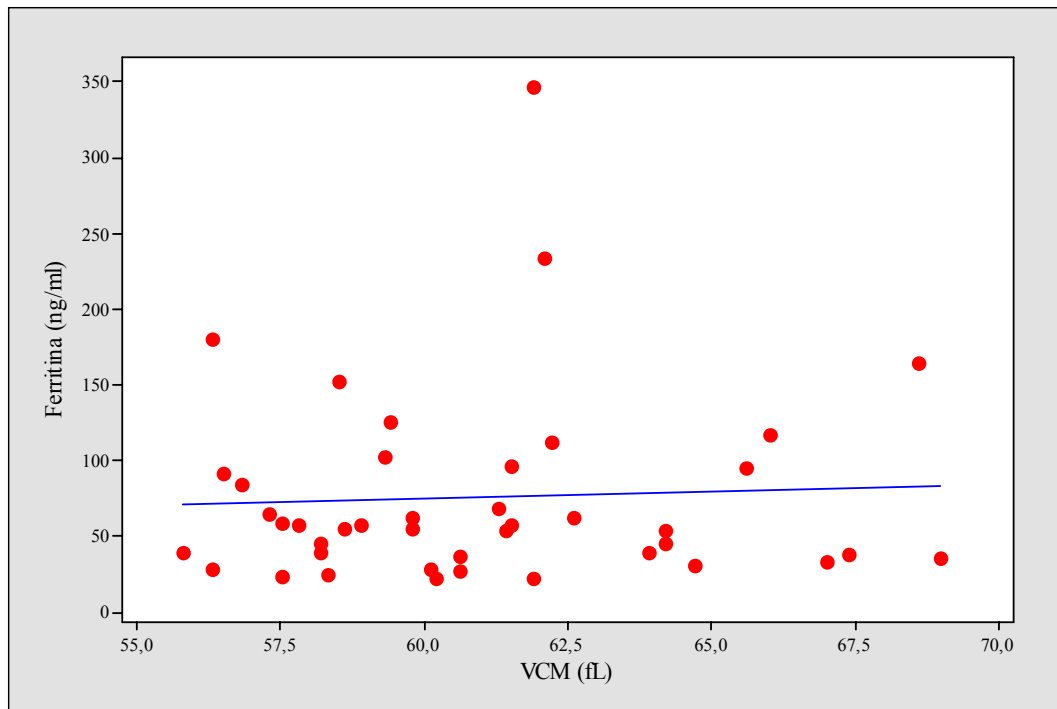


Figura 22. Correlação entre o VCM e a ferritina sérica em mulheres com menos de 33 anos ($r = 0,055$).

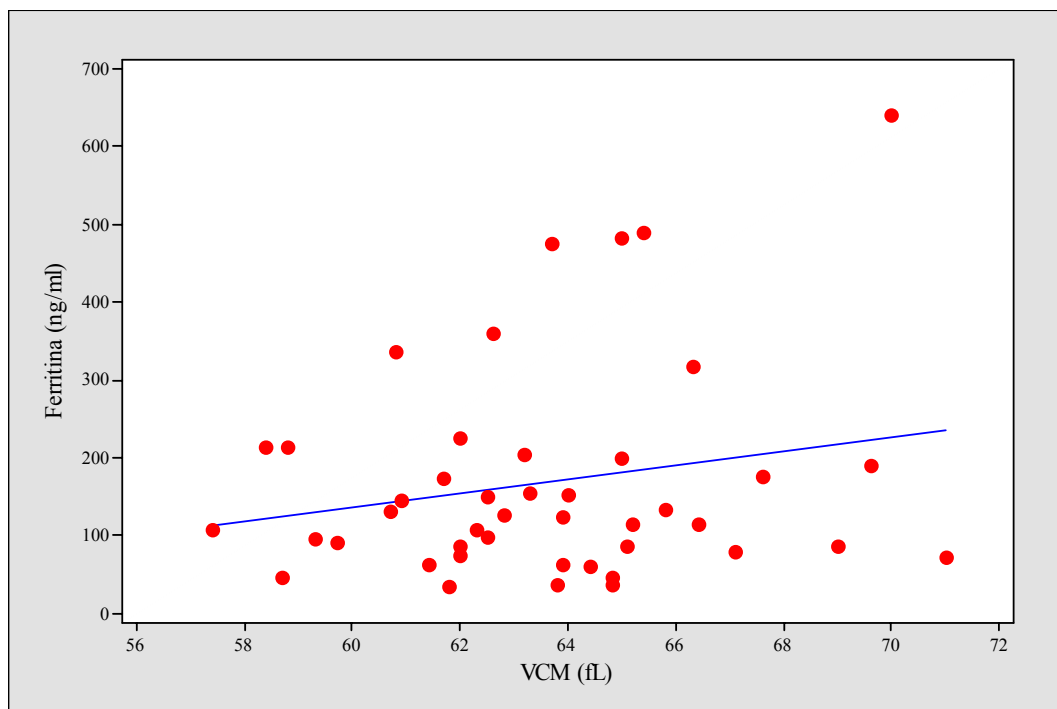


Figura 23. Correlação entre o VCM e a ferritina sérica em mulheres com 33 anos ou mais ($r = 0,205$).

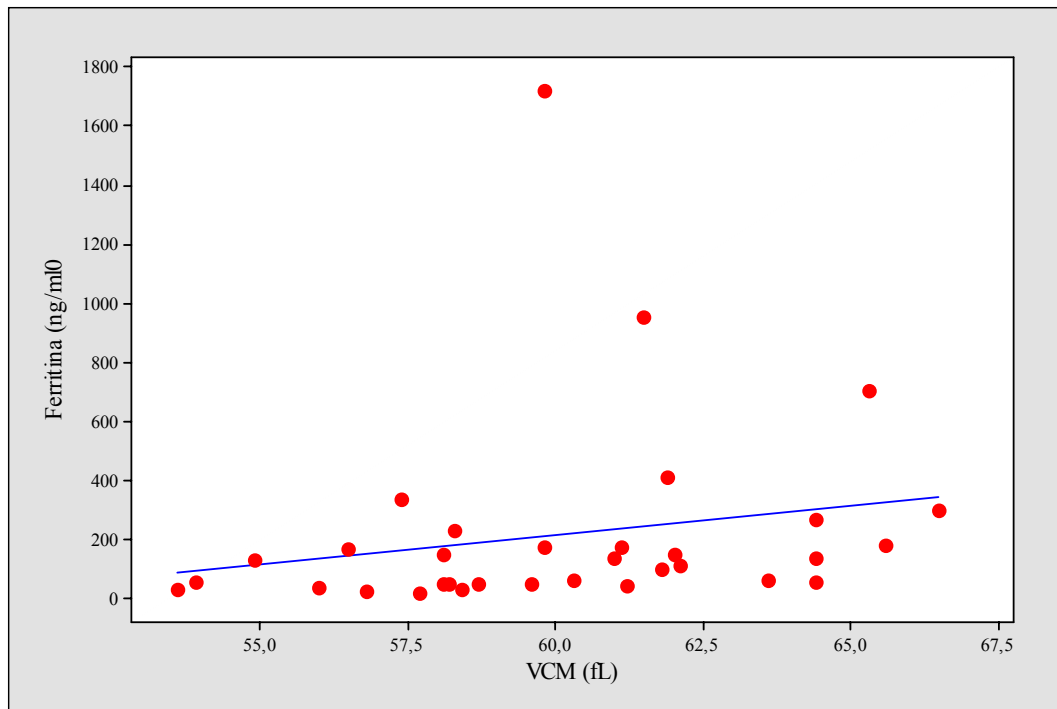


Figura 24. Correlação entre o VCM e a ferritina sérica em homens com menos de 33 anos ($r = 0,202$).

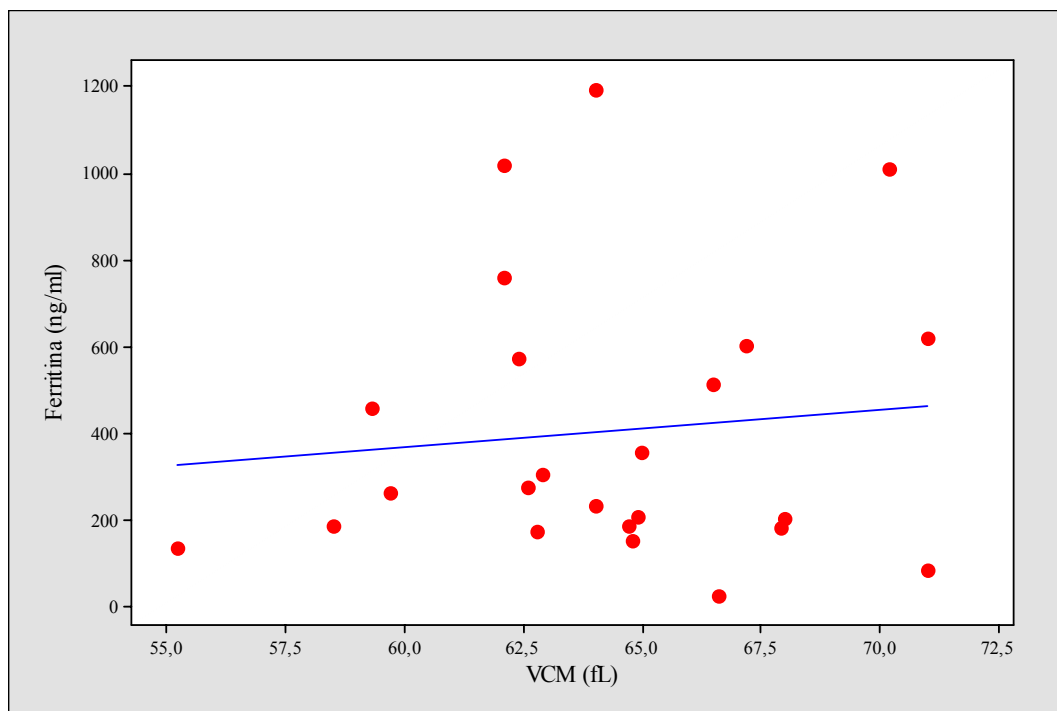


Figura 25. Correlação entre o VCM e a ferritina sérica em homens com 33 anos ou mais ($r = 0,106$).

A correlação da quantidade de A_2 com a ferritina e com a saturação da transferrina também foi fraca, sendo o maior valor de “r” observado de 0,377 (Figuras de 26 a 33). A melhor correlação foi obtida com a contagem de reticulócitos e a saturação de transferrina em homens com menos de 33 anos ($r = 0,507$) (Figuras 34, 35, 36 e 37) e com a ferritina em homens com 33 anos ou mais ($r = 0,486$) (Figuras 38, 39, 40 e 41).

