

Artigo / Article

Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro

Study of C282Y, H63D and S65C mutations in the HFE gene in Brazilian patients with iron overload

Rodolfo D. Cançado
Aline C. O. Guglielmi
Carmen S. V. Vergueiro
Ernani G. Rolim
Maria Stella Figueiredo
Carlos S. Chiattonne

Hemocromatose é uma das doenças genéticas mais frequentes no ser humano e uma das causas mais importantes de sobrecarga de ferro. Os objetivos deste estudo foram determinar a frequência das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro, verificar a coexistência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C e consumo excessivo de bebida alcoólica nestes doentes e avaliar a influência destas variáveis sobre os depósitos de ferro do organismo. Saturação da transferrina, ferritina sérica e análise das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE, pelo método da PCR, foram determinadas em cinquenta doentes com sobrecarga de ferro atendidos no Hemocentro da Santa Casa de São Paulo entre janeiro de 2000 e maio de 2004. A frequência de mutação do gene HFE nos doentes com sobrecarga de ferro foi de 76,0% (38/50). Saturação da transferrina e ferritina foram significativamente maiores nos doentes homocigotos para a mutação C282Y confirmando a correlação entre genótipo C282Y/C282Y e maior risco de sobrecarga de ferro. A coexistência de hepatite C, consumo excessivo de bebida alcoólica ou anemia hemolítica hereditária estão implicados em aumento dos estoques de ferro e constituem fator de risco adicional em pacientes com mutação do gene HFE para a condição de sobrecarga de ferro. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(4):351-360.

Palavras-chave: Ferritina; sobrecarga de ferro; mutação; heterocigoto; homocigoto; hemocromatose/genética.

Introdução

Os avanços técnicos e científicos obtidos nas últimas décadas, particularmente com o desenvolvimento da biologia molecular, permitiram maior conhecimento do metabolismo normal do ferro, dos principais fatores relacionados à sua regulação bem como dos distúrbios que podem resultar em deficiência ou sobrecarga de ferro.¹⁻⁴

Até a década de 90, hemocromatose hereditária (HH) era considerada doença rara, acometendo predominantemente indivíduos do sexo masculino, cujo diagnóstico era realizado, na maioria das vezes, em doentes internados ou por autópsia.⁵

A partir de 1996, a identificação do gene HFE e de suas mutações possibilitaram o diagnóstico precoce da HH, que passou a ser considerada uma das doenças genéticas mais frequentes do ser humano, sobretudo em indivíduos caucásianos do nordeste Europeu.^{2,4-7}

A constatação de que a pronta instituição do tratamento é capaz de prevenir o aparecimento de complicações orgânicas graves e, até mesmo, reverter possíveis lesões orgânicas funcionais já estabelecidas, proporcionando melhor qualidade de vida e maior sobrevida ao doente, colocou em evidência a importância de estudos populacionais com o objetivo de identificar os doentes portadores de HH o mais precocemente possível.⁸⁻¹¹

Trabalho realizado na Disciplina de Hematologia e Oncologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondência: Rodolfo Delfini Cançado
Hemocentro da Santa Casa de São Paulo
Rua Marquês de Itú, 579 – 2º andar
01223-001 – São Paulo-SP – Brasil
E-mail: rdcan@uol.com.br

O número reduzido de indivíduos com diagnóstico de hemocromatose frente à elevada frequência das mutações do gene HFE chamou a atenção dos pesquisadores quanto à hipótese de penetrância incompleta do gene mutante.¹²⁻¹⁴ De fato, estima-se que 40,0% a 70,0% dos indivíduos homocigotos para a mutação C282Y desenvolverão evidência laboratorial de sobrecarga de ferro e que, pelo menos, 50,0% dos homens e 25,0% das mulheres com esse genótipo desenvolverão complicações clínicas secundárias ao acúmulo de ferro.^{12,14-16}

A expressão fenotípica da HH é bastante variável e sofre influência de fatores genéticos, clínicos e ambientais que podem interferir no metabolismo do ferro e no curso clínico da doença, determinando que indivíduos heterocigotos para o gene mutante possam expressar o fenótipo de hemocromatose semelhante aos indivíduos homocigotos.^{9,16}

Os estudos brasileiros publicados estimam que a prevalência da mutação C282Y é cerca de três a oito vezes menor comparada à observada nos indivíduos caucasianos do nordeste europeu, enquanto a frequência das mutações H63D e S65C é semelhante entre estas populações.¹⁷⁻²¹

Entretanto, não encontramos nenhum trabalho que tenha analisado os efeitos do genótipo HFE sobre o estado de ferro do organismo e a influência de fatores genéticos, clínicos ou ambientais nos doentes com mutação do gene HFE.

O crescente número de publicações estrangeiras demonstrando a importância deste assunto, associado à observação do pequeno número de publicações brasileiras, motivou o desenvolvimento do presente trabalho com a intenção de contribuir para melhor conhecimento da hemocromatose hereditária no Brasil.

Objetivos

Os objetivos desse estudo foram determinar a frequência das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro, verificar a coexistência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C e consumo excessivo de bebida alcoólica nestes doentes, e avaliar a influência dessas variáveis sobre os depósitos de ferro do organismo.

Casuística e Método

Casuística

No período de janeiro de 2000 a maio de 2004, foram estudados cinquenta doentes com evidência laboratorial de sobrecarga de ferro encaminhados ao Hemocentro da Santa Casa de São Paulo para a investigação da causa da sobrecarga de ferro. Quarenta e oito doentes não referiam transfusão prévia de concentrado de hemácias, enquanto dois, ambos do sexo feminino e com anemia falciforme, relatavam transfusão de hemácias (4 unidades e 10 unidades, respectivamente), porém foram incluídos neste estudo porque apresentavam valores de ferritina muito superiores aos esperados em de-

corrência deste fato, justificando, portanto, a suspeita de hemocromatose.

Definição de sobrecarga de ferro

Definiu-se sobrecarga de ferro quando da presença de pelo menos duas determinações da saturação de transferrina igual ou maior que 50,0% e 60,0% para o sexo feminino e masculino, respectivamente; e/ou da ferritina sérica maior que 200 ng/ml para o sexo feminino ou maior que 300 ng/ml para o sexo masculino.^{11,15}

Método

Todos os doentes, após aceitarem participar deste estudo, foram submetidos aos seguintes procedimentos: história clínica (incluindo os seguintes dados: idade, sexo, cor, naturalidade, procedência, sintomas e sinais clínicos, doação de sangue, transfusão de sangue, perda crônica de sangue, consumo excessivo de bebida alcoólica, uso prolongado de medicamentos contendo ferro ou vitamina C) e exame físico, seguido da coleta de amostra de sangue, em jejum, para a realização dos seguintes exames: hemograma completo com contagem de plaquetas e de reticulócitos, ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro, ferritina, glicemia, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, bilirrubina total e frações, eletroforese de hemoglobina, sorologia para hepatite B e hepatite C, e extração do DNA genômico a partir dos leucócitos periféricos para a análise das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE.

Variáveis clínicas investigadas

Grupo étnico

Quanto ao grupo étnico, os participantes foram classificados em caucasóides e não-caucasóides, baseando-se na observação subjetiva do entrevistador, que considerou a cor da pele, o tipo do cabelo, o formato dos olhos e do nariz, e a espessura dos lábios de acordo com Boyd.²² Essa classificação foi escolhida devido à baixa acurácia na detecção dos tipos mulato claro, mulato escuro e negro e à pequena quantidade de indivíduos da etnia amarela existente nas amostras estudadas. Assim, mulatos claros, mulatos escuros, pretos e amarelos foram classificados como não-caucasóides.

Consumo excessivo de bebida alcoólica

Definiu-se consumo excessivo de bebida alcoólica a ingestão diária referida de etanol acima de 60,0 g e durante período de, pelo menos, 5 anos.²³

Para calcular em gramas a quantidade diária de etanol ingerida, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade ingerida/dia} = (\text{dose em ml} \times \text{grau da bebida} \times 0,8) / 100$$

Os graus das bebidas são: cerveja 4, vinho 12, conhaque 40, rum 40, uísque 43 e cachaça 46.

Variáveis laboratoriais estudadas

Eritrograma

O número de eritrócitos, o valor da hemoglobina, o valor do hematócrito e os índices eritrocitários foram determinados utilizando-se método eletrônico, automatizado, da marca Cell-Dyn, modelo 3000, fabricado pela Companhia Abbott Laboratories, calibrado regularmente com controle interno e externo.

Ferro sérico e capacidade total de ligação de ferro (CTLF)

Realizou-se a dosagem do ferro sérico pelo método colorimétrico utilizando-se reagente da Companhia Bayer e a dosagem da CTLF pelo método colorimétrico utilizando-se reagente da Companhia Labtest.

Índice de saturação da transferrina (IST)

O índice de saturação da transferrina foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$IST = \frac{\text{ferro sérico}}{CTLF} \times 100$$

Ferritina sérica

Realizou-se dosagem da ferritina sérica pelo método de enzimaímunoensaio com o emprego de reagentes da Companhia Abbott. De acordo com o fabricante, foram considerados como valores normais: 15 a 200 ng/ml para o sexo feminino e 20 a 300 ng/ml para o sexo masculino.

Análise da morfologia eritrocitária, eletroforese de hemoglobina, dosagem quantitativa das hemoglobinas A₂, Fetal e S, pesquisa intra-eritrocitária de corpos de Heinz e hemoglobina H.

Em todos os participantes deste estudo realizou-se análise da morfologia eritrocitária em extensão sangüínea após coloração com hematoxilina-eosina e eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose utilizando-se tampão TEB com pH.^{8,6} Nos indivíduos com padrão eletroforético anormal e/ou alteração da morfologia eritrocitária, realizou-se eletroforese de hemoglobina em pH ácido, pesquisa intra-eritrocitária de corpos de Heinz e agregados de hemoglobina H utilizando-se coloração com o azul de cresil brilhante a 1,0%, e quantificação das hemoglobinas A₂, Fetal e S. (Naoum *et al.*)²⁴

Contagem de esferócitos e curva de fragilidade osmótica eritrocitária

Realizou-se contagem de esferócitos em extensões sangüíneas após coloração com corante de Rosenfeld e a curva de fragilidade osmótica eritrocitária segundo método proposto por Dacie *et al.*²⁵

Para esferocitose hereditária utilizaram-se os seguintes critérios: contagem aumentada de esferócitos no sangue

periférico (5,0%-25,0%) e curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos desviada para a direita.²⁵

Crítérios laboratoriais utilizados para o diagnóstico de anemia falciforme e talassemia

Para o diagnóstico de anemia falciforme utilizaram-se os seguintes critérios laboratoriais: presença de hemácias falciformes à extensão do sangue periférico, reticulocitose (10,0%-20,0%), diminuição da concentração da hemoglobina circulante (5,0-9,0 g/dl), hemoglobina Fetal entre 2,0% e 10,0%, ausência da hemoglobina A e concentração da hemoglobina S maior que 90,0%.

Definiram-se talassemia beta menor os doentes que apresentavam: microcitose e hipocromia à extensão do sangue periférico com concentração da hemoglobina circulante normal (hemoglobina maior que 12,0 g/dl e 13,0 g/dl para o sexo feminino e masculino, respectivamente) ou diminuída, concentração da hemoglobina A₂ maior que 4,0%, concentração da hemoglobina fetal entre 0,0% e 5,0%.