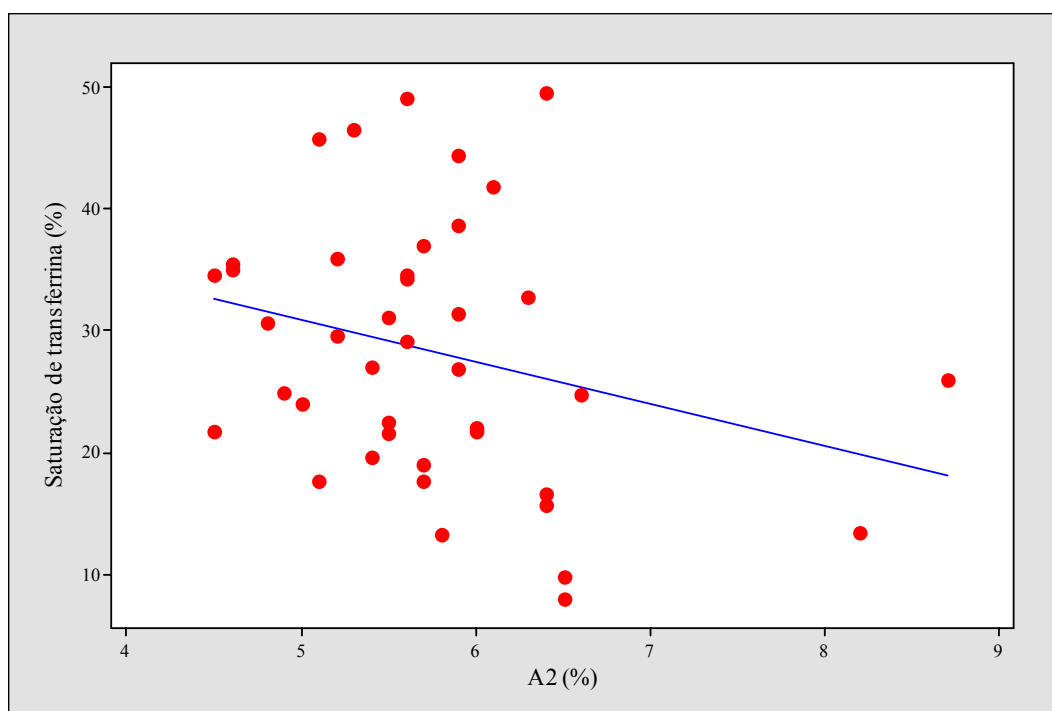


Figura 26. Correlação entre a quantidade de A_2 e a saturação de transferrina em mulheres com menos de 33 anos ($r = -0,270$).

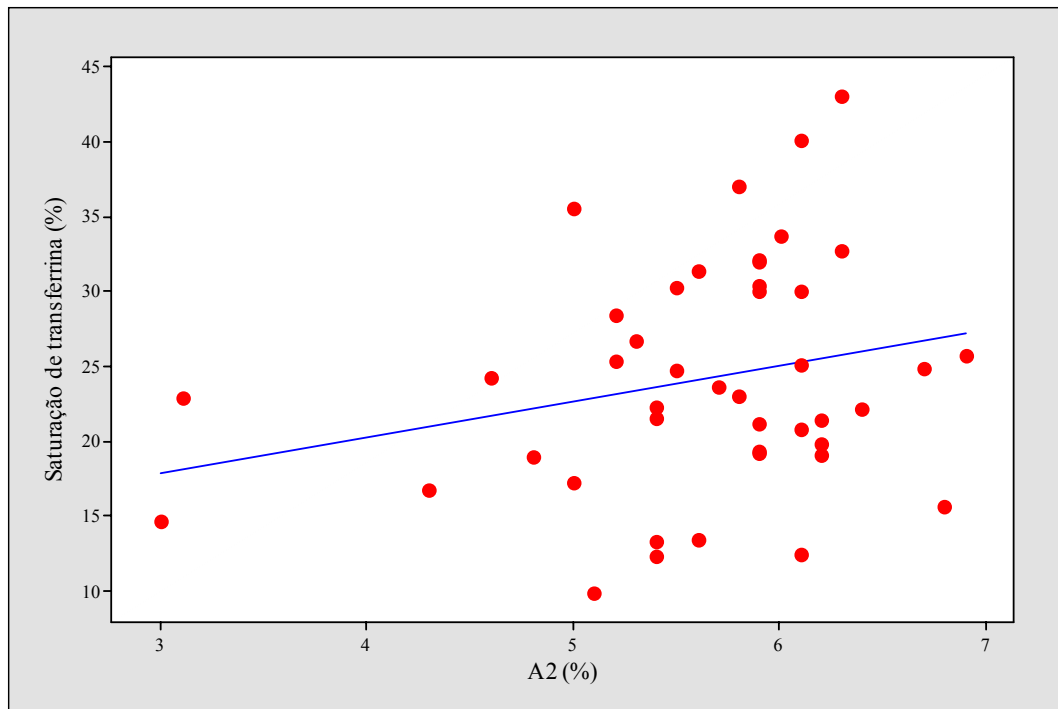


Figura 27. Correlação entre a quantidade de A_2 e a saturação de transferrina em mulheres com 33 anos ou mais ($r = 0,247$).

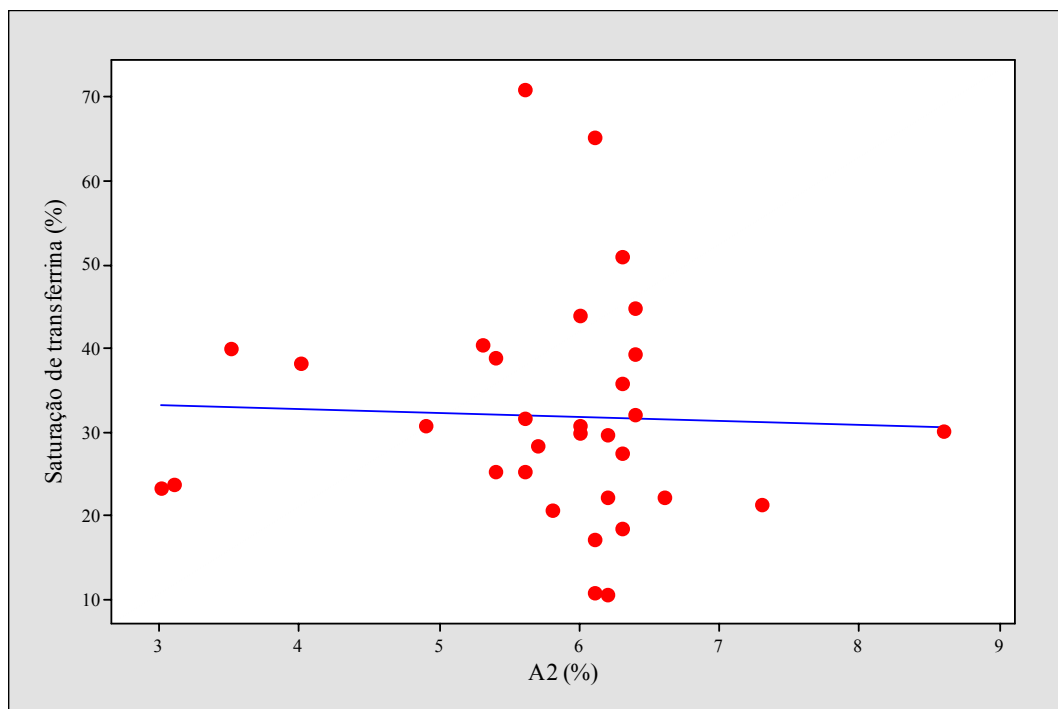


Figura 28. Correlação entre a quantidade de A_2 e a saturação de transferrina em homens com menos de 33 anos ($r = -0,041$).

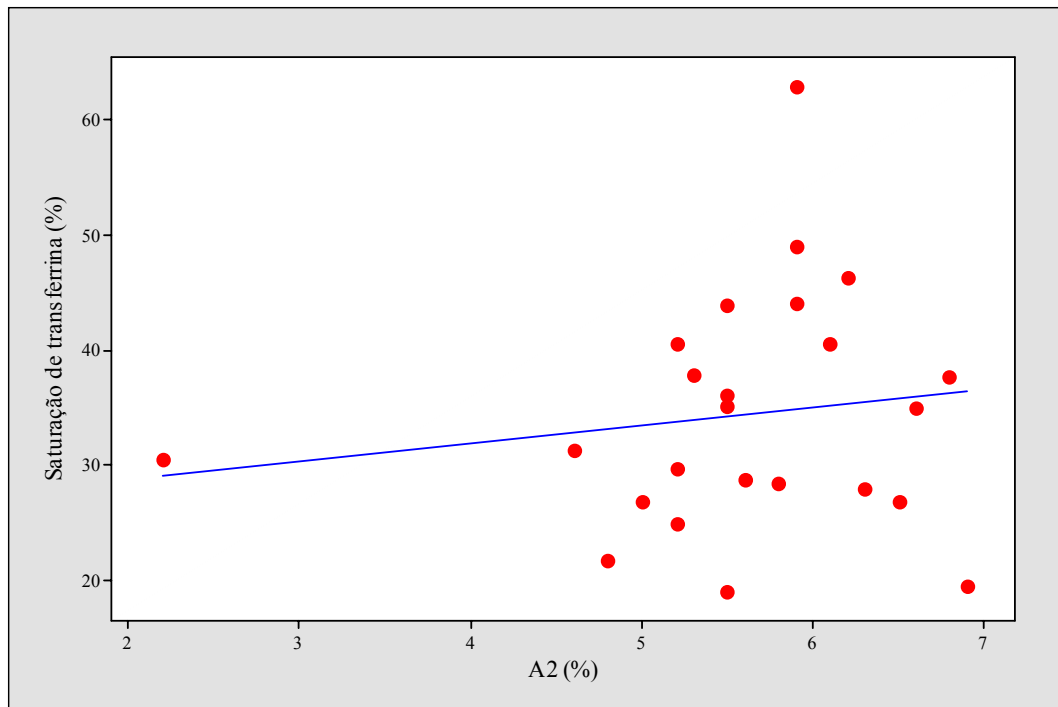


Figura 29. Correlação entre a quantidade de A_2 e a saturação de transferrina em homens com 33 anos ou mais ($r = 0,144$).