Definiram-se talassemia alfa os doentes que apresentavam: microcitose e hipocromia à extensão do sangue periférico, concentração da hemoglobina circulante normal ou diminuída, concentração da hemoglobina A₂ normal (2,0-4,0%), pesquisa positiva de corpos de Heinz e agregados de hemoglobina H e/ou presença de hemoglobina H detectada pela eletroforese em tampão fosfato, pH 6,5-7,0. (Naoum *et al.*)²⁶

Outras dosagens bioquímicas

Determinaram-se as concentrações e/ou atividades dos seguintes parâmetros: glicemia, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, desidrogenase láctica, bilirrubina total e frações utilizando-se método enzimático colorimétrico.

Teste imunológicos

Para a pesquisa do anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus B da hepatite (HbsAg) e do anticorpo contra o vírus C da hepatite (anti-HCV) utilizou-se a técnica de enzimaímunoensaio por micropartículas com o emprego de reagentes de procedência das empresas Abbott, para o anti-HCV, e Biomerieux, para o HbsAg.

Extração do DNA

Realizou-se a extração do DNA genômico a partir dos leucócitos periféricos utilizando-se método descrito por Miller²⁷ modificado por Lahiri *et al.*²⁸ e Salazar *et al.*²⁹

Amplificação do DNA

As amostras de DNA genômico obtidas foram amplificadas pela técnica de PCR, segundo Feder *et al.*³⁰ e Simonsen *et al.*³¹ com o auxílio de termociclador de temperatura da marca PTC 100 (MJ Research, Inc). O Quadro 1 descreve os iniciadores específicos (*primers*) utilizados, a seqüência e o tamanho do produto da PCR para amplificação dos fragmen-

tos dos éxons 2 e 4, onde localizam-se as três mutações do gene HFE a serem estudadas.

Os produtos das reações foram aplicados em gel de agarose a 2,0% para realização de eletroforese em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1x e azul de bromofenol a 1,0%, utilizado para corar o DNA amplificado, por 1 hora a 80 volts e 55 mA. A observação da amplificação ocorreu após coloração com brometo de etídio e visualização sob transiluminação ultravioleta.

Digestão do DNA amplificado com enzima de restrição

Para a confirmação de cada mutação do gene HFE, utilizamos as enzimas de restrição específicas conforme observava-se no Quadro 2. Para cada enzima de restrição utilizou-se tampão correspondente fornecido pelo fabricante. Utilizou-se enzima de restrição HinfI da empresa Invitrogen e enzimas RsaI e DpnII da empresa New England Biolabs.

Quanto à interpretação dos diferentes genótipos HFE, os possíveis fragmentos obtidos após as reações de digestão também estão esquematizados no Quadro 2.

Avaliação qualitativa do ferro hepático

Para a determinação do ferro hepático utilizou-se método histoquímico de coloração do ferro não-hemínico pelo azul da Prússia (Reação de Perls). Avaliou-se a quantidade

dos depósitos de ferro nos hepatócitos pela graduação arbitrária de 0 (ausente) a IV de acordo com Scheuer et al.³² Os graus 0 e I foram considerados normais, enquanto os graus II a IV considerados aumento do ferro. As biópsias foram revistadas por patologistas do Serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Análise estatística

Aplicaram-se, quando apropriado, os seguintes testes estatísticos: teste t de Student não pareado para comparação das médias das variáveis contínuas; teste do Qui-quadrado para comparação das proporções das variáveis categorizadas; e, para comparar as frequências alélicas e genotípicas, teste exato de Fisher, teste não-paramétrico de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis. Estabeleceu-se alfa de 5,0% para análise de significância, sendo o banco de dados processado e os cálculos realizados no software SPSS, versão 11.0.

Resultados

Foram estudados cinquenta doentes com sobrecarga de ferro, sendo 35 homens e 15 mulheres, com idade mediana de 51 anos, variando entre 35 anos e 78 anos. Todos eram brasileiros e sem qualquer grau de parentesco.

As características dos doentes de acordo com o sexo e o grupo étnico, e a distribuição dos doentes de acordo a faixa etária estão demonstradas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Na tabela 3 observam-se os valores da saturação da transferrina e da ferritina sérica dos doentes.

A frequência de mutação do gene HFE foi de 76,0% (38/50). A frequência dos diferentes genótipos HFE encontra-se na tabela 4. Não se observou nenhum doente com a mutação S65C do gene HFE.

A frequência alélica para as mutações C282Y e H63D do gene HFE nos doentes foi de 43,0% e 18,0%, respectivamente, conforme observa-se na tabela 5.

Na tabela 6 observa-se a distribuição dos doentes segundo o genótipo HFE e a idade. Os valores da saturação da transferrina e da ferritina sérica de acordo com o genótipo HFE estão demonstrados nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Dos cinquenta doentes estudados, 25 (50,0%) apresentavam, concomitantemente, anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica. Nenhum doente apresentava sorologia reagente para o vírus B da hepatite. A distribuição dos doentes com uma ou mais destas variáveis de acordo com o genótipo HFE encontra-se na Tabela 9.

Quadro 1. Descrição dos primers utilizados, sua seqüência e tamanho do produto da PCR para amplificação de fragmentos dos éxons 2 e 4^{30,31}

Primer	Seqüência	Tamanho do produto
Fragmento 1 (éxon 2): mutações H63D e S65C		
His-F1 sense	5'- TCA CAC TCT CTG CAG TAC CTC TTC ATG G - 3'	223 pb
His-R4 antisense	5'- TAC ACA GTG AAC ATG TGA TCC CAC C - 3'	
Fragmento 2 (éxon 4): mutação C282Y		
Cys-F6 sense	5' - TGC CTC CTT TGG TGA AGG TGA CAC - 3'	343 pb
Cys-R5 antisense	5' - CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC - 3'	

Quadro 2. Mutações analisadas no gene HFE, enzima de restrição correspondente e produtos obtidos após a digestão de acordo com genótipo normal, homocigoto e do heterocigoto para cada mutação estudada

Mutação	Enzima de restrição	Fragmentos obtidos após digestão (pares de bases)		
		Normal	Homocigoto	Heterocigoto
C282Y	Rsa I GT↓AC	203 e 140	203, 111 e 29	203, 140, 111 e 29
H63D	Dpn II ↓GATC	118 e 105	223	223, 118 e 105
S65C	Hinf I G↓ANTC	112, 69	181	181, 112, 69

Tabela 1. Distribuição dos 50 doentes de acordo com o sexo e o grupo étnico

Variável	Categoria	n	%	Valor de p*
Sexo	Masculino	35	68,0	0,02
	Feminino	15	32,0	
Grupo étnico	Caucasóide	43	86,0	0,01
	Não-Caucasóide	7a	14,0	

n = número de doentes em cada grupo
a = 4 doentes mulatos, 1 preto e 2 amarelos
(*)=Teste do Qui-quadrado

Tabela 2. Distribuição dos 50 doentes segundo a faixa etária

Faixa etária (anos)	n	%
18 a 30	2	4,0
31 a 50	25	50,0
51 a 70	22	44,0
> 70	1	2,0
Total	50	100,0

n = número de doentes em cada grupo

Tabela 3. Distribuição dos valores da saturação da transferrina e da ferritina sérica dos doentes

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Saturação da Transferrina (%)	60,8	17,6	20,3	90,0
Ferritina (ng/ml)	1720,4	1110,0	324,0	5265,0

Tabela 4. Freqüência dos genótipos HFE nos doentes

Genótipo HFE	n	Freqüência genotípica (%)
C282Y / C282Y	15	30,0
C282Y / H63D	7	14,0
H63D / H63D	1	2,0
C282Y / WT	7	14,0
H63D / WT	8	16,0
Normal	12	24,0
Total	50	100,0

n = número de doentes em cada grupo

Tabela 5. Freqüência alélica das mutações C282Y e H63D do gene HFE nos doentes

Mutação do gene HFE	n	Número de alelos estudados	Número de alelos mutantes	Freqüência alélica (%)
C282Y	50	100	43	43,0
H63D	50	100	18	18,0

n = número de doentes em cada grupo

Tabela 6. Distribuição dos 50 doentes segundo a idade e o genótipo HFE

Genótipo HFE	n	Idade (anos)			
		Mediana	DP	Mínima	Máxima
C282Y / C282Y	15	53,0	8,2	41,0	67,0
C282Y / H63D	7	44,0	14,5	25,0	68,0
H63D / H63D	1	44,0	-	-	-
C282Y / WT	7	54,0	7,4	44,0	67,0
H63D / WT	8	45,5	6,3	34,0	53,0
Normal	12	51,0	13,5	28,0	78,0

n = número de doentes em cada grupo; WT(*wild type*) = Normal; Genótipo HFE alterado *versus* normal: p=0,09 (Teste t de Student e de Kruskal-Wallis)

Tabela 7. Distribuição dos 50 doentes de acordo com o valor da saturação da transferrina e o genótipo HFE

Genótipo HFE	n	Saturação da Transferrina (%)			
		Média	DP	Mínima	Máxima
C282Y / C282Y	15	68,4	13,9	42,5	87,0
C282Y / H63D	7	59,8	17,0	32,5	85,0
H63D / H63D	1	57,0	-	-	-
C282Y / WT	7	60,1	12,2	36,0	70,0
H63D / WT	8	51,0	13,9	26,6	66,0
Normal	12	54,6	28,3	20,3	90,0

n = número de doentes em cada grupo; WT(*wild type*) = Normal; DP = desvio padrão; Genótipo C282Y / C282Y *versus* demais genótipos HFE: p=0,02 (Teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis)

Tabela 8. Distribuição dos 50 doentes de acordo com o valor da ferritina sérica e o genótipo HFE

Genótipo HFE	n	Ferritina (ng/ml)			
		Média	DP	Mínima	Máxima
C282Y / C282Y	15	2188,5	1378,5	550,0	5265,0
C282Y / H63D	7	1778,7	861,2	537,0	2862,0
H63D / H63D	1	1200,0	-	-	-
C282Y / WT	7	1424,4	457,9	890,0	2324,0
H63D / WT	8	1178,0	803,4	500,0	2500,0
Normal	12	1674,0	1140,0	324,0	2900,0

n = número de doentes em cada grupo; WT(*wild type*) = Normal; DP = desvio padrão; Genótipo C282Y/C282Y *versus* demais genótipos: p<0,01 (Teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis)

Dos dez (20,0%) doentes com diagnóstico de anemia hemolítica hereditária: três eram portadores de talassemia beta menor (dois com genótipo C282Y/C282Y e um C282Y/H63D), três doentes com talassemia alfa (dois com genótipo C282Y/H63D e um H63D/WT), dois doentes com esferocitose hereditária (um com genótipo C282Y/C282Y e outro C282Y/WT) e dois doentes com anemia falciforme (os dois com genótipo HFE normal).

Tabela 9. Distribuição dos 50 doentes de acordo o genótipo HFE e presença de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica

Genótipo HFE	Variável			Total N=50 n
	Anemia hemolítica hereditária n	Hepatite C n	Consumo excessivo de bebida alcoólica n	
C282Y / C282Y n=15	3	3	0	6 (12,0%)
C282Y / H63D n=7	3	0	0	3 (6,0%)
H63D / H63D n=1	0	0	1	1 (2,0%)
C282Y / WT n=7	1	2	2	5 (10,0%)
H63D / WT n=8	1	1	2	4 (8,0%)
Normal n=12	2	3	1	6 (12,0%)
Total N=50	10 (20,0%)	9 (18,0%)	6 (12,0%)	25 (50,0%)

n = número de doentes em cada grupo; N = número total de doentes

Tabela 10. Distribuição dos doentes com mutação do gene HFE classificados de acordo com a idade e presença ou ausência de anemia hemolítica hereditária hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica

Anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica	n	Idade (anos)		
		Média	Mínima	Máxima
Presente	19	47,0	36,0	67,0
Ausente	19	52,0	40,0	78,0

n = número de indivíduos em cada grupo; p=0,03 (Teste t de Student)