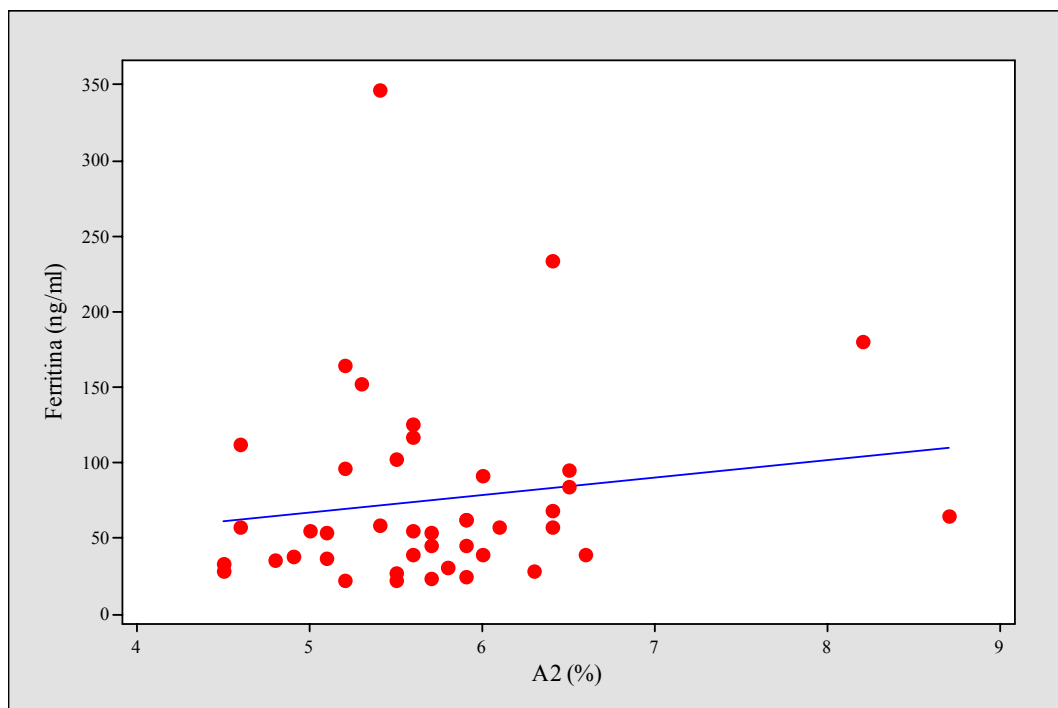


Figura 30. Correlação entre a quantidade de A_2 e a ferritina sérica em mulheres com menos de 33 anos ($r = 0,149$).

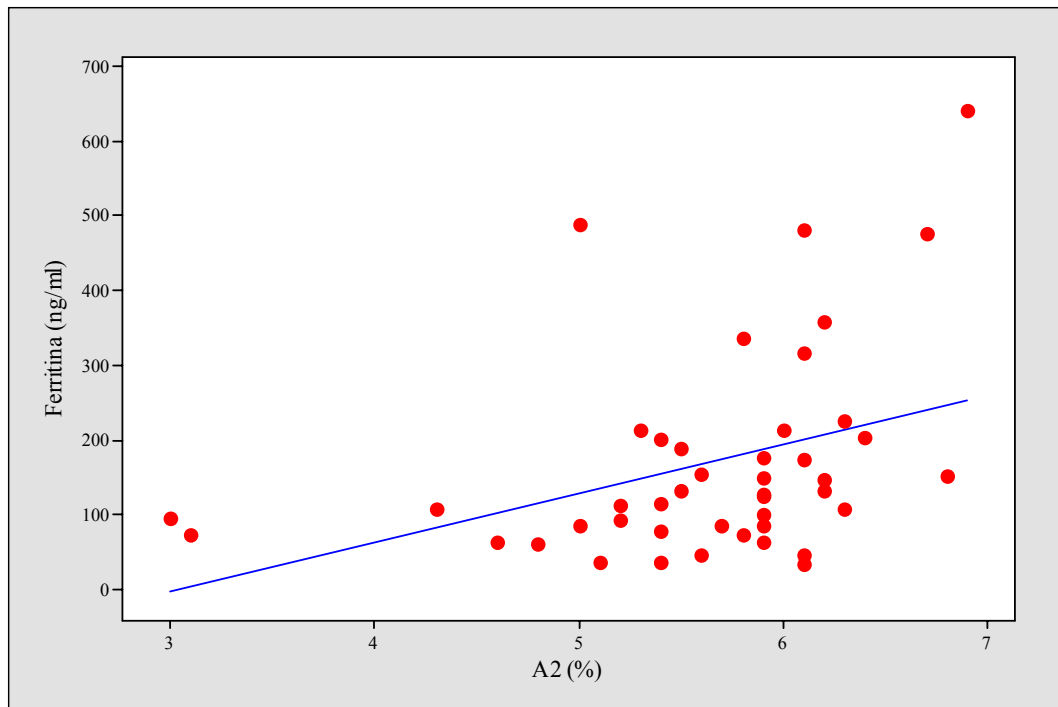


Figura 31. Correlação entre a quantidade de A₂ e a ferritina sérica em mulheres com 33 anos ou mais ($r = 0,377$).

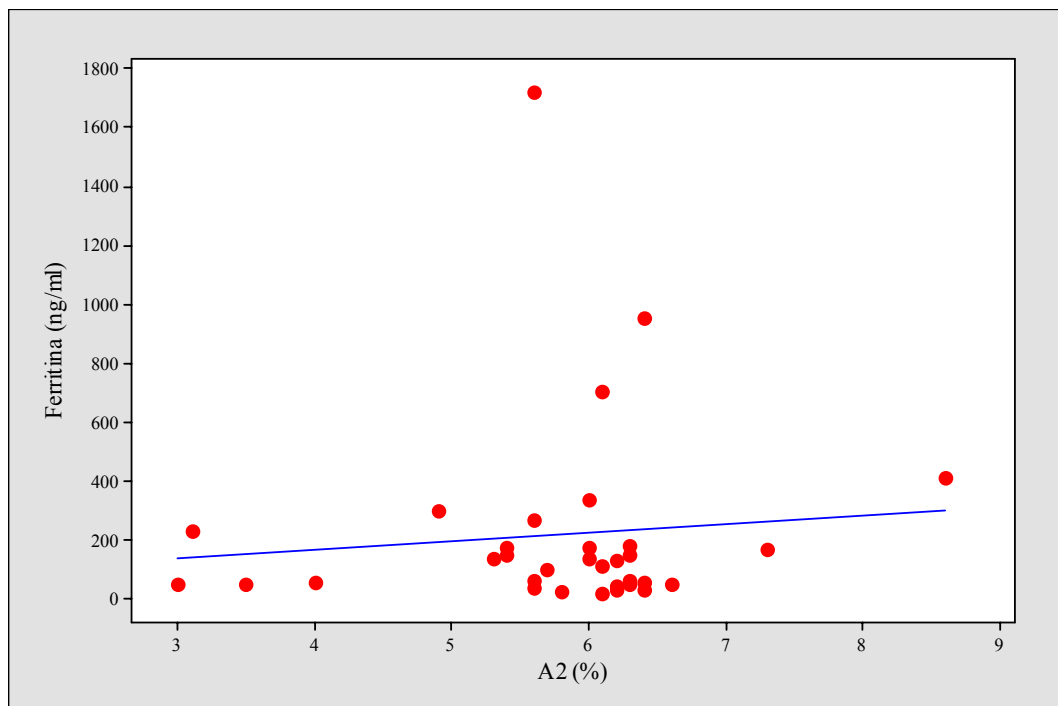


Figura 32. Correlação entre a quantidade de A₂ e a ferritina sérica em homens com menos de 33 anos ($r = 0,096$).

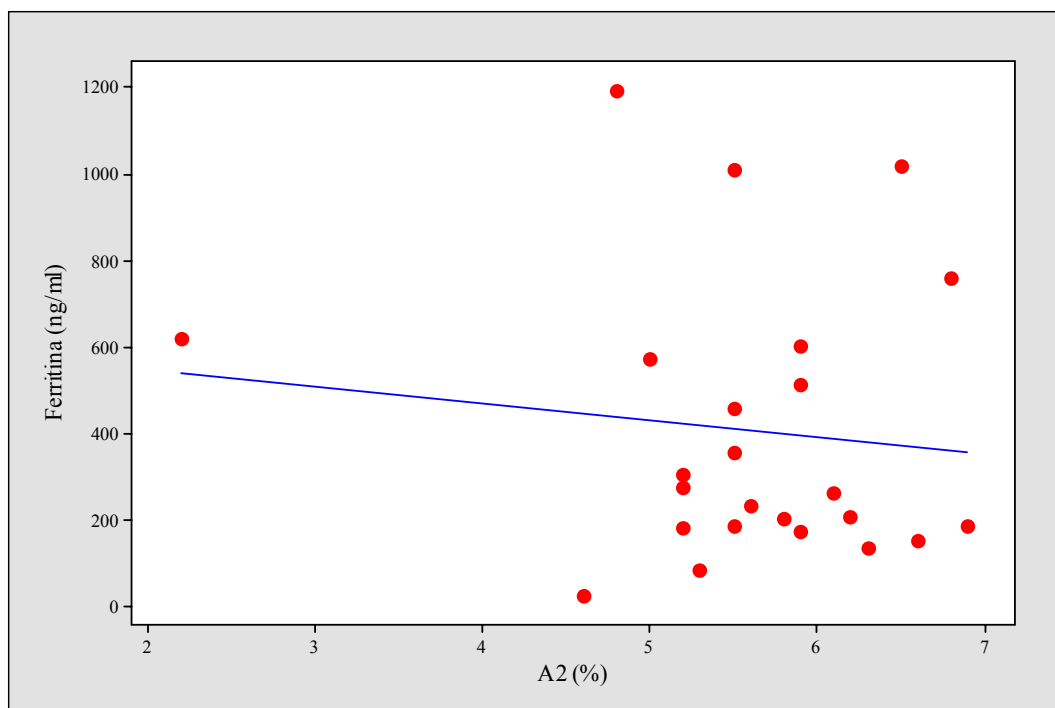


Figura 33. Correlação entre a quantidade de A₂ e a ferritina sérica em homens com 33 anos ou mais ($r = -0,115$).

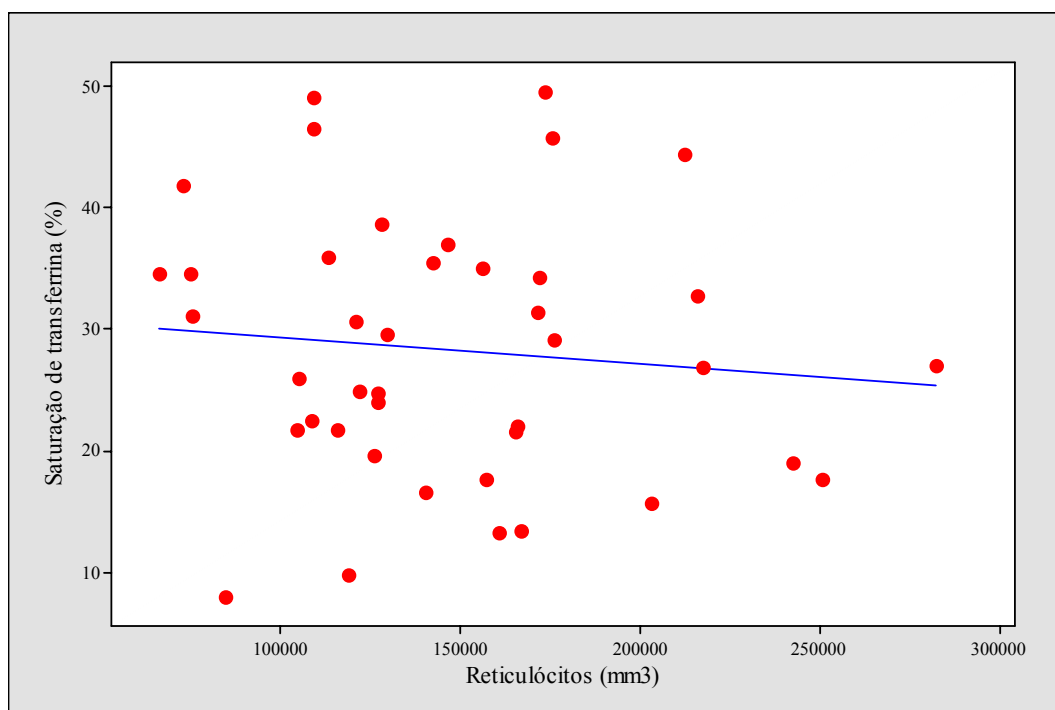


Figura 34. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a saturação de transferrina em mulheres com menos de 33 anos ($r = -0,103$).