Tabela 11. Distribuição dos valores da saturação da transferrina e da ferritina sérica dos doentes com mutação do gene HFE de acordo com presença ou ausência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica

Anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica	n	Saturação da transferrina %				Ferritina (ng/ml)			
		Média	DP	Mín	Máx	Média	DP	Mín	Máx
Presente	19	62,9	14,1	32,5	85,0	1732,5	806,6	500,0	5265,0
Ausente	19	62,2*	14,0	26,6	87,0	1494,0**	770,0	550,0	3352,0

n = número de indivíduos em cada grupo; DP = desvio padrão; Mín = mínimo; Máx = máximo; *p=0,98; **p=0,03 (Teste de Mann-Whitney)

Nenhum paciente com talassemia alfa, talassemia beta menor ou esferocitose hereditária havia recebido transfusão de hemácias previamente a este estudo. Os dois doentes com anemia falciforme eram do sexo feminino. Uma paciente, de 28 anos de idade, havia recebido dez unidades de concentrado de hemácias, enquanto que a outra paciente, de 63 anos de idade, havia recebido apenas quatro unidades de concentrado de hemácias.

Na tabela 10 observa-se a distribuição dos doentes com mutação do gene HFE de acordo com a idade e presença ou ausência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica.

Na tabela 11 demonstra-se a distribuição da saturação da transferrina e da ferritina sérica dos doentes com mutação do gene HFE de acordo com presença ou ausência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica.

A distribuição dos doentes sem mutação do gene HFE de acordo com a idade e presença ou ausência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica encontra-se demonstrada na tabela 12.

Na tabela 13 demonstra-se a distribuição da saturação da transferrina e da ferritina sérica dos doentes sem mutação do gene HFE de acordo com presença ou ausência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica.

Dos 16 doentes que realizaram biópsia hepática por punção transparietal ou via laparoscópica, todos apresentavam siderose hepática grau III ou IV. As principais características clínicas e laboratoriais destes doentes estão relacionadas na tabela 14.

Discussão

Frequência das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE

A frequência de doentes com diagnóstico de HH homocigotos para a mutação C282Y varia entre 60,0% e 100,0% dependendo da população estudada.^{30,34,35,41} A frequência dos demais genótipos segue a seguinte distribuição: 0,0 a 7,0% para o genótipo C282Y/H63D; 0,0 a 4,0% para o genótipo H63D/H63D; 0,0 a 15,0% para os genótipos heterocigotos (C282Y/WT, H63D/WT) e 0,0 a 21,0% com genótipo normal.^{16,36,42-44}

Neste estudo, a frequência da mutação do gene HFE nos doentes foi de 76,0%, sendo 15 (30,0%) com genótipo C282Y/C282Y; sete (14,0%) C282Y/H63D, um (2,0%) H63D/H63D; sete (14,0%) C282Y/WT; oito (16,0%) H63D/WT. Não se observou nenhum doente com a mutação S65C do gene HFE.

Brandhagen *et al.*,⁴⁵ estudando 82 doentes com diagnóstico histológico de sobrecarga de ferro, observaram que 85,0% deles eram homocigotos para a mutação C282Y do gene HFE. Altes *et al* (2003), analisando 150 doentes com evidência bioquímica de sobrecarga de ferro, observaram 44 (29,0%) doentes com mutação do gene HFE, sendo 24 (16,0%)

C282Y/C282Y, 14 (9,5%) C282Y/H63D e seis (4,0%) H63D/H63D.

Dos trabalhos brasileiros, Bittencourt *et al.*,⁴⁷ estudando 15 doentes brasileiros com diagnóstico histológico de HH, observaram 53,0% com genótipo C282Y/C282Y, 13,5% C282Y/WT ou H63D/WT. Bueno *et al.*,²¹ analisando oito doentes brasileiros com HH, observaram três (37,5%) doentes com genótipo C282Y/C282Y, um (12,5%) C282Y/H63D, um (12,5%) C282Y/WT.

Tabela 12. Distribuição dos doentes sem mutação do gene HFE de acordo com a idade e com a presença ou ausência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica

Anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica	n	Idade (anos)		
		Média	Mínima	Máxima
Presente	6	50,5	28,0	63,0
Ausente	6	51,0	28,0	78,0

n = número de indivíduos em cada grupo; p = 0,99 (Teste t de Student)

Tabela 13. Distribuição dos valores da saturação da transferrina e da ferritina sérica dos doentes sem mutação do gene HFE de acordo com presença ou ausência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica

Anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica	n	Saturação da transferrina %				Ferritina (ng/ml)			
		Média	DP	Mín	Máx	Média	DP	Mín	Máx
Presente	6	77,2	11,7	65,0	90,0	1967,6	1392,1	324,0	5265,0
Ausente	6	45,7 #	22,8	20,3	87,0	1419,0	1109,0	520,0	2600,0

n = número de indivíduos em cada grupo; DP = desvio padrão; Mín = mínimo; Máx = máximo; # p<0,001; ## p=0,01 (Teste de Mann-Whitney)

Desta forma, observamos que a frequência da mutação C282Y do gene HFE apresenta ampla variação dependendo não apenas da população estudada, mas também dos critérios adotados na seleção de cada amostra, particularmente quanto aos critérios utilizados para o diagnóstico de sobrecarga de ferro.