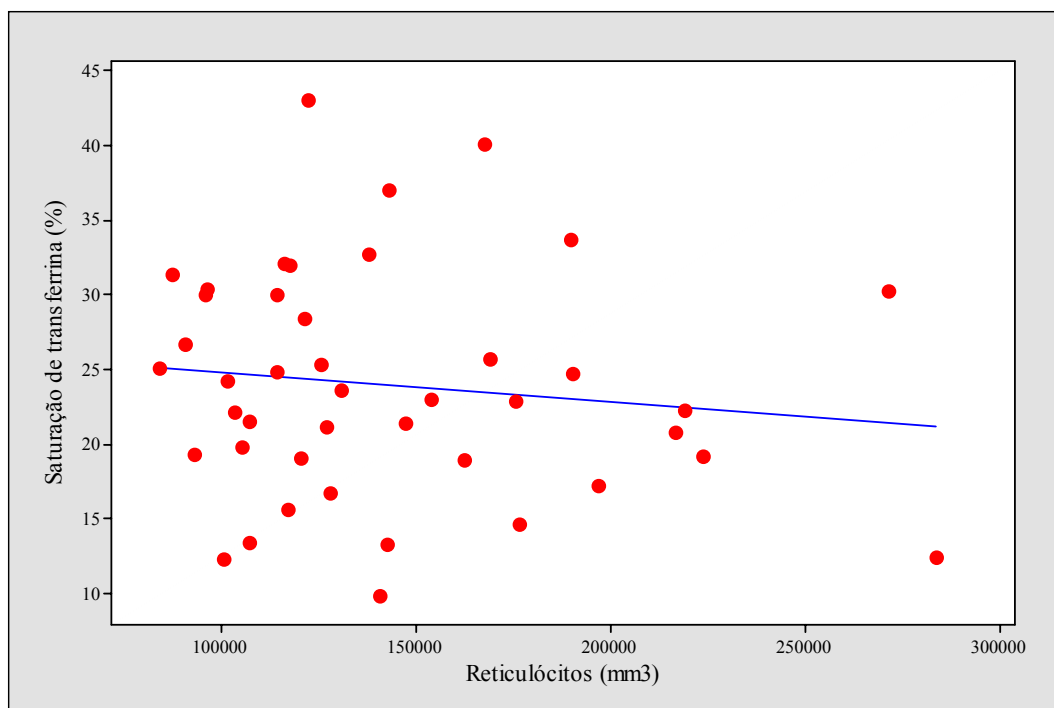


Figura 35. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a saturação de transferrina em mulheres com 33 anos ou mais ($r = -0,125$).

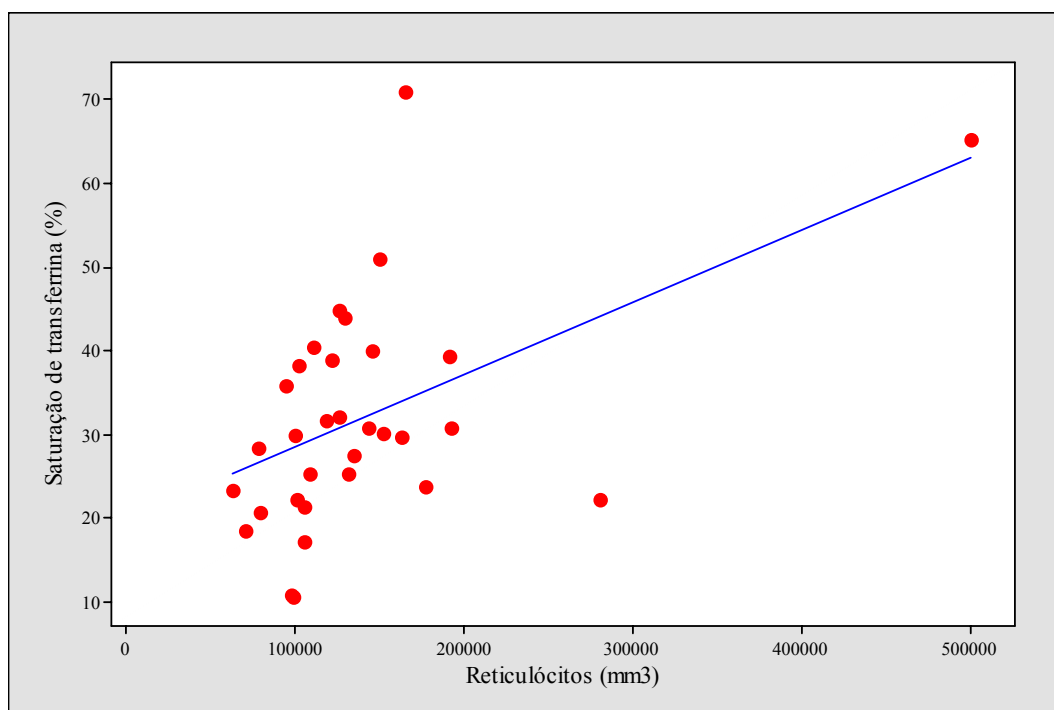


Figura 36. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a saturação de transferrina em homens com menos de 33 anos ($r = 0,507$).

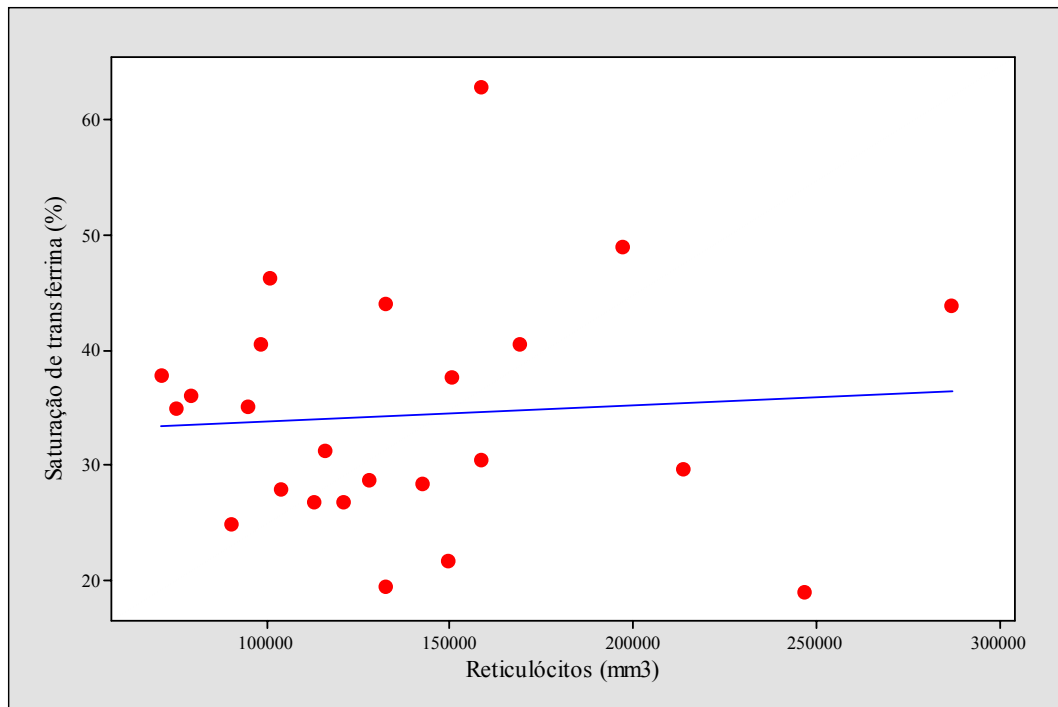


Figura 37. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a saturação de transferrina em homens com 33 anos ou mais ($r = 0,070$).

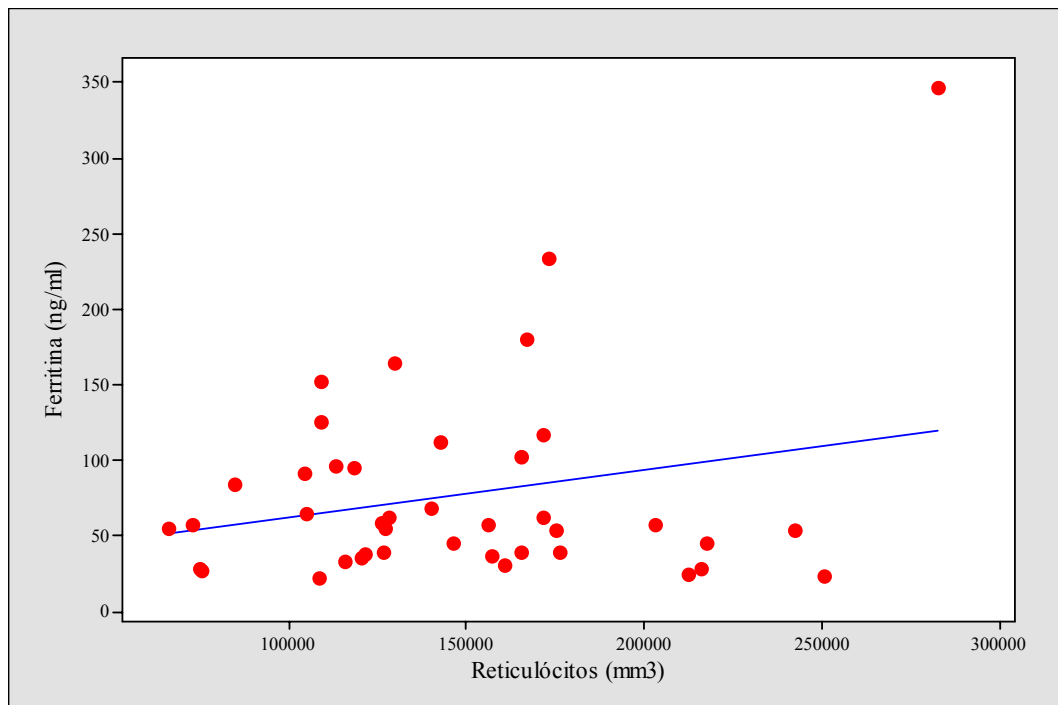


Figura 38. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a ferritina sérica em mulheres com menos de 33 anos ($r = 0,249$).

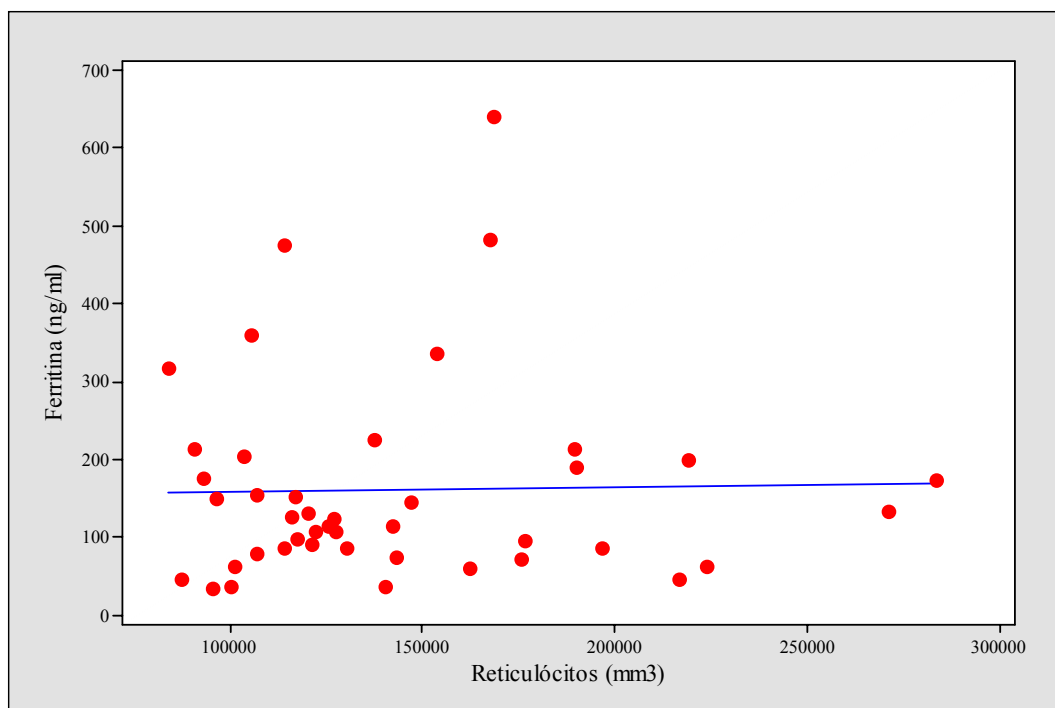


Figura 39. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a ferritina sérica em mulheres com 33 anos ou mais ($r = 0,021$).

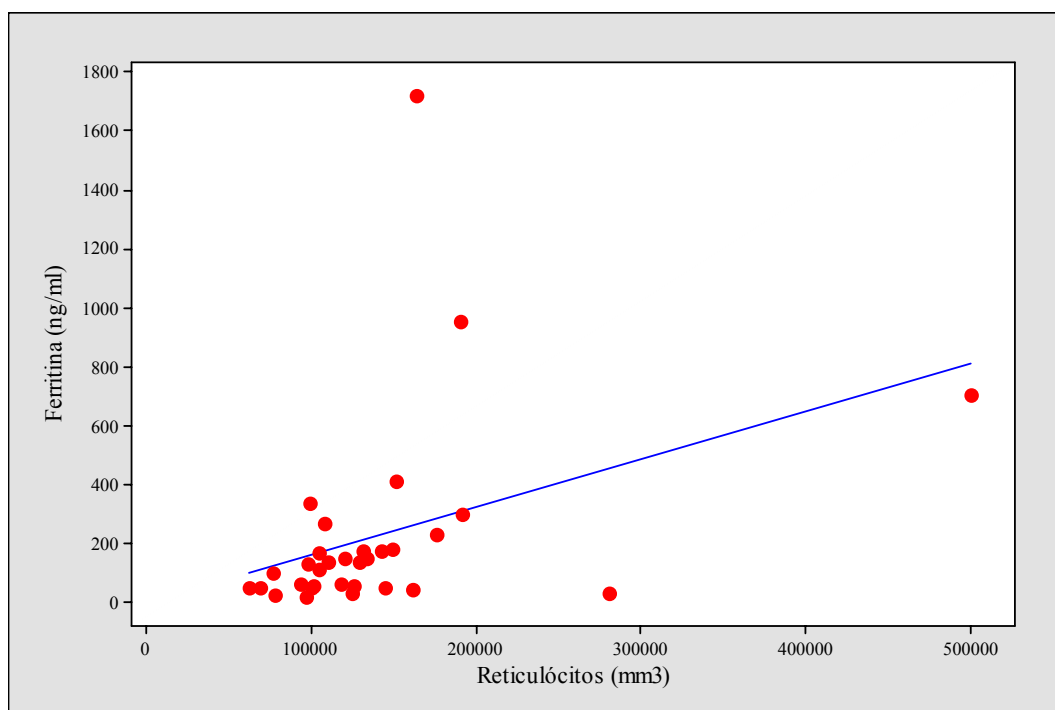


Figura 40. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a ferritina sérica em homens com menos de 33 anos ($r = 0,380$).

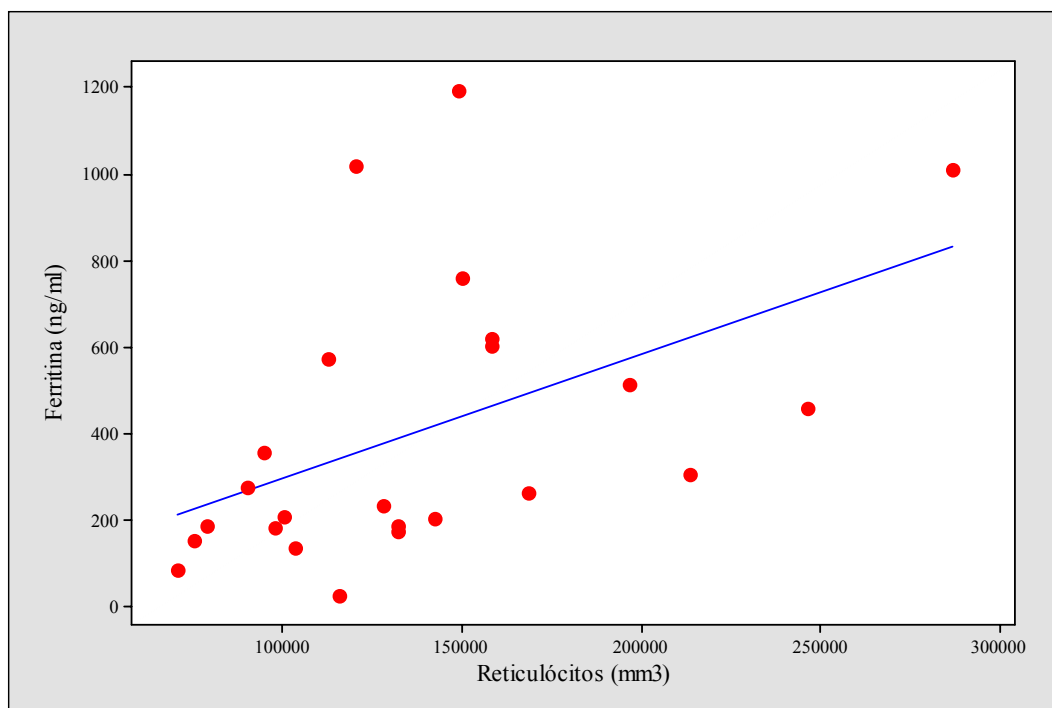


Figura 41. Correlação entre a contagem de reticulócitos e a ferritina sérica em homens com 33 anos ou mais ($r = 0,486$).

4.5 Evolução clínica e laboratorial

Dos 162 indivíduos do estudo, 106 tinham acompanhamento laboratorial de um a sete anos. Desses, 22 eram heterozigotos para H63D e 84 não tinham nenhum dos polimorfismos avaliados. A evolução desses indivíduos foi determinada pela diferença entre a ferritina final e a inicial, dividindo-se o grupo de acordo com o tempo de acompanhamento.

A média de idade dos heterozigotos para a mutação H63D, na ocasião da última coleta, foi de 38 anos no grupo com menos de quatro anos de acompanhamento e de 27 naqueles com mais de quatro anos. Nos indivíduos em polimorfismo a média de idade foi de 36 anos, em ambos os grupos.

A média e mediana da ferritina final foi sempre superior a da inicial. Os resultados estão descritos nas Tabelas 28 e 29.

Não foi significativa a diferença entre os valores da ferritina final e inicial dos heterozigotos para H63D e dos sem a mutação, independente do tempo de acompanhamento ($p= 0,550$ e $p= 0,909$ para o tempo de >1 e <4 anos e ≥ 4 e ≤ 7 anos, respectivamente) (Figuras 42 e 43).

Tabela 28. Comparação da evolução bioquímica entre os indivíduos com heterozigose e os sem a mutação H63D que foram acompanhados por menos de quatro anos.

Tempo $\geq 1 < 4$ anos	n	Idade (anos) $\bar{X} \pm ep$	Ferritina sérica (ng/mL) $\bar{X} \pm ep$		Ferritina sérica (ng/mL) Mediana	
			Inicial	Final	Inicial	Final
			H63D + / -	10	38,1 \pm 4,6	76,5 \pm 20,8
H63D - / -	52	36,1 \pm 3,1	162,5 \pm 30,2	196,6 \pm 39,9	88,4	115,2

Tabela 29. Comparação da evolução bioquímica entre os indivíduos com heterozigose e os sem a mutação H63D que foram acompanhados por mais de quatro anos.

Tempo $\geq 4 \leq 7$ anos	n	Idade (anos) $\bar{X} \pm ep$	Ferritina sérica (ng/mL) $\bar{X} \pm ep$		Ferritina sérica (ng/mL) Mediana	
			Inicial	Final	Inicial	Final
			H63D + / -	12	26,7 \pm 6,3	73,4 \pm 13,8
H63D - / -	32	36,1 \pm 3,5	120,7 \pm 28,6	163,0 \pm 34,6	47,0	86,0

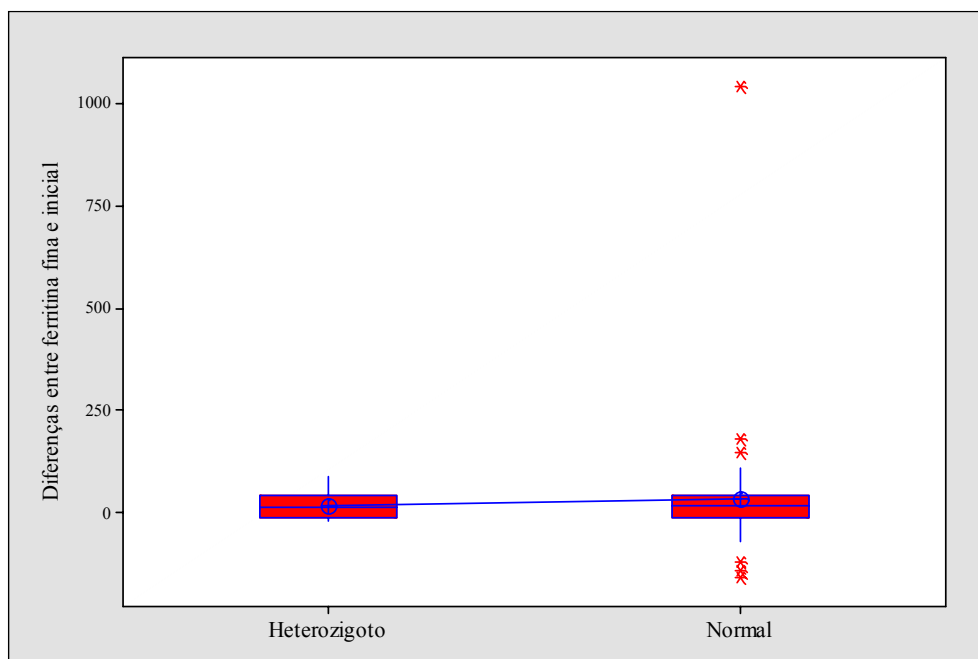


Figura 42. Representação gráfica das diferenças obtidas entre a ferritina final e inicial dos indivíduos com heterozigose para H63D e nos sem a mutação com acompanhamento >1 e <4 anos.