Quando o critério de seleção dos doentes inclui o diagnóstico histológico de sobrecarga de ferro e/ou determinação do ferro mobilizável por sangria terapêutica, a frequência de doentes com genótipo C282Y/C282Y é maior comparada àquela observada quando os doentes são selecionados a partir de parâmetros bioquímicos de sobrecarga de ferro.^{45,48,49}

A idade mediana dos doentes foi de 51 anos, variando entre 35 anos e 78 anos, com predomínio de indivíduos caucasoídes e do sexo masculino. Quanto à faixa etária, 50,0% encontravam-se entre 31 e 50 anos e 46,0% acima de 51 anos. Estes achados corroboram com os resultados observados em outros estudos brasileiros^{21,47,50} e estrangeiros.^{45,51}

Correlação genótipo-fenótipo e diagnóstico de hemocromatose hereditária

Didaticamente, a evolução clínica natural do doente com hemocromatose apresenta três estádios distintos: estágio 1) HH sem sobrecarga de ferro; estágio 2) HH com sobrecarga de ferro sem complicações clínicas; e estágio 3) HH com sobrecarga de ferro com complicações clínicas.³⁵

Tabela 14. Características clínicas e laboratoriais dos 16 doentes com siderose hepática grau III ou IV. (Hemocentro da Santa Casa de São Paulo, 2000-2004)

Doente	Idade (anos)	Sexo	Genótipo	Saturação da Transferrina (%)	Ferritina ng/ml	Cirrose hepática	Hepatite C	Consumo excessivo de bebida alcoólica
1	42	M	C282Y / C282Y	66,0	4218,0	Não	Não	Não
2	49	M	C282Y / C282Y	74,0	1411,0	Não	Não	Não
3	45	M	C282Y / C282Y	54,0	1573,0	Sim	Sim	Não
4	48	M	C282Y / C282Y	73,0	4000,0	Não	Não	Não
5	55	M	C282Y / C282Y	81,0	3352,0	Não	Sim	Não
6	49	F	C282Y / C282Y	84,0	5265,0	Sim	Não	Não
7	55	M	C282Y / C282Y	71,0	1088,0	Não	Sim	Não
8	54	F	H63D / WT	66,0	2324,0	Sim	Sim	Não
9	54	M	C282Y / WT	68,0	1200,0	Não	Não	Não
10	42	F (**)	H63D / WT	57,0	2500,0	Não	Não	Não
11	41	F (*)	C282Y / C282Y	75,0	1883,0	Não	Não	Não
12	49	F	C282Y / C282Y	55,0	5265,0	Sim	Não	Não
13	67	M	H63D / WT	36,0	1359,0	Sim	Não	Não
14	44	M	H63D / WT	55,0	1573,0	Sim	Sim	Não
15	51	M	Normal	65,0	1180,0	Sim	Sim	Sim
16	47	F	C282Y / WT	67,0	324,0	Não	Sim	Não

M = masculino; F = feminino; WT(wild type) = Normal; (*) = esferocitose hereditária; (**) = talassemia alfa

Estima-se que 40,0% a 70,0% dos indivíduos homocigotos para C282Y desenvolverão alguma evidência laboratorial de sobrecarga de ferro (estádio 2) e que, pelo menos, 50,0% dos homens e 25,0% das mulheres com este genótipo desenvolverão complicações clínicas secundárias à sobrecarga de ferro (estádio 3).^{12,14-16}

Neste estudo, a dosagem da saturação da transferrina e da ferritina sérica foram significativamente mais elevadas nos doentes homocigotos para a mutação C282Y do gene HFE que nos doentes com os demais genótipos.

Dos 16 doentes submetidos à biópsia hepática, todos apresentavam siderose hepática graus III ou IV, sendo nove (55,5%) com genótipo C282Y/C282Y, seis (37,5%) heterocigotos (dois C282Y/WT e quatro H63D/WT) e um (6,2%) com genótipo HFE normal.

Levando-se em consideração que os doentes eram semelhantes quanto à idade e o sexo, este achado está de acordo com os dados relatados na literatura e confirmam a existência de associação entre homocigose para a mutação C282Y do gene HFE e maior risco de sobrecarga de ferro.^{53,55}

Presença de mutação no gene HFE indica a existência de alteração genética relacionada à hemocromatose e maior predisposição do doente em desenvolver o fenótipo da doença, entretanto, não é suficiente para o diagnóstico de HH.^{14,35,56}

O diagnóstico de HH baseia-se na presença do genótipo C282Y/C282Y ou C282Y/H63D associado à elevação persistente dos valores da saturação da transferrina e/ou da ferritina sérica. Os doentes com outros possíveis genótipos HFE são considerados portadores de HH desde que seja constatada a sobrecarga de ferro, preferencialmente pelo exame histológico hepático.^{2,7,11,30,35,37,56,57}

Assim, neste estudo, o diagnóstico genotípico de HH foi confirmado em 23 (15 C282Y/C282Y e sete C282Y/H63D) dos cinquenta doentes estudados, o que corresponde a 46,0%. Entretanto, considerando-se os doentes heterocigotos para as mutações C282Y e H63D e o paciente sem mutação identificada, os quais apresentavam siderose hepática grau III/IV, chega-se a, pelo menos, 60,0% (30/50) dos doentes com diagnóstico de HH.

Associação do consumo excessivo de bebida alcoólica, da hepatite C e da anemia hemolítica hereditária e influência destas variáveis nos doentes com sobrecarga de ferro

A maioria dos estudos publicados tem mostrado a importância de fatores como consumo excessivo de bebida alcoólica, hepatite C e anemia hemolítica crônica, os quais podem desempenhar papel importante na predisposição à sobrecarga de ferro.^{7,35,36,44,52,58,59-62}

Neste estudo, os doentes com mutação do gene HFE e coexistência de uma das variáveis clínicas estudadas apresentavam idade mediana menor (47 anos *versus* 52 anos, $p=0,03$) e ferritina sérica maior (1732,5 ng/ml *versus* 1494,0; $p=0,03$) que os doentes com mutação e sem nenhum fator

clínico associado. Dos 16 doentes não homocigotos para a mutação C282Y ou C282Y/H63D (um H63D/H63D, sete C282Y/WT e oito H63D/WT), dez (62,5%) apresentavam algum fator clínico associado.