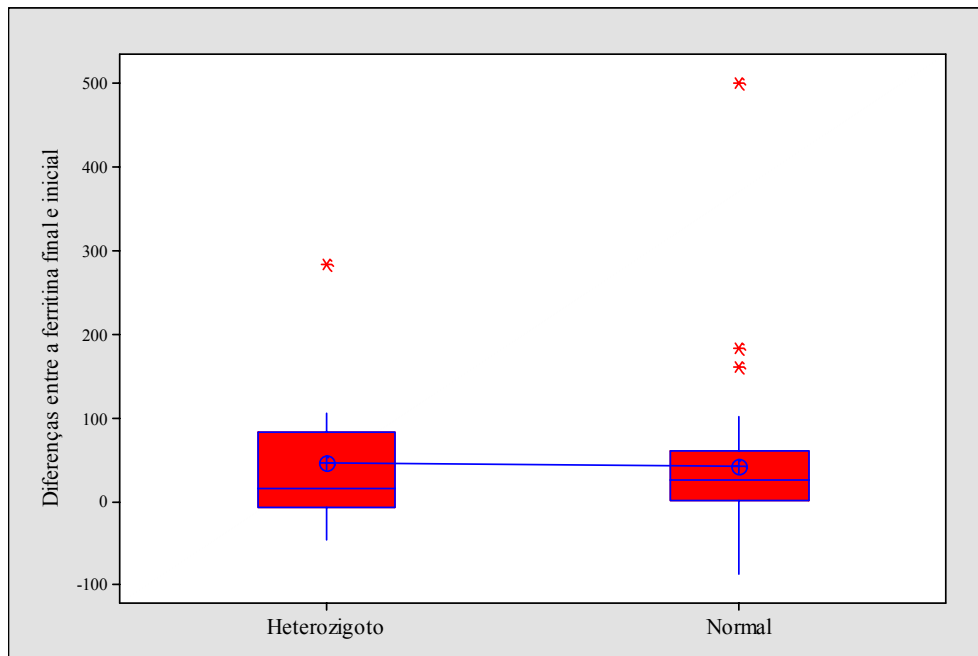


Figura 43. Representação gráfica das diferenças obtidas entre a ferritina final e inicial dos indivíduos com heterozigose para H63D e nos sem a mutação com acompanhamento ≥ 4 e ≤ 7 anos.

5 Discussão

A beta talassemia é uma das mais frequentes afecções genéticas no mundo. Em São Paulo, estima-se que 3% da população seja portadora do traço talassêmico (MENDES, 2004). Esses portadores geralmente são oligo ou assintomáticos com expectativa de vida semelhante a da população normal (CAO; GALANELLO, 2005). Entretanto, a sobrecarga de ferro tem sido observada, há vários anos, em alguns desses indivíduos (LEWIS; LEE; HAUT, 1965; BROWDLER; HUEHNS, 1963; WILLIAMS; SIEMSEN, 1968; MELLIS et al., 2002; RIVA et al., 2004; PIPERNO et al., 2000).

O excesso de ferro é extremamente tóxico para todas as células do organismo, podendo ocasionar danos orgânicos graves e irreversíveis como: cirrose hepática, diabetes, cardiopatia e hipogonadismo (SWINKELS et al., 2006; PIETRANGELO, 2006).

O desequilíbrio da síntese das cadeias alfa e beta originando excesso de cadeias alfa e sua conseqüente precipitação, acarreta dano na membrana celular com destruição precoce das hemácias e eritropoese ineficaz. A aceleração da eritropoese pode aumentar a absorção de ferro pelas células intestinais e, em alguns casos, o desenvolvimento de sobrecarga de ferro. Entretanto, na beta talassemia heterozigota as alterações hematológicas são discretas (PIPPARD; WAINSCOAT, 1987) e não justificam a ocorrência de importante sobrecarga de ferro. Vários estudos têm sido realizados para comprovar se a concomitância com as mutações no gene *HFE* pode ser a explicação para esse distúrbio metabólico. Todavia, os resultados da literatura

ainda são controversos (RUIZ-ARGUELLES et. Al., 2001; MARTINS et al., 2004).

Esse estudo analisou 162 portadores de beta talassemia heterozigota residentes na região de São Carlos, cidade localizada no centro do Estado de São Paulo, cuja colonização foi essencialmente de imigrantes italianos.

O perfil hematológico desses indivíduos foi semelhante ao descrito na literatura para portadores do traço talassêmico. A maioria apresentou contagem de eritrócitos normal ou levemente aumentada, discreta diminuição da concentração de hemoglobina, acentuada diminuição do VCM e do HBCM com RDW normal ou discretamente elevado (CLARKE; HIGGINS, 2000; CAO; GALANELLO, 2005).

As médias do VCM e do HCM foram abaixo de 63 fL e de 21 pg, respectivamente, sugerindo que a maioria deles possa ser portadora de mutações do tipo β^0 (BERTUZZO; SONATTI; COSTA, 1997; RUND et al., 1992), ou seja, com ausência de síntese de cadeias beta. Análises moleculares, dessas amostras, serão necessárias para confirmar essa hipótese.

Os níveis de hemoglobina entre homens e mulheres foram estatisticamente diferentes, demonstrando um comportamento similar aos não portadores.

Nas crianças, a concentração de Hb A₂ foi estatisticamente superior à dos adultos, porém, não houve diferença na quantidade da Hb fetal. A literatura é escassa nesse aspecto e não há, até o momento, uma explicação

biológica para esse aumento, considerando-se que pelos mecanismos de regulação conhecidos, os genes da globina, atingem seu equilíbrio após os seis meses de nascimento, expressando-se com perfil “adulto” a partir de um ano de idade. Fatores ambientais podem influenciar os valores de Hb A₂, como a falta de ferro, o que não foi observado nesse grupo, pois foram excluídos da análise os indivíduos com valores de ferritina abaixo de 20 ng/ml.

A deficiência de ferro é altamente prevalente em todo o mundo, mesmo nos países industrializados, sendo ainda considerada um problema de saúde pública. Afeta principalmente crianças e mulheres em idade fértil e acarreta grande morbidade com diminuição importante da capacidade de trabalho. Nesse estudo, apesar do maior número de mulheres, foram detectados apenas seis indivíduos com ferritina abaixo de 20ng/ml (3,78%). Alguns autores têm sugerido que a beta talassemia heterozigota possa ter um efeito protetor para essa deficiência, decorrente do aumento da absorção de ferro ocasionado pela maior produção de glóbulos vermelhos (GANELLO, 1990).

Por outro lado, a hemocromatose é uma doença grave, que quando não diagnosticada, pode acarretar, em vários órgãos, graves lesões estruturais e funcionais. A maioria das formas adquiridas deve-se a freqüentes transfusões sanguíneas, utilizadas para tratamento de portadores de anemias crônicas, como as hemoglobinopatias. As formas hereditárias freqüentemente estão relacionadas a genes que codificam proteínas envolvidas na homeostase do ferro. Sua evolução normalmente é lenta, podendo ser assintomática por muitos

anos, e acomete principalmente os homens. As manifestações clínicas geralmente aparecem após a quarta década de vida.

A ferritina sérica é o método laboratorial mais simples e o mais utilizado para avaliação da quantidade de ferro no organismo. Entretanto, o aumento de sua concentração pode ocorrer em processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos, dificultando sua interpretação. Nesse estudo, os indivíduos com aumento da concentração de ferritina, só foram incluídos com pelo menos duas dosagens em datas diferentes. Dos 162 avaliados, 22,22% tinham concentração de ferritina sérica acima de 200 ng/ml em mulheres e de 300 ng/ml em homens, sendo que em 9,26% e em 3,1% os níveis estavam acima de 500 ng/mL e de 1000 ng/ml, respectivamente. Valores acima de 1000 ng/ml frequentemente estão associados a algum dano orgânico.

Os homens foram proporcionalmente mais acometidos do que as mulheres, sendo que, dos 29 indivíduos do sexo masculino com 33 anos ou mais, 44,83%, apresentaram níveis acima de 300 ng/mL. As alterações bioquímicas são mais precoces do que as manifestações clínicas, mas não se têm estudos evolutivos que possam determinar a idade de aparecimento das alterações laboratoriais. Portanto, é fundamental o reconhecimento dos grupos de risco, para que possam ser mantidos em acompanhamento periódico.

A mutação mais comumente associada a hemocromatose hereditária é a C282Y no gene *HFE*. Em populações caucasóides sua frequência alélica é de 10% a 15%, sendo que o genótipo homozigoto está presente em aproximadamente 0,5% dos indivíduos (WAALEN; NORDESTGAARD;

BEUTLER, 2005). Todavia, estudos com populações, não clinicamente selecionadas, têm mostrado que a penetrância do gene é muito baixa, pois grande parte dos homozigotos não apresenta nenhum sintoma da doença.

Os polimorfismos do gene *HFE* são raramente associados à morte de indivíduos em idade reprodutiva, sendo improvável alguma desvantagem seletiva (MILMAN; PEDERSEN, 2003). Por outro lado, sua alta prevalência sugere um efeito seletivo positivo que, pode estar relacionado as características fenotípicas da hemocromatose contra a deficiência de ferro, distúrbio que era, no passado, muitas vezes fatal (MILMANN, 2000; FAIRBANKS, 2000).

Em portadores de hemocromatose, essa mutação, está presente em mais de 80% dos descendentes do norte Europeu. Estudos, com pacientes de outras regiões, não têm encontrado a mesma frequência. Nesse estudo, 4,32% dos portadores de talassemia heterozigota eram heterozigotos para C282Y. Destes, apenas uma mulher apresentou níveis de ferritina acima de 1000 ng/ml com saturação de transferrina de 67,8%, sugerindo hemocromatose. Nenhuma alteração nos testes para avaliação do metabolismo do ferro foi encontrada em quatro desses pacientes. Em dois, um homem de 54 anos e uma mulher de 53 anos, os níveis foram de 303 ng/mL e 223 ng/ml, respectivamente. Ambos com valores de saturação de transferrina abaixo de 45%. Em dois indivíduos, masculinos com 54 anos, foram observados valores de ferritina extremamente diferentes, um com 38 ng/mL e o outro com 303 ng/mL. Nas mulheres o mesmo foi observado em duas com 53 anos, uma com 84 ng/L e a outra com 223 ng/ml. Esses resultados demonstram a grande heterogeneidade dos portadores da

mutação C282Y em heterozigose. Nenhum caso de homozigose foi detectado nessa amostra. Os resultados obtidos confirmam que talassêmicos com mutação C282Y em heterozigose podem evoluir com hemocromatose. Todavia, outros fatores devem estar envolvidos na fisiopatologia do acúmulo de ferro desses indivíduos.

Outras mutações no gene *HFE*, associadas a hemocromatose hereditária, também foram descritas como a H63D e a S65C. A homozigose para H63D foi encontrada em 1,86% dos nossos casos e a heterozigose em 22,22%. Em dois indivíduos (1,23%) foram observadas ambas mutações, C282Y e H63D. A frequência da mutação H63D encontrada foi semelhante ao descrito previamente em outra amostra brasileira (OLIVEIRA et al., 2006) e, menor que a encontrada por Melis, em 2002, avaliando adultos italianos masculinos. Dos três pacientes com homozigose, dois eram aparentados, do gênero feminino, com idades de 22 e 49 anos, e com testes de avaliação do metabolismo do ferro normais. Ambas tinham relato grande perda sanguínea no período menstrual. O outro caso, de 59 anos, também do gênero feminino apresentava concentração de ferritina acima de 500 ng/ml e saturação de transferrina abaixo de 45%.

Vários grupos de pesquisa têm estudado o efeito da mutação H63D em portadores de beta talassemia heterozigota. Porém, os resultados, entre eles, são discordantes. Em 2001, Ruiz Arguelles et al. observaram grave sobrecarga de ferro em indivíduos com beta talassemia heterozigota e homozigose para H63D. Em 2002, Mellis et al. Encontraram, em homozigotos para H63D e não em heterozigotos, níveis mais elevados de ferritina. Porém, em 2004, Martins

et al. estudando pacientes portugueses, encontraram diferença significativa nos valores de ferro sérico e saturação de transferrina entre os heterozigotos e os sem a mutação. Os nossos resultados demonstram a grande variabilidade individual que pode ocorrer entre portadores de beta talassemia heterozigota e o mesmo genótipo relacionado ao gene *HFE* e, comprovam a dificuldade de conclusões sobre o efeito dessas mutações no fenótipo desses indivíduos.

Os perfis daqueles que apresentaram dupla heterozigose também foram heterogêneos. Foram observados dois casos, um feminino e outro masculino com 83 e 79 anos, respectivamente. O paciente masculino tinha importante elevação de ferritina (882,0 ng/ml) com saturação de 44,8% e no outro caso, apesar da idade, a ferritina e a saturação eram normais.

A grande maioria dos indivíduos com mutação no gene *HFE* era heterozigota para H63D. Nesses, foi possível análise estatística para avaliar a influência da mutação, do gênero e da idade nos valores da ferritina sérica e da saturação de transferrina. Além disso, foi possível também analisar a influência dos parâmetros hematológicos, relacionados à gravidade da mutação no gene da beta globina, nos resultados dos testes do metabolismo do ferro.

Não houve diferença significativa entre os valores de ferritina e saturação de transferrina nos heterozigotos para H63D e naqueles sem a mutação.

Entre os gêneros, a saturação de transferrina foi maior em homens do que em mulheres na faixa etária igual ou acima de 33 anos e a ferritina foi mais elevada em homens de ambas as faixas etárias. Nos homens e nas mulheres os valores de ferritina foram mais elevados nos com 33 anos ou mais.

As doenças hereditárias caracterizadas por acúmulo de ferro orgânico têm como primeira alteração laboratorial o aumento da saturação da transferrina. Entretanto, na doença da ferroportina, cuja fisiopatologia está mais relacionada a uma diminuição da liberação do ferro dos macrófagos do que a um aumento da absorção de ferro intestinal, a saturação frequentemente é normal ou ligeiramente aumentada. Nesse estudo, apenas 16,70% das mulheres com ferritina acima de 200 ng/mL e dos homens com valores superiores a 300 ng/mL apresentaram concomitante aumento da saturação de transferrina. Portanto, o mecanismo da elevação de ferritina nos portadores de beta talassemia heterozigota com sobrecarga de ferro pode ser diferente do habitualmente observado.

A concentração de hemoglobina, o VCM e a contagem de reticulócitos não influenciaram nos valores da saturação de transferrina. Todavia, a saturação de transferrina foi mais elevada em mulheres com 33 anos ou mais com quantidades de A_2 acima de 5,7%.

A concentração de ferritina não foi influenciada pelos diferentes valores da hemoglobina do VCM e da quantidade de A_2 . Porém, os níveis de ferritina foram maiores em homens com 33 anos ou mais e que tinham maior número de reticulócitos. Esses dois achados podem estar relacionados ao aumento da absorção do ferro secundária a maior produção de eritrócitos, mas é pouco provável que apenas esse mecanismo, possa explicar o mecanismo do aumento acentuado da ferritina encontrado em alguns portadores de talassemia heterozigota.

Em nenhum dos grupos avaliados foi detectada uma boa correlação entre a concentração de hemoglobina, a quantidade de Hb A₂, o VCM e os reticulócitos com os valores de ferritina e saturação de transferrina.

Não houve diferença na evolução laboratorial dos portadores de talassemia com ou sem a mutação, sendo que a concentração de ferritina final foi sempre maior que a inicial.

6 Conclusões

O perfil hematológico dos portadores de beta talassemia heterozigota da região de São Carlos é semelhante ao descrito na literatura. Os baixos valores dos índices hematimétricos sugerem que a maioria seja portadora de mutações do tipo β^0 . A quantidade de Hb A₂ foi maior em crianças, não havendo, até o momento, explicação biológica para esse achado.

A elevação da ferritina é freqüente nos portadores de beta talassemia e pode alcançar valores acima de 1000 ng/mL em cerca de 3% dos casos. Os homens são mais acometidos que as mulheres, sendo que quase metade dos indivíduos masculinos com mais de 33 anos tem valores acima de 300 ng/mL.

A freqüência da mutação C282Y foi maior do que a encontrada em grupos não talassêmicos. Um caso de hemocromatose foi observado, sugerindo que em talassêmicos a heterozigose para essa mutação pode acarretar importante sobrecarga de ferro.

A freqüência da mutação H63D foi de 25,3%, sendo a grande maioria em heterozigose. Os indivíduos com homozigose ou duplo heterozigotos demonstraram fenótipos heterogêneos, com valores de ferritina extremamente variáveis, dificultando as conclusões sobre o efeito dessa mutação.

As análises estatísticas não demonstram diferença estatisticamente significativa entre os valores da ferritina e da saturação da transferrina nos heterozigotos e nos não portadores da mutação.

A maioria dos indivíduos, com ferritina elevada, não apresentou aumento concomitante da saturação de transferrina, sugerindo um mecanismo de

acúmulo de ferro diferente do que ocorre na hemocromatose hereditária relacionada ao gene *HFE*. Outros mecanismos, não relacionados às reservas de ferro orgânico, podem estar contribuindo para os resultados observados.

Para justificar a heterogeneidade desses indivíduos outros fatores devem estar envolvidos no mecanismo de regulação do metabolismo do ferro em portadores de beta talassemia heterozigota.

7 Referências

ADAMS, P. C. et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. **Hepatology**, v. 352, p. 1769-1778, 2005.

AGOSTINHO, M. F. et al. Mutations analysis of HFE gene in Brazilian population. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 25, p. 324-327, 1999.

ANDERSEN, A. et al. Hemochromatosis mutations in general population: iron overload progression rate. **Blood**, v. 103, p. 2914-2919, 2004.

ANDREWS, N. C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 159-168, 2005.

BARTON, J. C.; EDWARDS, C. Q. Hemochromatosis: population genetics. In: FAIRBANKS, V. F. **Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment**. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p.42-50.

BARTON, J. C.; EDWARDS, C. Q. Inheritance of hemochromatosis: family studies. In: MILMAN, N. **Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment**. Cambridge: Cambridge University Press; p. 15-41, 2000.

BASSETT, M. L. et al. Diagnosis of hemochromatosis in young subjects: predictive accuracy of biochemical screening tests. **Gastroenterology**, v. 87, n. 3, p. 628-633, 1984.

BERTUZZO, C. S.; SONATTI, M. F.; COSTA, F. F. Hematological phenotype and the type of β thalassemia mutation in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 2, p. 319-321, 1997.

BITTENCOURT, P. L. et al Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of HFE gene in Brazilian patients with Hemochromatosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 329-335, 2002.

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

BRIDLE, K. R. et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. **Lancet**, v. 361, p. 669-673, 2003.

BRITTENHAM, G. M. et al. Preserving the national blood supply. **Hematology**, p. 422-432, 2001.

BROWDLER, A. J.; HUEHNS, E. R. Thalassaemia minor complicated by excessive iron storage. **British Journal of Haematology**, v. 9, p.13, 1963.

CAMASCHELLA, C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of Hemochromatosis and related disorders. **Blood**, v. 106, n.12, 2005.

CAMASCHELLA C. et al. The gene TfR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. **Nature Genetics**, v. 25, p. 14-15, 2000.

CANÇADO, R. D., et al. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. **São Paulo Medical Journal**, v.142, n. 2, p. 55-60, 2006.

CAO, A. et al. Clinical experience of management of thalassemia. The Sardinian experience. **Seminars in Hematology**, v.33, p. 66-75, 1996.

CASSANELLI, S. et al. Frequency and biochemical expression of C282Y/H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations in the healthy adult population in Italy. **Journal of Hepatology** , v. 34, p. 523-528, 2001.

CAVIL, I. Erythropoiesis and iron. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 15, p. 399-409, 2002.

CAZZOLA M. et al. Juvenile idiopathic haemochromatosis: a life threatening disorder presenting as hypogonadism. **Human Genetics**, v. 65, p. 149-154, 2003.

CAZZOLA, M. et al. Juvenile genetic hemochromatosis is clinically and genetically distinct from the classical HLA-related disorder. **Blood**, v. 92, p. 2979-2981, 1998.

CLARKE, M.G.; HIGGINS, N. T. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. **Clinical Chemistry**, v. 46, n.8 (B), p.1284-1290, 2000.

DACIE, J. V.; Lewis, S. M. **Practical Haematology**. 6. ed. London: Churchill, 1985.

De GOBBI, M. et al. Natural history of juvenile haemochromatosis. **British Journal of Haematology**, v. 117, p. 973-979, 2002.