Estes resultados confirmam os relatados na literatura de que a coexistência de anemia hemolítica hereditária, hepatite C ou consumo excessivo de bebida alcoólica estão implicados no aumento dos estoques de ferro do organismo, acentuando a expressão fenotípica dos doentes com hemocromatose, e salientam a importância do acompanhamento dos indivíduos com mutação do gene HFE, mesmo em heterocigose.^{8,12,30,55}

Doentes com sobrecarga de ferro sem mutação do gene HFE

A frequência de doentes com diagnóstico de HH e com genótipo HFE normal varia entre 7,0% na população americana³⁰ e 21,0% na população italiana.³⁴

Neste estudo, 12 (24,0%) doentes não apresentavam nenhuma das três mutações do gene HFE. Aqueles com pelo menos um dos fatores clínicos estudados apresentavam valores significativamente mais elevados da saturação da transferrina e da ferritina sérica, indicando que estes fatores, independentemente da presença ou ausência de mutação do gene HFE, constituem fatores de risco adicionais para a condição de sobrecarga de ferro.

A frequência de doentes brasileiros com sobrecarga de ferro sem mutação do gene HFE em nosso estudo é menor que a encontrada em dois estudos brasileiros,^{21,47} provavelmente devido ao número reduzido de casos nestes estudos. Com relação aos estudos estrangeiros, esta frequência encontra-se mais próxima da observada em doentes do sul da Europa, sobretudo dos italianos, que a observada em doentes norte-americanos.

Conclusões

A frequência de mutação do gene HFE nos doentes com sobrecarga de ferro foi de 76,0% (38/50). A saturação da transferrina e a ferritina sérica foram significativamente maiores nos doentes homocigotos para a mutação C282Y confirmando a correlação entre genótipo C282Y/C282Y e maior risco de sobrecarga de ferro;

Anemia hemolítica hereditária, hepatite C e consumo excessivo de bebida alcoólica estão implicados no aumento dos estoques de ferro do organismo e constituem fatores de risco adicionais para a condição de sobrecarga de ferro acentuando a expressão fenotípica dos doentes com mutação do gene HFE.

Abstract

Hemochromatosis is one of the most frequent genetic diseases in humans and one of the most important causes of iron overload. The

aims of this study were to determine the frequency of C282Y, H63D and S65C mutations of the HFE gene in Brazilian patients with iron overload, to verify the coexistence of chronic hemolytic anemia, hepatitis C and excessive alcohol consumption and to evaluate the influence of these variables on body iron deposits. Transferrin saturation, serum ferritin and C282Y, H63D and S65C HFE gene mutations (by PCR method) were determined in 50 patients with iron overload in the Hemocentro da Santa Casa de São Paulo between January 2000 and May 2004. The frequency of the HFE gene mutations in patients with iron overload was 76.0% (38/50). Transferrin saturation and serum ferritin were significantly higher in homozygous patients with the C282Y mutation confirming the correlation between the C282Y/C282Y genotype and a higher risk of iron overload. The coexistence of chronic hemolytic anemia, hepatitis C and excessive alcohol consumption are implicated in increased iron deposits and constitute additional risk factors in patients with HFE gene mutations for iron overload. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007;29(4):351-360.

Key words: Ferritin; iron overload; mutation; heterozygous; homozygous; hemochromatosis/genetic.

Referências Bibliográficas

- Andrews NC, Levy JE. Iron is hot: an update on the pathophysiology of hemochromatosis. [Review] *Blood*. 1998; 92: 1845-51.
- Andrews NC. Disorders of iron metabolism. [Review] *N Engl J Med*. 1999;341:1986-95.
- Brittenham GM, Weiss G, Brissot P, Lainé F *et al*. Clinical consequences of new insights in the pathophysiology of disorders of iron and heme metabolism. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2000;39-50.
- Ajioka RS, Kushner JP. Hereditary hemochromatosis. [Review] *Semin Hematol*. 2002;39:235-41.
- McCarthy GM, Crowe J, McCarthy CJ *et al*. Hereditary hemochromatosis: a common, often unrecognized, genetic disease. [Review] *Cleve Clin J Med*. 2002;69:224-6, 229-30, 232-33.
- Piperno A, Sampietro M, Pietrangelo A *et al*. Heterogeneity of Hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology*. 1998;114:996-1002.
- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis - a new look at an old disease. [Review]. *N Engl J Med*. 2004;350:2383-97.
- Camaschella C, Piperno A. Hereditary hemochromatosis: recent advances in molecular genetics and clinical management. [Review] *Haematology*. 1997;82:77-84.
- Burke W, Thomson E, Khoury MJ *et al*. Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implication for population-based screening. *JAMA*. 1998;280:172-8.
- Burt MJ, George PM, Upton JD *et al*. The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut*. 1998;43:830-6.
- McCullen MA, Crawford DHG, Hickman PE. [Review] Screening for hemochromatosis. *Clin Chim Acta*. 2002;315:169-86.
- Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho N. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Ann Intern Med*. 2000;133:329-37.
- Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, Ellekjer E, Kannelonning K, Fjosne U, *et al*. Screening for hemochromatosis - high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36:1108-15.
- Beutler E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood*. 2003;101:3347-50.
- Bacon BR, Powell LW, Adams PC *et al*. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology*. 1999;116: 193-207.
- Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE Gene and hereditary hemochromatosis: A HuGE review. *Human Genome Epidemiology*. [Review] *Am J Epidemiol*. 2001;154:193-206.
- Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS *et al*. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilians populations. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;15:324-7.
- Calado RT, Franco RF, Pazin-Filho A *et al*. HFE gene mutations in coronary atherothrombotic disease. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33:301-6.
- Pereira AC, Cuoco MAR, Mota GF *et al*. Hemochromatosis gene variants in patients with cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2001;88: 388-91.
- Pereira AC, Mota GF, Krieger JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. *Hum Biol*. 2001;73:145-51.
- Bueno S. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em uma população brasileira miscigenada. Tese (Mestrado). São Paulo; Universidade Federal de São Paulo: 2003.
- Krieger H, Morton NE, Mi MP *et al*. Racial admixture in north-eastern Brazil. *Ann Hum Genet*. 1965;29:113-25.
- Scotet V, Merour MC, Mercier AY *et al*. Hereditary hemochromatosis: effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *Am J Epidemiol*. 2003;158:129-34.
- Naoum PC, Naoum FA. Técnicas laboratoriais para identificação da hemoglobina S e seus genótipos. In: Naoum PC, Naoum FA. *Doença das Células Falciformes*. São Paulo: Sarvier; 2004. p. 205-17.
- Dacie JV, Lewis SM, Luzatto L. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. In: Dacie JV, Lewis SM (eds) *Practical haematology*, Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991. p. 195-225
- Naoum PC, Naoum FA. Diagnóstico laboratorial das doenças das células falciformes. In: Naoum PC, Naoum FA. *Doença das Células Falciformes*. São Paulo: Sarvier; 2004. p. 111-31.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
- Lahiri DK, Numberg JL Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:5.444.
- Salazar LA, Hirata MH, Cavalli AS *et al*. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem*. 1998; 44:1.748-50.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W *et al*. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996;13:399-408.
- Simonsen K, Dissing J, Rudbeck L *et al*. Rapid and simple determination Hereditary Haemochromatosis mutation by multiplex PCR-SSCP: detection of a new polymorphic mutation. *Ann Hum Genet*. 1999;63:193-7.
- Scheuer PJ, Willians R, Muir AR. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J Pathol Bacteriol*. 1962;84:53-64.
- Arruda VR, Agostinho MF, Cançado RD *et al*. β -Thalassemia trait might increase the severity of hemochromatosis in subjects with the C282Y mutation in the HFE gene. [Letter] *Am J Hematol*. 2000;63:230.

34. Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A *et al.* Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis. *Am J Hum Genet.* 1997; 60:828-32.
35. Bacon BR. Haemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterol.* 2001;120:718-25.
36. Burke W, Imperatore G, McDonnell SM *et al.* Contribution of different HFE genotypes to iron overload disease: a pooled analysis. *Genet Med.* 2000;2:271-7.
37. Powell LW. Hereditary hemochromatosis and iron overload diseases. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(suppl):191-95.
39. Barton JC, McDonnell SM, Adams PC *et al.* Management of hemochromatosis. Hemochromatosis Management Working Group. [Review] *Ann Intern Med.* 1998; 129:932-9.
40. Halliday JW, Ramm GA, Powell LW *et al.* Cellular iron processing and storage: the role of ferritin. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW. Iron metabolism in health and disease. 7th ed. London: W. B. Saunders; 1994. p.98-121.
41. Beutler E, Hoffbrand V, Cook JD. Iron deficiency and overload. [Review] *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2003; 40-61.
42. Nielsen P, Carpinteiro S, Fischer R *et al.* Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br J Haematol.* 1998;103:842-5.
43. Phatak PD, Sham RL, Raubertas RF *et al.* Prevalence of hereditary hemochromatosis in 16031 primary care patients. *Ann Intern Med.* 1998;129:954-61.
44. Adams PC. Population screening for haemochromatosis. *Gut.* 2000;46:301-3.
45. Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Baldus WP *et al.* Prevalence and clinical significance of HFE gene mutations in patients with iron overload. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:2910-4.
46. Altes A, Remacha AF, Sureda A *et al.* Patients with biochemical iron overload: causes and characteristics of a cohort of 150 cases. *Ann Hematol.* 2003;82:127-30.
47. Bittencourt PL, Palácios SA, Couto CA *et al.* Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:329-35.
48. Bradley LA, Haddow JE, Palomaki GE. Population screening for haemochromatosis: expectations based on a study of relatives of symptomatic probands. *J Med Screen* 1996;3:171-7.
49. Bacon BR, Olynyk JK, Brunt EM *et al.* HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. *Ann Intern Med.* 1999;130:953-62.
50. Cançado RD, Vasconcelos MCC, Langhi Jr D *et al.* Características clínicas e laboratoriais de dez doentes com hemocromatose hereditária. [Resumo 189] *Rev Bras Hematol Hemoter;* 2003 (Supl 2): p.189, apresentada no 26º Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2003; São Paulo.
51. McDonnell SM, Preston BL, Jewell SA *et al.* A survey of 2,851 patients with hemochromatosis: symptoms and response to treatment. *Am J Med.* 1999;106:619-24.
52. Garry PJ, Montoya GD, Baumgarthner RN *et al.* Impact of HLA-H mutations on iron stores in healthy elderly men and women. *Blood Cells Mol Dis.* 1997;23:277-87.
53. Sham RL, Raubertas RF, Braggins C *et al.* Asymptomatic hemochromatosis subjects: genotypic and phenotypic profiles. *Blood.* 2000;96:3707-11.
54. Beutler R, Felitti V, Koziol JA *et al.* Penetrance of 845-A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211-8.
55. Mura C, Ragueneas O, Ferec C. HFE mutation analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood.* 1999;93:2502-5.
56. Witte DL, Crosby WH, Edwards CQ *et al.* Practice Guideline Development Task Force of the College of American Pathologists: Hereditary hemochromatosis. [Review] *Clin Chim Acta.* 1996; 245:139-200.
57. Edwards CQ. Hemochromatosis. In: Lee GR, Ferster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's clinical hematology.* 10th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. v.1, p.1056-70.
58. Smith BC, Grove J, Guzail MA, Day CP *et al.* Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1998;27:1695-9.
59. Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. [Review] *Haematologica.* 1998; 83:447-55.
60. Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, *et al.* Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology.* 2002;122:281-9.
61. Britton RS, Bacon ER. [Review] Hereditary hemochromatosis and alcohol: a fibrogenic cocktail. *Gastroenterology.* 2002; 122: 563-5.
62. Erhardt A, Hauck K, Haussinger D. Iron as comorbid factor in chronic hepatitis C. [Review] *Med Klin (Munich).* 2003; 98: 685-91.
63. Pietrangelo A. Haemochromatosis. [Review] *Gut* 2003, 52 (suppl 2):23-30.

Esse estudo recebeu apoio da FAP-SC (Fundação de Amparo à Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil)

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 13/07/2006
Aceito após modificações: 16/02/2007