De MARCO, F. et al. High prevalence of non-HFE gene associated haemochromatosis in patients from southern Italy. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n.1, p. 17-24, 2004.

DIESSEROTH, A. et al. Localization of human alpha globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. **Cell**, v.12, p. 205, 1977.

DONOVAN, A. et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1, identifies a conserved vertebrate iron exporter. **Nature**, v. 403, p.776-781, 2000.

DONOVAN, A. et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. **Cell Metabolism**, v.1, p. 191-200, 2005.

EASTMAN, J. W. et al. Automated HPLC screening of newborns for sickle cell, anemia and other hemoglobinopathies. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 704-710, 1996.

EDWARDS, C. Q. et al. Coincidental nontransfusional iron overload and thalassemia minor association with HLA linked hemochromatosis. **Blood**, v. 58, n. 4, p. 844-848, oct. 1981.

EZQUER, F. et al. Hereditary Hemochromatosis: An opportunity for gene therapy. **Biological Research**, v. 39, p. 113-124, 2006.

FARGION, S. et al. Iron overload in subjects with beta thalassemia trait. Role of idiopathic haemochromatosis gene. **British Journal of Haematology**, v. 61, p. 487,1985.

FARGION, S. et al. The iron status of Italian subjects with beta thalassemia trait. **Acta Haematologica**, v. 68, p. 109-114, 1982.

FEDER, J. N. et al. A novel MHC class I – like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nature Genetics**, v. 13, p. 399-408, 1996.

FEDER, J. N. et al. The Hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2 microglobulin interaction and cell surface expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 14025-14028, 1997.

FLEMING, R. E.; BRITTON, R. S. HFE and regulation of intestinal iron absorption. **AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. GI 290, p. 590-594, 2006.

FLEMING, R.E. et al. Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 2214-2219, 2000.

FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. I. Intestinal iron absorption and its regulation. **AJP-Gastrointestinal Liver Physiology**, v.289, p. G831- G8335, 2005.

FRITSCH, E. F; LAWN, R. M.; MANIATTIS, T. Molecular cloning and characterization of the human beta like globin gene cluster. **Cell**, v. 19, p. 959-972, 1980.

GALANELLO, R..et al. Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders. **Thalassaemia International Federation Publications**, v.1, p. 190, 2003.

GANZ, T. Hepcidin – a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v.. 18, n. 2, p. 171-182, 2005.

GAREWAL, G. et al. Prevalence of the H63D mutation of the HFE in north India: its presence does not cause iron overload in beta thalassemia trait. **European Journal of Haematology**, v. 74.N4.p.336-6, 2005.

GIRELLI, D. et al. Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1295-1302, 2002.

GOCHEE P. A. et al. A population – based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. **Gastroenterology**, v. 122, p. 646-651, 2002.

HATTORI, A. et al. AVAQ594-597 deletion of the Tfr2 gene in a Japanese family with hemochromatosis. **Hepatology Research**, v.26, p. 154-156, 2003.

JACOLOT, S. et al. HAMP as a modifier gene that increase the phenotypic expression of the HFE p. C282Y homozygous genotype. **Blood**, v. 103, p. 2835-2840, 2004.

JAZAYERI, M. et al. Frequency of HFE gene mutation in Iranian beta-thalassaemia minor patients. **European Journal of Haematology**, v. 71, n. 6, p. 408-417, 2003.

KAWABATA, H. et al. Transferrin receptor 2 alpha supports cell growth both in iron chelated cultured cells and in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 16618-16625, 2000.

KAWABATA, H et al. Expression of hepcidin is down regulated in Tfr2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary Hemochromatosis. **Blood**, v. 105, p. 376-381.

KAWABATA, H. Molecular cloning of transferrin receptor-like family. **Journal Biological Chemistry**, v.274, p. 20826-20832, 1999.

LAMON, J. M. et al. Idiopathic hemochromatosis in a young female: a case study and review of syndrome in young people. **Gastroenterology**, v. 76, p. 178-183, 1979.

Le GAC, G. et al. The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. **Human Molecular Genetics**, v. 13, p. 1913-1918, 2004.

LEE, P. L. et al. A study of genes that may modulate the expression of hereditary hemochromatosis: transferrin receptor-1, ferroportin, ceruloplasmin, ferritin light and heavy chains, iron regulatory proteins (IRP) -1 and -2, and hepcidin. **Blood Cells, Molecular, and Diseases**, v. 27, p. 783-802, 2001.

LEE, R. G. et al. Wintrobe's Clinical Hematology. In: DESSYPRIS E. N. **Erythropoiesis**. 10. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. v. 1, p. 169-192.

LEE, R. G. et al. Wintrobe's Clinical Hematology. In: LUKES J. **The Thalassemias and related disorders of hemoglobin synthesis**. 10. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. v. 1, p. 1405-1448.

LEWIS M.; LEE G. R.; HAUT A. The association of hemochromatosis with thalassemia minor. **Annals of Internal Medicine**, v. 63, p. 122, 1965.

MACKENZIE, B.; GARRICK M. D. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. **AJP- Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 289, p. G 981-G 986, 2005.

MARINI, M. A. et al. The distal β globin CACCC box is required for maximal stimulation to the β globin gene by EKLF. **British Journal of Haematology**, v. 127, n. 1, p.114, 2004.

MARTINS, R. et al. The role of HFE mutations on iron metabolism in beta thalassemia carriers. **Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 651-655, 2004.

MELIS, M. A. et al. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. **Haematologica**, v. 87, n. 3, p. 242-245, 2002.

MENDES-SIQUEIRA, F. A. **Contribuição para o estudo das alterações moleculares e interferentes na expressão fenotípica das hemoglobinas a partir de um programa de triagem neonatal**. Tese de doutorado em Genética. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

MERRYWEATHER-CLARKE, A. T. et al. Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. **Human Molecular Genetics**, v. 12, p. 2241-2247, 2003.

MERRYWEATHER-CLARKE, A. T. et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. **Genetic Testing**, v. 4, p. 183-198, 2000.

MERRYWEATHER-CLARKE, A. T. et al. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. **Journal of Medical Genetics**, v. 34, p. 275-278, 1997.

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

MONTOSI, G. et al. Autosomal dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportina (SLC11A3) gene. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 619-623, 2001.

NEMETH, E. et al. Hepcidin is decrease in TFR2 hemochromatosis. **Blood**, v. 105, p. 1803-1804, 2005.

NICOLAS, G. et al Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of Hemochromatosis. **Nature Genetics**, v. 34, p. 97-101, 2003.

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

NUSSBAUM, R. L.; McINNES R. R.; WILLARD H. F. Genética Médica. In:_____. **Fundamentos das Doenças Moleculares: Lições das Hemoglobinopatias**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 158-177.

OLIVEIRA, T. M. et al. Analysis of HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n. 12, p. 1575-1580, 2006.

OLYNYK, J. K. et al. A population-based study of the clinical expression of the Hemochromatosis gene. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 718-724, 1999.

PAPANIKOLAOU, G. et al. Mutation in HFE 2 cause iron overload in chromosome 1q linked juvenile hemochromatosis. **Nature Genetics**, v. 36, p. 77-82, 2004.

PEARSON, H. A. et al. Erythrokinetic studies in thalassemia trait. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 56, p. 866, 1960.

PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints simple non – isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v. 12, p. 14-52, 1991.

PIETRANGELO, A. et al. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in hemochromatosis gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 725-732, 1999.

PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 2383-2397, 2004.

PIETRANGELO, A. Hereditary Hemochromatosis. **BBA–Molecular Cell Research**, p. 700-710, 2006.

PIPERNO, A. et al. Haemochromatosis in patients with β -thalassaemia trait. **British Journal of Haematology**, v. 111, p. 908-914, 2000.

PIPERNO, A.; SAMPIETRO, M.; PIETRANGELO, A. Heterogeneity of Hemochromatosis in Italy. **Gastroenterology**, v. 114, p. 996-1002, 1998.

PIPPARD, M. J.; WAINSCOAT, 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.

REES, D. C. et al. Nontransfusional iron overload in thalassemia. Association with hereditary Hemochromatosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 850, p. 490-494, 1998.v. 39, n. 12, p. 1575-1580, 2006.

RIVA, A. et al. Type 3 hemochromatosis and beta-thalassemia trait. **European Journal of Haematology**, v. 72, n. 5, p. 370-374, may 2004.

ROCHETTE, J. et al. Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations. **American Journal of Human Genetics**, v. 64, p. 1056-1062, 1999.

ROETTO, A. et al. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. **American Journal of Human Genetics**, v. 64, p. 1388-1393, 1999.

ROETTO, A. et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidina is associated with severe juvenile hemochromatosis. **Nature Genetics**, v. 33, p. 21-22, 2003.

RUIZ-ARGUILLES, G. J. et al. Heterozygosity for the H63D mutation in hereditary hemochromatosis (HFE) gene may lead into severe iron overload in beta-thalassemia minor: observations in thalassemic kindred. **Revista de Investigación Clínica**, v. 53, n. 2, p. 117-120, 2001.

RUND, D. et al. Mean corpuscular volume of heterozygotes for β thalassemia correlates with the severity of mutations. **Blood**, v. 79, n. 1, p. 238-243, 1992.

SANCHEZ, M. et al. Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. **Journal of Hepatology**, v. 29, p. 725-728, 1998.

SIAH, C. W. et al. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 27, n.1, p. 5-16, 2006.

SINISCALCO, M. et al. Population genetics of haemoglobin variants, thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, with particular reference to the malaria hypothesis. **Bull WHO**, v. 34, p. 379, 1966.

SONATI, M. F. et al. Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. **Hemoglobin**, v. 20, p. 175-179, 1996.

SWINKELS, D. W. et al. Hereditary Hemochromatosis: Genetic complexity and new diagnostic approaches. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 950-968, 2006.

TAKESHITA, K. Thalassemia Beta Disponível em: <<http://www.emedicine.com/med/>>. Acesso em 15 de dezembro de 2006.

THEIL, E. C. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1549s-1553s, 2003.

TRUDEL, M.; CONSTANTINE, F. A 3'enhancer contributes to the stage-specific expression of the human beta globin gene. **Genes**, v. 1, n.6, p. 954-961, 1987.

VULPE et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologua implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. **Nature Genetics**, v. 21, p. 195-199, 1999.

WAALEN, J. et al. Prevalence of Hemochromatosis-related symptoms among individuals with mutations in the HFE gene. **Mayo Clinic Proceedings**, v.77, p. 522-530, 2002.

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

WALTERS, G. O.; MILLER, F. M.; WORWOOD, M. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. **Journal of Clinical Pathology**, v. 26, n. 10, p. 770-772, 1973.

WESSLING-RESNICK, M. Transfer of iron from the mucosa into circulation. **AJP – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. GI 290, p. 1-6, 2006.

WILLIAMS C. E.; SIEMSEN A. W. Hemosiderosis in association with thalassemia minor. **Archives of Internal Medicine**. v.121, p. 356, 1968.